

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073013

研究課題名（和文） マラリア原虫の増殖と病原性に関わる遺伝的多様性

研究課題名（英文）

Malaria genetic diversity as a basis for parasite growth and pathogenicity

研究代表者 堀井 俊宏

(HORII TOSHIHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80142305

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：マラリア、*Plasmodium*、遺伝子多型、多重遺伝子群、SE36 マラリアワクチン

### 1. 研究計画の概要

マラリア原虫の増殖と病原性は寄生体-宿主相互作用によって決定される。宿主免疫系は原虫の増殖を抑制するが、逆に原虫は自らの抗原性を遺伝子多型や多重族遺伝子群の発現制御により変化させることで、宿主からの免疫応答を回避していると考えられている。本研究の目的は増殖と病原性に関わるマラリア原虫の遺伝的多様性の分子基盤を明らかにすることであり、5年の研究期間内に以下のことを行う。1. SERAをはじめとする原虫表面蛋白質の多くは激しい遺伝子多型を示すことから、遺伝子多型の特異性を解析し、遺伝子多型の発生と進化の分子機構を明らかにする。2. 我々は三日熱マラリア患者から予想を遥かに超える多重感染（平均5種類の対立遺伝子が共存）を発見した。この多重感染を維持する分子機構を明らかにする。3. 我々はSE36 マラリアワクチンの臨床開発を行っている。SE36は熱帯熱マラリア原虫のSERA多重属遺伝子群に属するSERA5遺伝子を用いた組換え蛋白質であるが、SERA5は免疫原性が他のSERA遺伝子に比べ極めて低いため宿主は自然感染により抗体陽性となるのが稀である。この現象の分子基盤を明らかにする。

### 2. 研究の進捗状況

(1) SE36 マラリアワクチン実用開発において、その効果を飛躍的に高めるため、防御エピトープである8mer反復配列を組み込んだ改良型SE36蛋白質を発現・精製しマウスに免疫した結果、8mer反復配列に対する抗体が上昇した。またアジュバントとしてCpGを添加することによってカニクイザルで約50倍の抗体価の上昇を見た。(2) マラリア原虫10種に

ついて、SERA遺伝子ファミリーの全遺伝子レパートリーと塩基配列を新たに決定した。代表的な種について発現解析を行ったところ、SERAは異なる宿主への対応のために遺伝子重複により、レパートリーを変化させていったことが推測された。(3) 世界8ヶ国の熱帯熱マラリア原虫集団からハウスキーピング遺伝子、抗原遺伝子のシーケンスを大規模に得て解析を行った結果、遺伝的多様性及び感染多重度に大きな地理的差異を認めた。抗原遺伝子では数万年にわたるSNPの安定性、及び、すべての地域における多様化選択を認めた。(4) ミトコンドリアゲノムを用いてマラリア原虫と宿主の進化の比較を行った結果、現生マラリア原虫の起源（約3,800-2,500万年前）において急速な多様化が起き、その多様化は宿主転換によって生じたことを見いだした。(5) タイ、トルコ、アフリカからの三日熱マラリア原虫分離株について、抗原分子であるSERA、MSP-1およびマイクロサテライト領域4箇所の配列を決定し、多重感染度と多様性度を解析した。また、RT-PCRによりSERAファミリー遺伝子の発現解析をした結果、三日熱マラリアワクチン候補抗原としてPvsera2とPvsera4で顕著な発現が見られた。

### 3. 現在までの達成度

②研究はおおむね順調に進行している。

（理由）（下記に記載するように研究計画は順調に実施され、成果を得ている。これらの成果は既に論文発表済み、あるいは投稿準備中である。）

(1) SERA抗原のエピトープマッピングと免疫原性の解析：熱帯熱マラリア原虫のPfSERA5を抗原としたSE36マラリアワクチン

の B 細胞エピトープが N 末端付近の 8mer 反復領域部分にあることを特定した。SE36 マラリアワクチンの効果を飛躍的に高めるため、防御エピトープである 8mer 反復配列を組み込んだ改良型 SE36 蛋白質と自然免疫アジュバントとして CpG を添加することによって第二世代 SE36 マラリアワクチンの開発に未知を開いた。(2) マラリア原虫 SERA 遺伝子の網羅的同定と系統解析、及び、熱帯熱マラリア原虫 SERA 抗原の多型解析については当初の計画どおり、研究の進展を見た。一方、タンザニアからの分離株 55 株とタイからの分離株 80 株について、抗原遺伝子 (*msp1*, *sera5*) とハウスキーピング遺伝子の (*serca*) の多型解析を行った結果、SERA5 はワクチン抗原候補でありながら、ハウスキーピング遺伝子的な特徴をもつことが解析された。この結果は SE36 マラリアワクチンを実用化してゆく上で極めて有望な知見であり、その成果は大である。(3) 三日熱マラリアは熱帯熱マラリアに次いで重要なマラリアである。本研究課題により、タイ、トルコ、アフリカの感染患者からの分離株を用いてその解析を推進できた事は今後の三日熱マラリア研究の礎になるものである。(4) 抗原遺伝子多型の起源と進化：*P. vivax* の *msp1* 多型の起源と進化に関しては一定の研究結果が見られ、マラリア原虫種によって抗原多型の起源と進化が異なることを明らかにすることができた。マラリア原虫の進化に関しても概ね成果があがり、従来の宿主との共分岐説が必ずしも妥当でなく、宿主転換が重要であることを明らかにすることができた。また、*P. falciparum* 遺伝子多型の解析に必要なフィールド株の確保 (2,000 株以上)、及び、そのフィールド株の単一遺伝子型感染検体の選定が終わり、遺伝子シーケンスの大量取得を行える体制を整えることができた。

#### 4. 今後の研究の推進方策

これまで、予定されていた研究計画がおおむね順調に達成できているので、その成果を踏まえ、以下の研究計画を進める。なお、国内外の研究の進展状況に伴い、新たな研究計画を含めている。

(1) 改良型 SE36 蛋白質と自然免疫アジュバント CpG を組み合わせた第二世代 SE36 マラリアワクチンのマラリア防御能力を、リスザルを用いた感染実験によって実証する。(2) マラリア原虫 10 種について、SERA 遺伝子ファミリーの全遺伝子レポーターについて mRNA の発現解析を行い、遺伝子ファミリーの機能についての知見を得る。(3) *P. falciparum* SERA5 の遺伝子多型解析対象地域をマラリア流行度が異なる様々な地域に広げ、400 株以上の SERA5 遺伝子シーケンスを取り、多型の集団遺伝学的解析を行う。(4) マラリア原虫血症を示すにも関わらず、発症が非常に少ないタイ国 Kong Mong Ta 地区に

における *P. falciparum* 遺伝子型及び多重感染を複数の多型遺伝子で調べ、遺伝子型と無症状マラリアとの関係について考察する。(5) 三日熱マラリア患者に見られる *P. vivax* 多重感染度を維持する分子メカニズムを理解するために、患者血液をハマダラカに吸血させ、蚊の中腸における遺伝的組み換えを解析する。(6) 逆遺伝学的方法によりマラリア原虫 DNA polymerase delta の 3'-5' exonuclease 活性を変異導入させ、高頻度突然発生原虫を作製する。それを用いて、増殖と病原性、遺伝的多様性に関する研究を進める。(7) *P. vivax* に最も近縁なアジアのサルマラリア原虫である *P. cynomolgi* のゲノム解読を高速シーケンシング法により行う。比較ゲノム解析から *P. vivax* ゲノムに独自な特徴、ヒト寄生化の遺伝的基盤の解明を目指す。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 24 件)

[学会発表] (計 41 件)

[産業財産権] 出願状況 (計 1 件)

(1) 名称：新規マラリアワクチン及びアジュバント

発明者：堀井俊宏、石井 健、東岸任弘

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：

出願年月日：平成 21 年 4 月 28 日

国外の別：国内

(2) Kazuyuki Tanabe Evolutionary genetic approach to antigen polymorphism of malaria parasites. 16th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases, 2008.9.26, Goettingen, Germany

(3) Toshihiro Horii Learning from interfacing studies on SE36: a candidate malaria vaccine that targets the Achilles' heel antigen of *Plasmodium falciparum*. Malaria: Immunology, Pathogenesis and Vaccine Perspectives, 2008.6.10, Alpbach, Austria

(4) Tanabe K., Escalante A, Sakihama N, Honda M, Arisue N., Horii T., Culleton R, Hayakawa T., Hashimoto T, Longacre S, Pathirana S, Handunnetti S, Kishino H. Recent independent evolution of *msp1* polymorphism in *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol.*, 156, 74-79, 2007

(5) Palacpac NM, Leung BW, Arisue N., Tanabe K., Sattabongkot J, Tsuboi T, Torii M, Udomsangpetch R, Horii T. *Plasmodium vivax* serine repeat antigen (SERA) multigene family exhibits similar expression patterns in independent infections. *Mol Biochem Parasitol.* 150(2), 353-358, 2006

[その他]

ホームページ <http://kansen-matrix>