

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870525

研究課題名(和文) A genomic approach to the identification of transmission blocking antigens of malaria parasites

研究課題名(英文) A genomic approach to the identification of transmission blocking antigens of malaria parasites

研究代表者

カレトン リチャード(CULLETON, Richard)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：10503782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：この研究では、媒介蚊の中のネズミマラリア原虫の操作をすることでマラリア原虫の伝播動態への理解を深めた。

また、マラリア原虫の生活環の重要な部分をコントロールしている遺伝子の特定を行うための高度な手法を開発することができた。そして種類の違うマラリア原虫株同士の相互作用によってマラリアの病原性が高まるという今まで支持されてきた仮説を反証することとなった。

研究成果の概要(英文)：This project has enabled a better understanding of the transmission dynamics of malaria parasites through manipulation of rodent malaria parasites in mosquitoes. We have developed a sophisticated methodology to identify genes that control important parts of the parasites life cycle. We have also shown that parasites may not become more dangerous through interaction with other parasite strains in nature.

研究分野：原虫学

キーワード：malaria genomics bioinformatics LGS WGS gametocyte vaccine

1. 研究開始当初の背景

伝播強度が高いマラリア流行地において、遺伝的に異なる複数の原虫株に混合感染する事例が多く報告されている。このように複数のマラリア原虫株が混合感染する場合には、ヒトの体内において単一株感染の時には起こり得ないような、栄養素や感染に適した赤血球をめぐる原虫株間での競争が起こると考えられている。

原虫株間の競争は、ヒトへの病原性や原虫株から媒介蚊への伝播効率に対して様々な影響を及ぼすことが考えられる。これまでの研究においては、複数のマラリア原虫株感染は、ヒト体内においてより病原性が強い原虫株の選択につながるという仮説が一般に支持されてきた。増殖率の高い株ほど競争で優位になり媒介蚊へ伝播されやすいと考えられるためである。

2. 研究の目的

上記の仮説は主に、感染期間が比較的短い原虫種 *Plasmodium chabaudi* を用いた研究によって支持されてきた。しかし、生物学的特性が異なる原虫種に対してどれだけ一般的に適応できるかは検討の余地がある。特に、持続的な混合感染の条件下で起こる原虫株間のより長期的な競争においても、病原性の高い株が選択されるかどうかは不明である。我々は、*Plasmodium yoelii* 種のマウス感染モデルを用いて、マラリアの混合感染と宿主への病原性、選択される原虫株との関係について検討した。異なる原虫株間の競争が宿主への病原性におよぼす影響を理解することは、薬剤やワクチンによるマラリア原虫の多様性の減少によってヒトの症状がどう変化するかを予測する上で重要である。

3. 研究の方法

ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* を用いて、混合感染が宿主への病原性や原虫の適応

度に与える影響を調べた。増殖率(すなわち宿主に対する病原性)が異なる3つの同質遺伝子系統(病原性が低い方から 17XNL, 17X1.1pp, 17XL)をマウスに単独感染させた場合と、これらの系統を病原性の低い CU 系統と混合感染させた場合でマウスへの病原性を比較した。また、原虫の適応度の指標として媒介蚊への伝播率も単独感染と重複感染の条件間で比較した。

4. 研究成果

いずれの原虫株も、単独感染時に比べて混合感染時の方が宿主の感染赤血球率は高く、赤血球数はより減少し、体重減少も顕著だった。すなわち単独感染時よりも混合感染時の方が宿主に対する病原性が高かった。中程度の病原性を持つ株(17X1.1pp)では、混合感染時のみ宿主の死亡が見られた。また、感染初期に宿主を死亡させる系統(17XL)以外の2系統では、単独感染時よりも混合感染時に感染が長く持続した。

病原性の高い株ほど赤血球型ステージにおいて優占するという傾向は見られなかった。持続感染する2系統(17XNL, 17X1.1pp)は、CUとの混同感染の後期には、おそらく宿主の免疫を介した作用によってCUに競争排除された。

いずれの原虫株でも、混合感染によって蚊への伝播率が上昇する傾向は見られなかった。また、オーシスト(蚊の中腸内のステージ)感染による媒介蚊の負荷も混合感染によって上昇する傾向は見られなかった。

原虫株の適応度の指標として媒介蚊への伝播率を比較したところ、*P. chabaudi* を用いた過去の研究結果と異なり、単独感染時にも混合感染時にも原虫株の病原性と伝播率の間に関連は見られなかった。

本研究で見られた混合感染時に宿主への病原性が高くなる現象は、*P. chabaudi* に感染したマウスや、熱帯熱マラリアに自然感

染したヒトについて報告されているものと一致している。この傾向が一般的だとすると、ヒトのマラリアコントロールにおいて、原虫の遺伝的多様性を低下させる戦略が重症例を減少させる上で効果的であることが示唆される。

また、本研究においては原虫の病原性と媒介蚊への伝搬効率に相関は見られず、*P. yoelii* においては、宿主内における複数株の混合感染は病原性の強い原虫株の選択につながらないことが示唆されたが、これは、高病原性株が選択された *P. chabaudii* を用いた先行研究の結果と異なっている。この差異は、用いた原虫種のガメトサイト（蚊へ伝播されるステージ）産生のタイミングの違いに起因すると考えられる。すなわち、*P. chabaudii* に比べてガメトサイトを産生する時期が遅い *P. yoelii* では、感染初期のすばやい増殖よりも感染後期の宿主免疫への抵抗の方が、媒介蚊への効率的な伝播に寄与していた可能性がある。このような種特有のガメトサイト産生時期の違いは、ヒトの寄生虫である熱帯熱マラリアや三日熱マラリアの病原性の進化を考える上でも重要であると考えられる。本研究の結果は、病原性を含む様々な寄生虫の形質の進化を理解するためには、寄生虫種の生物学的特性の考慮が不可欠であることを示唆する。

また同時に本研究では、アピコンプレックス門における選択可能な表現型をコントロールする遺伝子を同定するための新しい手法を提示した。

病気の重症度に影響を与える表現型の決定遺伝子の同定は、抗マラリアの新たな治療法の設計において根本的に重要なことであるが、従来の手法で表現型の決定遺伝子を同定するには、相当な時間と資源が必要であった。従来の方法で必要とされたクローニングや個々の後代表現型検査、マーカー生成等を省略し、Linkage Group Selection(LGS)と定

量全ゲノム解析(qWGS)さらに新しい数学的モデリング手法を組み合わせることで、増殖率と株特異的免疫の異なる表現型の基となる複数の遺伝子を同時に同定することができた。

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 3件)

1. Abkallo HM, Tangena JA, Tang J, Kobayashi N, Inoue M, Zoungrana A, Colegrave N, Culleton R, *Within-host competition does not select for virulence in malaria parasites; studies with Plasmodium yoelii* **Plos Pathogens** 査読有り, 11(2): e1004628, **2015**
10.1371/journal.ppat.1004628
2. Culleton RL, Abkallo HM, *Malaria parasites genetics: doing something useful.* **Parasitology International** 査読有り, 64(3):244-53, **2015**
10.1016/j.parint.2014.07.006
3. Abkallo HM, Liu W, Hokama S, Ferreira PE, Nakazawa S, Maeno Y, Quang NT, Kaneko O, Huffman MA, Kawai S, Marchand RP, Carter R, B.H. H, Culleton R: DNA from *Pre-Erythrocytic Stage Malaria Parasites* is Detectable by PCR in the Faeces and Blood of Hosts. **International Journal for Parasitology** 査読有り, 44(7): 467-473, **2014**
10.1016/j.ijpara.2014.03.002

[学会発表](計 11件)

1. Culleton R, Phenotypic, Genotypic, and Transcriptomic Characterisation of the Plasmodium vinckei clade of Rodent Malaria Parasites, 第84回日本寄生虫学会, 2016年3月20日、宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)
2. Abkallo H, Culleton R, Quantative whole Genome Resequencing and Genetic Linkage Analyses Identify Genes Controlling Medically Important Phenotypes of Malaria Parasites, 第84回日本寄生虫学会, 2015年3月21日、杏林大学(東京都三鷹市)

3. Culleton R, The role of the innate immune response in blocking the transmission of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii* to mosquitoes, 第 8 4 回日本寄生虫学会、2015 年 3 月 21 日、杏林大学(京都三鷹市)
4. Culleton R, Detection of Pre-Erythrocytic Stage Malaria Parasite DNA in Blood and Faeces of Sporozoite-Infected Mice and Monkeys, 第 55 回日本熱帯医学会大会・第 29 回日本国際保健医療学会学術大会合同大会、2014 年 11 月 2 日、(独)国立国際医療研究センター(東京都新宿区)
5. Culleton R, Within-host competition does not select for virulence in malaria parasites: the case of *Plasmodium yoelii*, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム in 奈良、2014 年 9 月 23 日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)
6. Abkallo H, Culleton R, Genetic Linkage Analyses using Quantitative Whole Genome Resequencing Identifies Genes Controlling Medically Important Phenotypes of Malaria Parasites, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム in 奈良、2014 年 9 月 23 日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)
7. Culleton R, DNA from Pre-Erythrocytic Stage Malaria Parasites is Detectable by PCR in the Faeces and Blood of Hosts, 第 8 3 回日本寄生虫学会、2014 年 3 月 27 日、愛媛大学(愛媛県松山市)
8. Culleton R, Detection of Pre-Erythrocytic Stage Malaria Parasite DNA in Blood and Faeces of Sporozoite- Infected Mice and Monkeys, 第 5 4 回日本熱帯医学会、2013 年 10 月 3 日、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)
9. Culleton R, Quantitative Whole Genome Resequencing and Genetic Linkage Analyses Identify Genes Controlling Medically Important Phenotypes of Malaria Parasites, 第 5 4 回日本熱帯医学会、2013 年 10 月 3 日、長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

10. Abkallo H, Culleton R, Detection of Pre-Erythrocytic Stage Malaria Parasite DNA in Blood and Faeces of Sporozoite- Infected Mice and Monkeys, 第 1 2 回あわじしま感染症免疫フォーラム、2013 年 9 月 10 日、淡路夢舞台国際会議(兵庫県淡路市)

11. Culleton R, Quantitative Whole Genome Resequencing and Genetic Linkage Analyses Identify Genes Controlling Medically Important Phenotypes of Malaria Parasites, 第 1 2 回あわじしま感染症免疫フォーラム、2013 年 9 月 10 日、淡路夢舞台国際会議(兵庫県淡路市)

〔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
http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/malariaunit/Culleton_Lab/Home.html

6. 研究組織
(1)研究代表者
カレトン リチャード(CULLETON, Richard)
長崎大学・熱帯医学研究所・准教授
研究者番号：10503782

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)協力研究者
アブカロ フセイン (ABKALLO, Hussein)