

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：15301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790457
 研究課題名（和文）
 重症マラリア病態形成機構に関わる因子の同定と宿主-寄生体相互作用の解析
 研究課題名（英文）
 Analysis of the factors of host-parasite relationship in severe malaria pathology
 研究代表者
 畑生 俊光 (Toshimitsu Hatabu)
 岡山大学・大学院環境生命科学研究科・准教授
 研究者番号：60344917

研究成果の概要（和文）：

1) データベース検索から 4 種類の SR リガンド候補蛋白質を同定し、組み換え蛋白質の作製を試みた結果、2 種類を除いて組み換え蛋白質の作製に成功し、現在生理活性等の確認中である。
 2) ネズミマラリア感染による遺伝子発現解析の結果、脾臓辺縁帯マクロファージ (Mφ) や肝臓血管内皮細胞で MARCO の発現上昇が認められた。また、感染致死群では M2a Mφ の誘導が推察されたが、感染回復群では、M2c-like Mφ に変化していることが推察された。

研究成果の概要（英文）：

1) To confirm the ligands to SRs, the candidate proteins were searched on the PlasmoDB. Four of the *Plasmodium* proteins were identified and their recombinant proteins were successfully made by common methods using *E. coli*, and now confirming their biological functions.
 2) The expression of SRs was observed in mice infected with *P. berghei* ANKA (PbANKA). The expression of class A SR, MARCO, was markedly enhanced by PbANKA infection in lung, liver, and spleen, but not class B SR, CD36. MARCO was histopathologically expressed on the macrophages in marginal zone macrophages and endothelial cells in liver sinusoid. The differentiation of gene expression in both lethal and recovered mice group from *P. yoelli* 17XL (Py17XL) infection were measured by DNA microarray. The expression of 5893 in 59304 genes was enhanced in recovered group compared with lethal it. The results suggested that different types of macrophages were induced in both lethal (M2a macrophage) and recovered mice (M2c-like macrophage).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：重症マラリア、宿主-寄生体相互作用、スカベンジャー受容体、免疫修飾

1. 研究開始当初の背景

| 申請者は、マラリア重症化機構を理解する

ために、①宿主側・原虫側双方に未知のマラリア重症化関連因子が存在する。②臓器毎にマラリア病態形成機構が異なる。つまり、臓器毎に既知・未知併せて原虫側因子と宿主因子の組み合わせがマラリア病態形成機構に重要である。といった2つの可能性に着想するに至った。申請者は、現在まで、まず①に関して、マラリア重症化機構への関与が推測される新規宿主分子の検索を進め、膜結合型ケモカインおよびスカベンジャー受容体(SR)4種類を新規に同定した。解析の結果、膜結合型ケモカインは、PRBCとの細胞接着分子としての役割が推測された。SRは、血管内皮細胞や貪食細胞表面に発現し、酸化脂質・細菌類やアポトーシス細胞の取り込み・排除の役割を担うパターン認識分子であることから、PRBCに対しては細胞接着分子としてのみならずPRBC貪食因子として機能する可能性が推測された。しかしながら、PRBCとの接着は膜結合型ケモカインと比較して弱く、他の宿主因子の補助的因子として機能する可能性も併せて推測された。次に、②の可能性を探るため、申請者は、*Plasmodium berghei* ANKA (PbANKA)を用いたネズミマラリア脳マラリアモデルにおいて、感染前後における臓器毎のSR9種類についてmRNA発現パターンを検討した。その結果、全てのSRで感染後mRNA発現の上昇が認められたが、特にSR-AおよびMARCOについては、発現臓器に感染による特徴的なmRNA発現パターンが観察された(unpublished data)。また、*P. yoelli* 17XL (Py17XL)株と129svマウスを用いたネズミマラリア感染モデルでは、致死群と回復群において末梢血単核球の表現型が明らかに異なることを観察した(unpublished data)。血液も一つの臓器と考えるのであれば、これらの結果は、上述した臓器毎のマラリア病態形成が総合的に重症マラリア病態形成をしている、つまり臓器毎のマラリア病態形成機構は異なるとの着想に一定の正当性を与えると考えた。

2. 研究の目的、

申請者は、新たなマラリア重症化機構関連因子の同定を継続するとともに、マラリア病態形成機構の解明を最終目的として、当申請研究では、①ネズミマラリア感染モデルを利用した臓器毎のSR発現プロファイル、発現パターンの解析、②膜結合型ケモカインおよびSRに対するPRBC側リガンドの同定、③SRと協調する宿主因子の同定、④原虫側リガンドが貪食細胞に与える影響の解析、を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

1)ネズミマラリア感染モデルとして、①臓器ごとのSR発現プロファイル解析にはPbANKA-C57BL/6マウス感染系、②末梢血単核球の遺伝子発現プロファイル解析には、Py17XL-129svマウス感染系を用いた。①に関しては、

感染後、3および7日に脳、肺、脾臓、肝臓、腎臓を採取した後、SRに関してRT-PCRンパターン法により発現パターンを観察する。その後、発現パターンの変動が認められたSRに関して、定量PCRにて発現量の比較を、免疫組織化学法にて臓器内の発現部位の特定を行った。②に関して、過去の研究成果より、致死群は、Py17XL感染後7-10日目に高感染赤血球率を示す。一方回復群では比較的低い感染率で移した後、感染21-24日頃に感染率が0となり回復することが分かっている。そこで、感染7日目に50%以上の感染率を示した個体をプールして致死群、21日以降に感染率0%を示した個体をプールして回復群とした。これら群の末梢血単核球および脾臓から全RNAを回収・純度調整をした後マイクロレイにより発現遺伝子の解析を行った。

2)研究目的②、③、④に関しては、データベース検索から候補遺伝子を探索した上で、大腸菌を利用して組み換え蛋白質を作製する。作製した組み換え蛋白質をヒトマクロファージ細胞株培養液に添加し、細胞株より分泌されるサイトカインや細胞株機能を検討する。

4. 研究成果

1)ネズミマラリア感染モデルを用いた遺伝子発現プロファイルの解析：

①-1：PbANKA-C57BL/6感染モデルを用いたSR発現プロファイル解析の結果、クラスA SRの発現は、MARCOおよびSR-Aについて、感染経過に伴い肺・脾臓・肝臓で顕著な発現増強が観察された。一方、ヒト重症マラリアで重症化関連因子として有名なCD36は、感染経過による変動がほとんど観察されなかった。定量的リアルタイムPCR解析の結果、MARCOおよびSR-Aに関して、CD36と比較しても感染経過に伴い遺伝子発現が増強しており、特にMARCOはこれら臓器での遺伝子発現増強が顕著であった。免疫組織化学的解析では、MARCOの局在は、脾臓では辺縁帯マクロファージ、肝臓では肝細胞および血管内皮細胞が発現細胞として観察された。本研究の成果から、MARCOのマラリア病態形成への関与が強く示唆された。本研究結果から、感染経過および臓器によるSR発現パターンが異なることが明らかとなり、重症マラリア病態形成機構を考察する上で、マラリアの病態形成は諸臓器それぞれ独自の利用分子群があり、これらと原虫側蛋白質の組み合わせによって病態形成がなされた結果が重症マラリアであるとの新しい病態形成論を展開する一助となると考えられた。

Py17XL-129svマウス感染モデルを用いた致死群・回復群間の単核球/マクロファージ発

現遺伝子の比較解析を行った。遺伝子発現に関して、発現量が2倍以上のものを抽出した。マクロファージ表現型に関する遺伝子では、致死群において IL-4R-alpha, Ym1, RELM-alpha, IL-10 遺伝子の発現上昇が認められたことから、致死群では M2a マクロファージの誘導が推測された。一方、回復群では、M2 マクロファージに特有な IL-4R-alpha, Ym1, IL-10 遺伝子発現が低下する一方、CD209, CD163, RELM-alpha, A_{2A} 受容体, PTX3, TGF-beta 遺伝子の発現上昇が観察されたことから、M2c マクロファージの誘導が推察され、回復群ではマクロファージ表現型のスイッチが生じた可能性が示唆された。しかしながら、現在知られている M2c 型マクロファージの発現遺伝子と異なる発現遺伝子も観察されたことから、近年寄生虫感染実験で報告された新しいタイプのマクロファージである可能性も考えられたので今後の検討課題である。

致死群 vs 回復群の脾臓での発現遺伝子解析の結果、59304 遺伝子中 5893 遺伝子の発現上昇が認められ、352 遺伝子の発現低下が観察された。回復群では、CD200, CD22, SP-D, CD96, CD155 遺伝子発現上昇が認められ、B 細胞活性化および ADCC 増強が推測されるデータを確認した。また CD160, CD244, Klra, CD96, CXCL11, CCL1, CXCL1 遺伝子発現が観察されたことから、NK 細胞活性化が推察された。これらの成果より、致死群の単核球・マクロファージは M2a 型であり回復群の単核球・マクロファージはどちらかといえば M2c 型が誘導されていると考えられた。

また Py17XL-129sv 感染モデルでは、末梢血塗抹標本中で単核球による激しい感染赤血球貪食像が観察される。感染回復群の脾臓での遺伝子発現解析の結果から、B 細胞活性化および ADCC の活性化が示唆される。感染後の経過日数と併せて考察すると、Py17XL 感染からの回復機構は、B 細胞の活性化に伴う特異抗体の産生とマクロファージ活性の変化に伴う ADCC 活性の増強により、原虫感染赤血球貪食・破壊の昂進による排除が一つの機構であると推察された。また、NK 細胞活性化に関する遺伝子発現の増強も認められたことから、NK 細胞の関与による原虫感染赤血球排除機構の存在も考えられた。

以上の結果、①臓器毎で遺伝子発現パターンが異なりこれが病態に関与すること、②マクロファージ表現型を M2c 型に誘導することで治癒する方向へ誘導する可能性があること、③新しい表現型のマクロファージがマラリア原虫感染の回復期に出現する可能性があること、が明らかとなり新しいマラリア病態形成機構の仮説を提唱できる可能性が示唆された。

2) 膜結合型ケモカインおよび SR に対する PRBC 側リガンドの同定、原虫側リガンドが貪食細胞に与える影響の解析：②、③、④に関して、データベース検索の結果、PRBC 側のリガンドとして、大きく 4 種類の候補蛋白質(熱ショック蛋白質、FK506 結合蛋白質、HMGB-1、GroEL) を同定し、これら蛋白質について、大腸菌での組み換え蛋白質の作製を試みた。その結果、HMGB-1 および GroEL を除いた熱ショック蛋白質および FK506 結合蛋白質の組み換え蛋白質の作製に成功した。これら組み換え蛋白質に関しては、遅れているが現在生理活性等の確認中である。また作製が困難であった GroEL に関しては、大腸菌以外の組み換え蛋白質作製方法(無細胞系等)により現在作製中である。HMGB-1 に関しては、ラムノース誘導型の組み換え蛋白質として作製に成功し、現在生理活性を測定中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- 1) *Plasmodium berghei* 感染マウス臓器におけるスカベンジャー受容体 SRCL の発現解析 宮下大地、畑生俊光、嶋田淳子 第 48 回関東甲信地区医学検査学会、前橋、2011
- 2) 熱帯熱マラリア重症化関連宿主因子としてのスカベンジャー受容体の解析 畑生俊光 第 19 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸、2011
- 3) マラリア重症化関連宿主因子としてのスカベンジャー受容体の解析 畑生俊光、雨宮健司、宮本裕斗、嶋田淳子 第 71 回日本寄生虫学会東日本支部会、東京、2011
- 4) ネズミマラリア原虫感染マウス臓器におけるスカベンジャー受容体の遺伝子発現解析 宮下大地、畑生俊光、嶋田淳子 第 72 回日本寄生虫学会東日本支部会、前橋、2012
- 5) スカベンジャー受容体のネズミマラリア感染における臓器ごとの遺伝子発現変化の解析 宮下大地、嶋田淳子、畑生俊光 第 82 回日本寄生虫学会、東京、2013.3.29

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑生 俊光 (HATABU TOSHIMITSU)
岡山大学・大学院環境生命科学研究科・
准教授
研究者番号：60344917

(2) 研究協力者

嶋田 淳子 (SHIMADA JUNKO)
群馬大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：20211964

雨宮健司 (AMEMIYA KENJI)
群馬大学・大学院保健学研究科・大学院生

宮本裕斗 (MIYAMOTO YUTO)
群馬大学・大学院保健学研究科・大学院生

宮下大地 (MIYASHITA DAICHI)
群馬大学・大学院保健学研究科・大学院生