

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659192

研究課題名(和文) iPS細胞を分化させた赤血球細胞を用いた三日熱マラリア原虫培養系の確立

研究課題名(英文) Establishment of Plasmodium vivax culture system using red blood cells differentiated iPS cells.

研究代表者

矢野 和彦 (YANO, Kazuhiko)

独立行政法人国立国際医療研究センター・熱帯医学・マラリア研究部・研究員

研究者番号：30392393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、人工多能性幹細胞(iPS細胞)から赤血球分化誘導を行い、三日熱マラリア患者の感染血液と共培養を行い、三日熱マラリア原虫の培養系の確立を目的とする。iPS細胞の赤血球への分化誘導は、Elizabeth S. et al(2005)の浮遊培養法により行った結果、培養開始40日後にスフィアの一部が赤化した赤芽球の作製に成功した。赤化したスフェアは、接着培養をおこなって三日熱マラリア原虫感染の準備を行っているが、現在三日熱マラリア患者の来院が無く、三日熱マラリア原虫を本研究に供することができていない。現在、培養熱帯熱マラリアを用いて作製された赤芽球への感染系の樹立を目指している。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study is to establish a culture system of Plasmodium vivax. We aimed to conduct erythroid differentiation from induced pluripotent stem cells (iPS cells) which were then co-cultured with the infected blood of vivax malaria patients. Induction of differentiation into red blood cells of iPS cells was successfully done (following Elizabeth S. et al.2005) and red blasts part of the sphere was reddened after 40 days of culture. Reddened spheres (erythroblast) were prepared for Plasmodium vivax infection by adhesion culture. Unfortunately we could not subject this erythroblast to vivax co-culture because there was no vivax malaria patient currently. Instead, we are attempting to establish of infection system to erythroblast, using cultured falciparum malaria parasites.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：原虫 マラリア 三日熱マラリア原虫 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

三日熱マラリアは、東南アジアを中心とした熱帯地域に広く分布し、その対策は、熱帯熱マラリアにも増して東南アジアでは、重要な課題となっている。また近年韓国で三日熱マラリアの再流行が見られていることから、わが国でも十分な防疫上の注意が必要と考えられる。

三日熱マラリア原虫 (*Plasmodium vivax*, 以下 *P. vivax*) のゲノムプロジェクトは、既に終了しているが、長期継続的な原虫培養系が未だに確立されていないことから、研究の進展が熱帯熱マラリアと比べて著しく遅れている。その理由は、*P. vivax* がヒト網状赤血球に選択的に侵入感染するため、培養のための十分な網状赤血球の確保が非常に困難であることが原因の一つである。

これまでに幾つかの *P. vivax* の培養が試みられており、熱帯熱マラリア原虫の培養液を改良して短期間行うものが報告されてきた (Chotivanich K. *et al.* 2001)。一方、長期培養を目指して、溶血試薬をヨザルに投与し、貧血をおこしたヨザルから、網状赤血球が豊富な血液を採取して利用するものや、血色素症患者由来赤血球を利用するものなどが報告されてきた (Nones B. *et al.* 1988, Golenda CF. *et al.* 1997)。

さらに、これらの方法による網状赤血球確保は量的に安定しないことから、近年臍帯血や造血幹細胞を利用する方法も報告されてきた (Udomsangpetch R. *et al.* 2007, Panichakul T. *et al.* 2007)。しかしその後の続報がないことから、定常的な臍帯血や造血幹細胞の入手がやはり相当困難であること、また不定期に採取する三日熱マラリア患者検体に対応するためには、実験室レベルで常に網状赤血球を供給できる実験系の確立が必要であ

ることが思料される。

2. 研究の目的

本研究は人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来赤血球細胞を用いた、*P. vivax* の培養系の確立を目的とする。具体的には、iPS 細胞から赤血球分化誘導を行い、国立国際医療研究センター (NCGM) 病院で採取された三日熱マラリア患者の感染血液と共培養を行い、分化誘導細胞に *P. vivax* が感染するかどうか、分裂・増殖するかどうか、様々な培養条件を検討して研究する。感染および成熟が認められれば、継続的に新鮮な iPS 細胞由来赤血球を補充することで、原虫の長期培養系の確立し、培養系を用いた様々な細胞分子レベル研究への応用を目指すものである。

3. 研究の方法

1) iPS 細胞の未分化維持

iPS 細胞は NCGM 疾患制御研究部で作製された Se-V iPS 細胞、および国立生育医療研究センターで作製された #25 細胞を用いた。それぞれの iPS 細胞は、Essential 8™ 培地と GELTREX™ (Lifetechnology 社) コートのシャーレを用いた無フィーダーで、週二度の継代培養で未分化状態を維持した。

2) iPS 細胞の RBC 細胞への分化誘導

赤血球への分化誘導は、Elizabeth S. *et al.* (2005) の浮遊培養法により行ったが、スフィアの形成の効率を上げるために、未分化細胞の処理に CKT solution (細胞はく離液) を用いて行った。はく離した細胞塊は、D-MEM/Ham' s F-12 培地で洗浄後 RBC 分化用の培地 (基礎培地 + 浮遊培養サイトカイン: 表 1) に懸濁後、低細胞接着性のシャーレで浮遊培養を開始した。

浮遊培養開始 3~5 日で球状に集合しスフィアを形成するが、その後 2~3 日ごとに培地交換を行い、培養を継続した。赤化したスフィアは、顕微鏡下で単独に採取しゼラチン A コートのシャーレで接着培養（基礎培地+接着培養サイトカイン：表 1）した。

表 1 RBC分化誘導培地

基礎培地	サイトカイン(最終濃度):
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 培地	浮遊培養
Ham F12 (F-12 Nutrient Mixture (Ham's F-12))培地	BMP4 (10 ng/ml), VEGF (5 ng/ml), SCF (20 ng/ml),
1/100 合成 Lipid	FLI-3L (5 ng/ml), IL-6 (5 ng/ml), IGF-II (5 ng/ml)
1/100 ITS-A	
450 μM Monothioglycerol	接着培養
2 mM L-Glu	VEGF (5 ng/ml), SCF (20 ng/ml), FLI-3L (5 ng/ml),
5% PFH II (Protein-Free Hybridoma Medium, GIBCO™)	IL-3 (5 ng/ml), TPO (5 ng/ml), EPO (5 U/ml)
50 μg/ml ascorbic acid-2P	
5 mg/ml BSA	

4. 研究成果

1) iPS 細胞の未分化維持結果

Se-V iPS 細胞、#25 細胞とも Essential 8™ 培地と GELTRET™ コートのシャーレを用いた無フィーダー培養で、単層培養でコロニー化すること無く、未分化状態を維持できた。

(図 1)

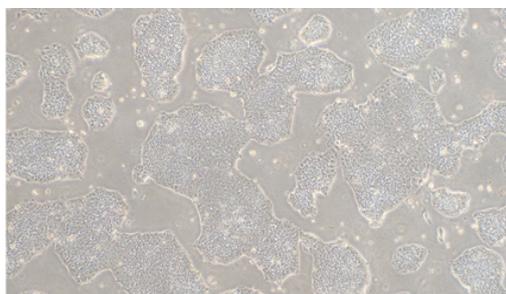


図 1 無フィーダーで未分化維持した iPS 細胞

2) iPS 細胞の RBC 細胞への分化誘導結果

浮遊培養開始後 3~5 日で球状に集合しスフィアを形成した。(図 2)

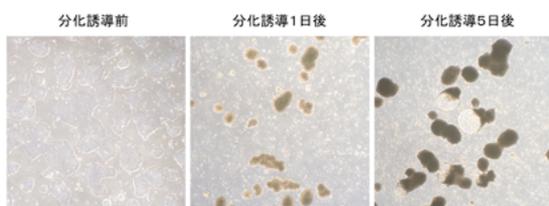


図 2 浮遊培養開始後のスフィアの形成

その後 2~3 日ごとに培地交換を行い培養を継続した結果、培養開始 40 日後にスフィアの一部が赤化した赤芽球の作製に成功した。(図 3)

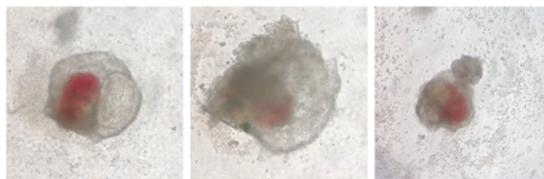


図 3 一部が赤芽球に分化したスフィア

赤化したスフィアは、その後顕微鏡下で単独採取し、ゼラチン A コートのガラスボトムシャーレに移して接着培養を開始し、三日熱マラリア原虫感染の準備を行っている。残念ながら現在三日熱マラリア患者の来院が無く、三日熱マラリア原虫を本研究に供することができていない。現在、培養熱帯熱マラリアを用いて作製された赤芽球への感染系の樹立を目指している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 和彦 (YANO Kazuhiko)

独立行政法人 国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部・上級研究員

研究者番号：30392393

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

狩野 繁之 (KANO Shigeyuki)

独立行政法人 国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部・部長

研究者番号：60233912