

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32651

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2020～2022

課題番号：20KK0180

研究課題名（和文）東アフリカルワンダ国におけるアミノ酸とマラリア重症度に関するフィールド検証型研究

研究課題名（英文）Developing a new control measure of malaria by adjusting host nutrition

研究代表者

嘉糠 洋陸（Kanuka, Hirotaka）

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：50342770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：重症マラリアは、熱帯熱マラリア原虫の感染によって引き起こされる感染症である。マラリア原虫は、生育に必要な栄養を感染宿主の血液に依存する。宿主の栄養代謝動態とマラリアの重症度との相互作用に着目し、マラリア感染者の血漿に含まれる遊離アミノ酸の網羅的な濃度パターン（血漿アミノグラム）の解析を通じて、血中イソロイシンの変化が脳マラリアの症状に与える影響を明らかにするとともに、一部の免疫系細胞の減少および小球性赤血球の出現等に起因する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた研究成果は、栄養素の中でも寄生虫と宿主の共通通貨とも言えるアミノ酸に焦点を当てることにより、予防・診断・治療法の研究開発において、マラリアだけに限らず多種多様な感染症への適用が可能であることを強く示している。アミノ酸等の宿主の栄養学的知見に基づく感染症制御に向けた新たな研究基盤は、食餌性の感染症コントロール法開発につながる可能性を有しており、臨床応用を含めた今後一定の波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：Malaria is an infectious disease caused by infection with Plasmodium parasites, such as Plasmodium falciparum. Malaria parasites depend on the blood of infected hosts for nutritional requirements for growth and differentiation. Focusing on the interaction between host nutrient metabolism dynamics and malaria pathogenicity, through the analysis of comprehensive concentration patterns of free amino acids in the plasma of malaria-infected patients, we demonstrated the effect of changes in blood isoleucine on cerebral malaria symptoms, which may be due to the reduction of immune cells and the appearance of small red blood cells.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア アミノ酸 宿主 赤血球 栄養 代謝 イソロイシン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* に代表される原虫の感染によって引き起こされる、寄生虫感染症の中でも最大の脅威とされる疾病である。マラリア制御についての研究は 100 年以上前から精力的に進められているにも関わらず、その予防は薬剤を塗布した蚊帳や重篤な副作用を伴う抗マラリア薬の内服に限定される。マラリア原虫は複雑な生活環を有し巧みに宿主免疫機構を免れる。マラリア犠牲者の 85%以上は抵抗力・免疫力の未発達な 5 才未満の幼児である。有効なワクチン開発の試みは未だ途上にある。さらに、1980 年代から問題視されてきた薬剤耐性問題に対して未だ解決策を見出せておらず、新たに開発されたアルテミシニン誘導体と他の抗マラリア薬とを併せた治療法 (Artemisinin-based Combination Therapy: ACT) については、すでに耐性株が確認されている。そのため、既存の手法とは異なる概念に基づく新規の研究基盤の開発が喫緊の課題である。研究代表者らは、血液に含まれる遊離アミノ酸濃度の網羅的な組成 (アミノグラム) を解析パラメータとする宿主血中遊離アミノ酸情報 (アミノ酸インフォマティクス) 解析を通し、栄養学的見地に基づくマラリア原虫-宿主相互作用の解明を試みてきた。

2. 研究の目的

マラリア原虫の生活環は、蚊ステージ、肝臓ステージ赤血球ステージの 3 つに大別される。このうち、赤血球ステージの原虫が宿主に重篤な症状を引き起こす。赤血球ステージのマラリア原虫は、生育に必要な栄養素を感染宿主の血液中に依存する。特にアミノ酸について、原虫は多くの生合成経路を欠損するため、血球内に多量に存在するヘモグロビンを分解することによって必要なアミノ酸を得る。また、ヘモグロビン中の含量が微量なアミノ酸については、感染赤血球膜や寄生虫虫膜上にチャネルやトランスポーターを発現することで、血漿中の遊離アミノ酸を効率的に利用している。これらの知見は、宿主の血中に含まれる遊離アミノ酸がマラリア原虫の寄生成立において重要な役割を担うことを示唆する。本研究課題は、これまで研究代表者らが推進してきた感染動物の血漿に含まれる遊離アミノ酸の網羅的な濃度パターン (血漿アミノグラム) を解析パラメータとする研究成果に立脚し、マラリアが蔓延する地域において、アミノ酸を中心とした熱帯熱マラリア患者の栄養状態と感染病態との関係についての解析を実施した。加えて、熱帯熱マラリア原虫のアミノ酸要求性を明らかにした上で、げっ歯類マラリア原虫感染モデルにおいて、アミノ酸によるマラリア病態制御メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) マラリア流行地域における重症マラリア患者のアミノグラム解析

海外の医療機関に入院した重症マラリア患者の血清を用いて、アミノグラムを解析した。マラリアの診断には、世界保健機関 (WHO) の基準 (2000 年) を用いた。全ての患者について、治療開始から 28 日後に末梢血からマラリア原虫が消失した。重症マラリア患者の入院時と治療後の血清サンプルを同一人物から採取した。アミノ酸分析用の血清サンプルは、抗凝固剤として EDTA または 5%ヘパリンを用いて患者から血液を採取した後、5%トリクロロ酢酸を用いて調整した。血清サンプルは、使用するまで -80°C で保存された。アミノ酸濃度は自動アミノ酸分析装置 (L-8800; 日立、東京、日本) を用いて測定した。

(2) 熱帯熱マラリア原虫のアミノ酸要求性の解析

熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) の 3D7 株を、ヒト赤血球と血清を用いて培養した。原虫は、0.05 mg/ml ゲンタマイシン、0.014 mg/ml ヒポキサンチン、38.4 mM HEPES、0.2%炭酸水素ナトリウム、3.4 mM 水酸化ナトリウム、および 10%ヒト血清 (56°C で 40 分間不活化) を添加した RPMI 培地中で、ヒト赤血球を用いて培養した。ヒト赤血球と血清は日本赤十字社から入手した。アミノ酸要求性を調べる実験について、RPMI 培地の代わりに、アミノ酸成分を人為的に再構成し、イソロイシンのみを欠損した培養液を用いた。培養 1~2 日置きにギムザ染色薄塗抹標本を作成し、感染赤血球率を算出した。

(3) 脳マラリアの病態に対する免疫系細胞および小球性赤血球の関与

赤血球のサイズについて、光学顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて測定した。感染マウスから採取した血液から血液塗抹標本を作製し、ギムザ染色液で染色した後、光学顕微鏡により赤血球を写真撮影した。赤血球の直径は、Leica ソフトウェアのツールを用いて測定した。未固定状態の赤血球の大きさをフローサイトメトリーを用いて分析した。採取したマウス血液中の細胞を 1% FBS を含む PBS で 3 回洗浄し、PE 標識抗 TER119 抗体で標識した。PE の発光を細胞サイズの指標として用いた。赤血球サイズは、発光量 400-580 を小、580-620 を中、620-820 を大とした。赤血球数・白血球数・血色素量・ヘマトクリット値・平均赤血球容積・平均赤血球血色素・平均赤血球血色素濃度・血小板数などについて、全自動血球計算装置を用いて測定した。

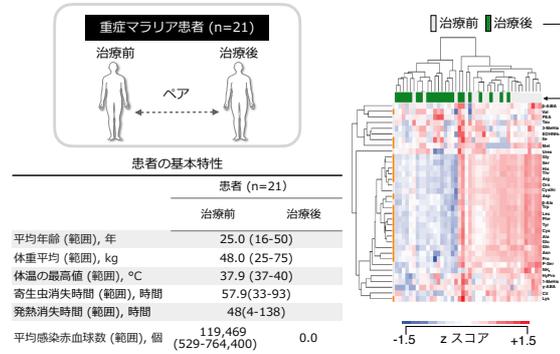
4. 研究成果

(1) マラリア流行地域における重症マラリア患者のアミノグラム解析

赤血球ステージにあるマラリア原虫は、宿主の血液中の遊離アミノ酸から生存に必須な複数のアミノ酸を得ることが知られている。原虫の成長と分化に影響を与える、血液の栄養環境を理解するために、宿主の血液中の遊離アミノ酸とその代謝物の濃度を網羅的に調べた。海外の医療機関に入院した重症マラリア患者 41 人の治療前（入院時）と治療後（治療後 21 日）の血清を比較した。治療前の血液中の平均マラリア原虫は 96, 976 (529-764400) /マイクロリットルであった。調べた 35 種類のアミノ酸とその代謝物のうち、15 種類は治療前後で有意な濃度変化を示した。

アミノ酸濃度パターンの特徴的クラスタ分析により、重症マラリア患者では特定のクラスタが形成されていることが明らかになった（図 1）。次に、げっ歯類のマラリア原虫である *P. berghei* の ANKA 株を BALB/c マウスに感染させ、血中の遊離アミノ酸濃度を調べた。その結果、アミノ酸プロファイルの階層的クラスタリング解析により、重症マラリア患者を用いた解析結果と同様に、原虫感染後の日数によって特定のクラスタが形成されることが明らかになった。ヒトとマウスにおけるこれらの結果は、原虫感染によって血中の特定の遊離アミノ酸の濃度が変化することを示している。

図 1 重症マラリア患者血清のアミノグラム解析

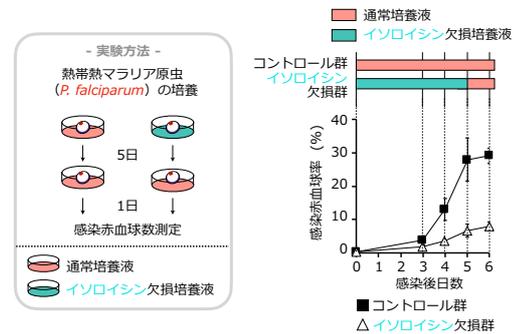


(2) 熱帯熱マラリア原虫のアミノ酸要求性の解析

マラリア原虫は、宿主の血液中にイソロイシンが不足していることを感知し、代謝速度を低下させるメカニズムを有することが知られている。これまでの研究から、マラリア原虫は血中グルコース濃度を検出する因子を持ち、その機能によってマラリア原虫メロゾイトの産生をグルコース濃度に応じて調節していることが示されている。これらの研究は、血漿中のイソロイシン濃度がメロゾイトの産生に影響を与える可能性を示唆している。加えて、研究代表者らがげっ歯類モデルにおいて見出した、マラリア原虫のイソロイシン要求性が、他種、特にヒトマラリア原虫においても保存されているか確認する必要がある。そのため、メロゾイト産生を定量化することが可能な、熱帯熱マラリア原虫の培養系を用いた。

イソロイシンを欠損した培養液を用いて熱帯熱マラリア原虫を培養したところ、通常のアミノ酸組成の培養液と比較して、原虫数の顕著な抑制が観察された（図 2）。さらに、マラリア原虫の赤血球ステージを詳細に分析したところ、メロゾイト数が減少していた。これらの結果は、十分な量のイソロイシンが、マラリア原虫の適切なメロゾイト産生に必要なことを示唆している。

図 2 熱帯熱マラリア原虫のアミノ酸要求性の解析

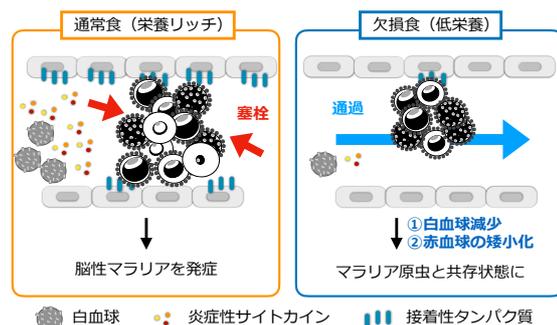


(3) 脳マラリアの病態に対する免疫系細胞および小球性赤血球の関与

近年、脳性マラリアと宿主の栄養状態との関係が着目されており、食事制限によるカロリー摂取量の調節は、脳への T 細胞の動員を減少させることで脳性マラリアの発症を予防することなどが報告されている。これらの知見は、イソロイシン欠乏状態のマウスにおいて、食事制限した場合と同様の経路で脳性マラリアを抑制する可能性を示唆する。そこで、イソロイシン欠乏マウスにおける血液細胞の状態を比較検討するために、

P. berghei ANKA 株に感染したマウスの全血算解析を実施した。その結果、イソロイシン欠乏食群において、白血球数の極端な現象が観察された。は、感染赤血球がロゼットリング（凝集の一種）を起こして脳血管塞栓を起こす際に重要な役割を果たす。さらに、ギムザ染色した血液塗抹標本を光学顕微鏡分析したところ、イソロイシン欠乏マウスでは赤血球の大きさが平均約 10% 減少していた。さらにフローサイトメトリーで赤血球サイズを解析したところ、イソロイシン欠損宿主の感染赤血球のみが矮小化していた。これらの結果は、イソロイシン摂取による感染赤血球の肥大化が、脳マラリアを悪化させる可能性を示唆している（図 3）。

図 3 脳マラリアの病態に対する免疫系細胞および小球性赤血球の関与



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嘉糠洋陸
2. 発表標題 アミノ酸を介したマラリア原虫と宿主の相互作用～マラリアは現代病か～
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栄養から眺めるマラリア原虫と宿主の相互作用
2. 発表標題 嘉糠洋陸
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青沼 宏佳 (Aonuma Hiroka) (60451457)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	
研究分担者	齊木 選射 (Saiki Erisha) (70738971)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------