

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 10 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461499

研究課題名(和文) マラリア原虫へのステロール供給経路の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Host Sterol Supply to Plasmodium Parasites as the Therapeutic Target in Malaria

研究代表者

磯尾 直之 (IS0-0, Naoyuki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：80420214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：赤内型マラリア原虫に対して、宿主のクラスBスカベンジャー受容体(SR-Bs)特にCD36が脂質輸送をおこなっていること、CD36が血小板からエクソソームを介して感染赤血球の細胞膜および赤内型原虫のapical membraneに輸送されていること、SR-Bsに対する特異的遮断薬であるBLT-1がin vitroで熱帯熱マラリア原虫の増殖を抑制することなどが判明し、マラリアにおいてSR-Bsの動態を詳らかにすることは治療の標的を探るうえでも重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we found a novel feeding pathway for cholesteryl esters by Plasmodium erythrocyte-stage parasites in a form of high density lipoprotein (HDL). Addition of fluorescently-labelled HDL into in vitro culture resulted in an internalization of HDL signal to both parasitized erythrocyte membrane and parasite body. BLT-1, an antagonist for class B scavenger receptors, blocked HDL uptake, and Plasmodium growth in vitro significantly reduced. Reaction with anti-CD36 antibody was positive only with parasitized host erythrocyte membranes and the apical membrane of internal parasites, but not in a CD36-deficient mouse or a mouse with bone marrow transplanted from the CD36-deficient mouse. We also found that double positive exosomes for CD36 and platelet-specific CD41 were detected from infected mouse plasma. In addition, anti-CD41 antibody reacted with parasite membrane, suggesting that CD36 is delivered from host platelets via exosomes.

研究分野：脂質代謝学

キーワード：マラリア リポ蛋白 スカベンジャー受容体 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

研究者は所属機関病院でマラリア症例における脂質異常症(著明な低HDL血症)に気づいた。マラリア原虫はその虫体膜成分にコレステロールを持つ一方、完全な *de novo* のステロール生合成系をもたないとされており、その増殖は宿主ステロールに依存していると推測されるが、特に赤内型原虫はステロールの供給源としてリポ蛋白を血清から取り込んでいる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

赤内型原虫がリポ蛋白を取り込んでいるか否かを明らかにし、取り込んでいるならリポ蛋白の種類、その取り込み経路を探索し、さらに可能であればこれを標的とした新たなマラリア治療法を開発したいと考えた。

3. 研究の方法

蛍光色素標識したリポ蛋白をもちいて感染赤血球や内部原虫への取り込みを蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーで観察、さらに、リポ蛋白受容体に対する低分子アンタゴニストをもちいて用量依存的な取り込み阻害の有無をみた。またこのアンタゴニストをもちいた *in vitro* study、リポ蛋白受容体欠損マウスでの *in vivo* study により、リポ蛋白の取り込み阻害ないし障害により実際にマラリア原虫の増殖が抑制されるか否かを検証した。

また感染赤血球や内部原虫においてウエスタンブロット法、免疫細胞化学によりリポ蛋白受容体の存在を検索した。さらにリポ蛋白受容体の

由来を調べるために血漿エクソソームを候補として詳しい解析をおこなった。

4. 研究成果

コレステロールエステル部分を標識した HDL が感染赤血球および内部原虫に取り込まれ、この取り込みはスカベンジャー受容体特異的アンタゴニスト BLT-1 により用量依存的に抑制された。BLT-1 はまた、*in vitro* でのマラリア原虫増殖を抑制した。スカベンジャー受容体 CD36 k/o マウスは同週齢のコンジェニックマウスと比較し、原虫接種後の survival が有意に長く、また赤血球の原虫感染率も有意に減少していた。CD36 は感染赤血球膜と内部原虫の apical membrane に明瞭に検出された。CD36 は本来赤血球には殆ど存在しないものとされているが、実際にウエスタンブロット法、免疫細胞化学にても非感染個体の赤血球には殆ど検出されず、感染赤血球の CD36 は外部から輸送されてきたものと推測された。CD36 k/o マウスの感染赤血球に CD36 は検出されなかったが、さらに CD36 k/o マウスから骨髄移植したコンジェニックマウスの感染赤血球にも CD36 は見出されず、CD36 は確かにマウスの authentic CD36 であり、しかも hematopoietic cell のいずれかに由来すると推定された。我々はさらに感染マウスの血清中に CD36/CD41 二重陽性エクソソームが著増すること、免疫二重染色により感染赤血球において CD36 と CD41 が挙動をとみにしていることを見出し、CD41 が巨核球系細胞に特異性が高いことから、血小板が放出するエクソソームが感

染赤血球に CD36 を供給していると推定した。これを追認するため、巨核球由来の cell line である CMK-86 から培地 (exosome-free FBS 含む) 中に放出されたエクソソームを精製し、これを CD36 k/o マウス由来の感染赤血球とともにインキュベートしたところ、感染赤血球内部に明瞭な CD36 シグナルが認められた。すなわち、確かに、血小板 (ないし巨核球系細胞) はエクソソームを介して感染赤血球に CD36 を供給しているのである。

これら一連の成果は、マラリア原虫がその増殖に関して、宿主のコレステロールを、さらにこれを取り込むための宿主スカベンジャー受容体を巧妙に利用しているという非常に興味深い知見をもたらした。さらに、スカベンジャー受容体が宿主から血漿エクソソームのカーゴ蛋白として感染赤血球に対して供給されているということが判明し、宿主とマラリア原虫間のエクソソームを介したコミュニケーションという新しいパラダイムが確立される可能性が示唆される。

CD36 は熱帯熱マラリア原虫に特異的なタンパクである PfEMP-1 と非常に親和性が高く、熱帯熱マラリア原虫が血管内皮細胞に繫留される、いわゆる sequestration という現象にかかわっているとされてきた。CD36 がマラリア原虫の増殖に決定的な役割を果たしていることが判明した今、PfEMP-1 の役割はむしろ、CD36 が乏しい環境にあってこれを効率よく集積するための進化的適応であろうと推測される。これこそは熱帯熱マラリア原虫が、多くの Plasmodium 種と

異なり、幼若赤血球または網状赤血球 (これらは赤芽球以来の CD36 を少量残している) への嗜好性をもたず、成熟赤血球にも感染して増殖できる秘密であろうと信ずる。

また、2000 年に Nature 誌において、マラリア流行地域であるケニアとガンビアでは、CD36 の truncal mutation を生じているヒトが非常に多いという報告があった。これはあたかも鎌形赤血球症のように、マラリアに対抗するための宿主側の進化的適応とも解釈できるものであり、さきの PfEMP-1 とあわせ、CD36 とこれに関わるいくつかの分子のふるまいに、マラリアとヒトとの攻防の長い歴史が凝縮されているともいえるのである。

現在最も有効な抗マラリア治療プロトコルとして、artemisinin-based combination therapy (ACT) がおこなわれているが、artemisinin 耐性株が自然界に発生していることが既に報告されており、今後、CD36 や CD36 陽性エクソソームを標的とする抗マラリア治療が重要となると期待される。

CD36/CD41 陽性エクソソームは、マラリアに留まらず、例えば動脈硬化性疾患において重要な役割を果たしているかもしれない。血管内皮下でマクロファージが CD36 を介して酸化 LDL を取り込むことが動脈硬化病変形成の initial step であるが、マクロファージにおける in situ の CD36 発現以外に、血小板からエクソソームを介してマクロファージに輸送される CD36 が示されれば、これもきわめて重要な知見になると考えられる。現在、研究代表者はマラリア

研究と動脈硬化研究の両方に使用可能な蛍光標識 CD36/CD41 陽性エクソソームを作成中である。

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 件)

[学会発表](計 1件)

「ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるマラリア患者リポ蛋白解析」

磯尾 直之、石垣 知寛、菊地 正、安達 英輔、古賀 道子、鯉淵 智彦
第 67 回日本電気泳動学会総会(2016) シンポジウム講演

[図書](計 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

磯尾 直之 (ISO-O, Naoyuki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 80420214

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

北 潔 (KITA, Kiyoshi)

長崎大学・熱帯医学グローバルヘルス研究科・教授

研究者番号: 90134444

(4)研究協力者

()