

平成21年5月11日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590426
 研究課題名（和文） マラリアにおけるマクロファージマンノースレセプターの機能解明
 研究課題名（英文） Role of macrophage mannose receptor in malaria
 研究代表者
 亀井 加恵子 (KAMEI KAeko)
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授
 研究者番号：00214544

研究成果の概要：

マクロファージマンノースレセプター (MR) は、マウスにおいてマラリアの重症化に関与している。その重症化機構をサイトカインの産生量に着目して検討した結果、MR は炎症性サイトカインの発現を誘導することを明らかにした。よって、MR によるマラリアの重症化機構は過剰な炎症反応の惹起であると考えられた。さらに、ブタ MR を用いて、MR と感染赤血球成分がマンノースを介して結合することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

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：(1) 感染症 (2) 寄生虫 (3) マラリア

1. 研究開始当初の背景

マクロファージマンノースレセプター (MR) は主にマクロファージや樹状細胞に発現しており、肝細胞や血管内皮細胞にも発現している。内因性、外因性分子のいずれにも親和性を示すバイファンクショナルなレクチンである。MR のシステインリッチドメインは内因性の酸性糖質を認識し、細胞接着に関与する。一方、C 型レクチンドメインは、マンノース、フコース、N-アセチルガラクトサミンに結合し、病原微生物や血清糖タンパク質のクリアランスに関与する。MR は抗原取り込みや MHC クラス II 分子への抗原

輸送、サイトカイン産生の促進などの免疫機能にも関与していることから、マラリアの病態展開において MR が関わっている可能性が考えられる。

我々は、野生型マウス C57/B6 系統 (MR^{+/+}) はげっ歯類マラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA の感染によって 7 日～10 日で死亡するのに対し、MR ノックアウトマウス C57/BL6 系統 (MR^{-/-}) は 3 週間程度まで生存することを見出した。しかし、MR^{+/+} が生存する期間において、MR^{+/+}、MR^{-/-} いずれのマウスでもパラシテミア (赤血球寄生率) には違いが見られなかった。MR^{+/+} はパラシテミアが

10%程度で死亡することから、貧血が死亡原因であるとは考えられない。また、C57/B6系統は脳性マラリアに感受性であることが知られている。したがって、MR^{+/+}は脳性マラリアによって早期に死亡したものと推定される。これらより、MRはマラリア原虫の感染には関与しないが、マラリアの重症化、特に脳性マラリアの進展に関与している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究はこれまでの知見をもとに、マラリアの病態進展におけるMRの機能解明を目指したものである。

インターフェロン γ (IFN- γ)、リンホトキシン、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)などTh-1型サイトカインは重症マラリアの進行を促進することが報告されている。一方、インターロイキン4および10といったTh-2型サイトカインは脳マラリアを抑制することが示され、Th-1型およびTh-2型サイトカインのバランスがマラリアの病態を決定する一因と考えられる。そこで、MRがマラリアの重症化に関与する機構を解明するため、MRノックアウトマウスC57/B6系統 (MR^{-/-})におけるマラリア感染時のサイトカイン産生量を解析した。

さらに、MRの作用機序を明らかにするため、MRが感染赤血球と結合するかどうかを解析し、結合するリガンド分子の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) サイトカイン産生の解析

①リアルタイムRT-PCR法による解析

マラリア原虫*P. berghei* ANKAをMRノックアウトマウスC57/B6系統 (MR^{-/-}) および野生型マウスC57/B6系統 (MR^{+/+}) に感染させ、脳を採取し、炎症を誘導する炎症性サイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12a, IL-12b) および炎症を抑制する抗炎症性サイトカイン (IL-4, IL-10) の発現量をリアルタイムPCR法によって解析した。

②ELISA法による解析

P. berghei ANKAに感染させたC57/B6系統 (MR^{+/+}) およびBalb/c系統より脾細胞を抽出し、サイトカイン産生刺激のためにマラリア原虫感染細胞と共培養した。培地に産生されるサイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12) をELISA法によって解析した。

(2) MRのリガンド分子の解析

①ブタMRの精製とMMR抗血清の調製

ブタ胎盤を1%トリトンX-100を含む緩衝液で抽出し、マンノースアガロースおよびN-アセチルグルコサミンアガロースによってブタMRを精製した。ブタMRをモルモットに

免疫し、抗血清を調製した。

②MRと感染赤血球抽出物の結合の解析

感染マウス赤血球および非感染赤血球の抽出物、コントロールとしてマンナンを96穴プレートに固定化し、ブタMRと4°Cでインキュベートした。洗浄後、抗MR抗血清、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ標識2次抗体と反応させた。オルトフェニレンジアミン基質を加え、492 nmの吸収と測定することによって、結合MRを検出した。

③レクチンプロットによる感染赤血球抽出物の結合の解析

感染赤血球および非感染赤血球をSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜にプロットした。牛血清アルブミンでブロッキングした後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識コンカナバリンAおよびUEA-1とインキュベートした。洗浄後、ECL検出キット (GEヘルスケアバイオサイエンス社) によって検出した。

4. 研究成果

(1) サイトカイン産生の解析

P. berghei ANKAに感染させたマウスC57/B6系統 (MR^{-/-}およびMR^{+/+}) の脳内の各種サイトカイン発現量をリアルタイムRT-PCRによって解析した。その結果、IL-2およびIL-4に関してはリアルタイムRT-PCRにおいて明瞭なシグナルを得ることが出来なかった。この原因として試料量が不十分だった可能性がある。C57/B6系統 (MR^{+/+}) は、感染4日目にIFN- γ のmRNA発現量がMR^{-/-}より有意に高かった。しかし、他のサイトカイン (TNF- α , IL-10, IL-12a, IL-12b) では有意な差が認められなかった。IFN- γ は炎症性T細胞 (Th1) によって産生され、マクロファージを活性化することが知られているため、MR^{+/+}マウスがマラリアで早期に死亡する原因としてIFN- γ による過剰な炎症反応である可能性が考えられる。

続いて、感染C57/B6系統 (MR^{+/+}) およびBalb/c系統より得られた脾細胞によるサイトカイン産生量をELISA法によって解析した。MR^{-/-}の個体数を揃えることが困難であったため、本実験では脳性マラリア非感受性であるBalb/c系統と感受性のC57/B6系統 (MR^{+/+}) を比較することとした。その結果、図1に示すようにIL-2, IL-4, IL-10の産生量はBALB/c系統のほうがC57/B6系統よりも多かった。IFN- γ およびTNF- α に関しては、逆にC57/B6系統の方がBALB/c系統よりも多かった。IL-12に関しては明瞭な差は認められなかった。IL-4, IL-10はTh2細胞が産生するのに対し、IFN- γ およびTNF- α はTh1細胞が産生する炎症性サイトカインである。よって、C57/B6系統MR^{+/+}が感染早期に死亡する原因として、炎症

性サイトカインによる過剰な炎症反応が考えられる。

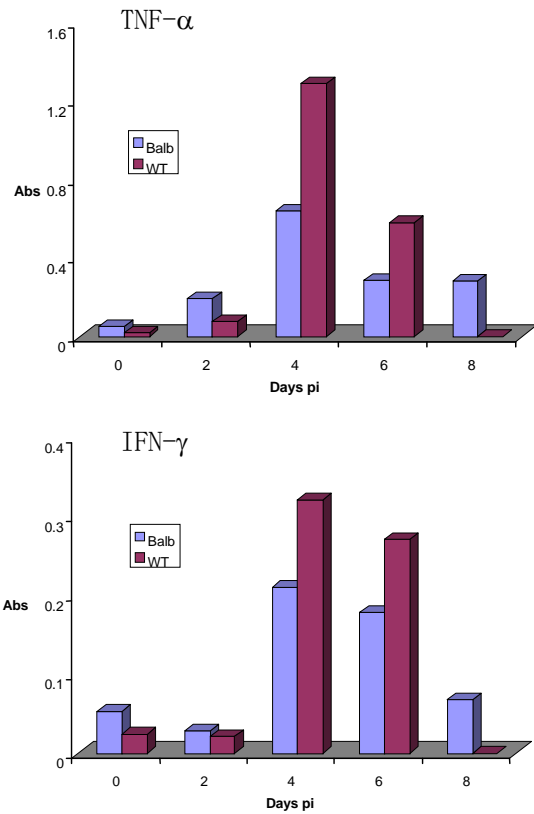
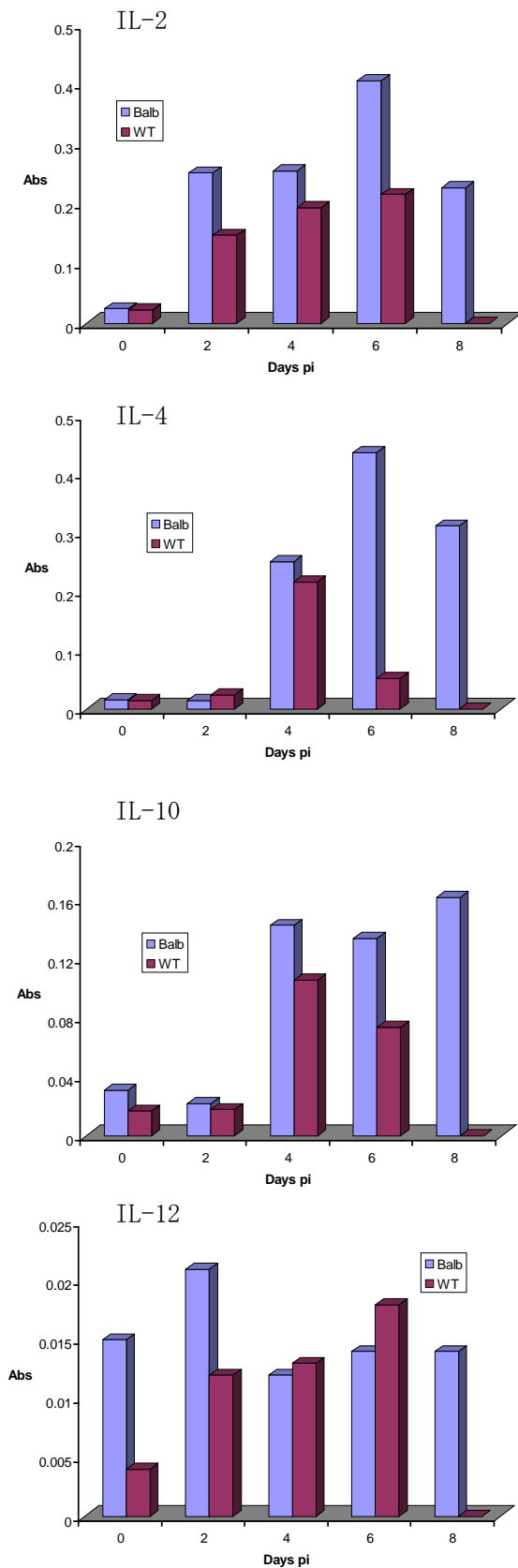


図1. 脾細胞によるサイトカイン産生量。マラリア感染マウスC57/B6 系統 (MR^{+/+}) (青色)およびBalb/c系統 (紫色)より摘出した脾細胞を感染赤血球と共培養し、培地中に産生される各種サイトカイン量をELISA法によって定量した。横軸は脾細胞を摘出した感染後日数 (0, 2, 4, 6, 8 日)を示す。

(2) MR のリガンド分子の解析

MR は外因性分子、内因性分子いずれにも結合することが知られているレクチンである。本研究ではマラリア感染赤血球が MR のリガンド分子として作用するとの仮説を立て、感染赤血球抽出物と MR との結合を解析した。

まず、ブタ MR を精製し、モルモットを免疫して MR に対する抗血清を調製した。96 穴プレートに固定化したマラリア感染マウス赤血球および非感染赤血球の抽出物をブタ MR とインキュベートし、洗浄後、抗 MR 抗血清、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ標識 2 次抗体と反応させた。オルトフェニレンジアミン基質を加え、492 nm の吸収と測定することによって、結合 MR を検出した。結果を図 2 に示す。ブタ MR は感染赤血球の抽出物と濃度依存的に結合した。一方、非感染赤血球はブタ MR と結合しなかった。これにより、マラリア感染赤血球には MR と結合する成分が含まれていることが明らかとなった。

続いて、糖を特異的に結合するレクチンを用いて同様の実験を行った。レクチンとして

マンノースを特異的に認識するコンカナバリン A およびフコースを特異的に認識する UEA-1 を用いた。図 3 に示すように、感染赤血球抽出物はコンカナバリン A に結合することが明らかになった。また、その結合はマンナンによって阻害された。一方、UAE-1 は感染赤血球抽出物とほとんど結合しなかった。これらのことから、MR と感染赤血球抽出物との結合は、MR の C 型レクチンドメインと感染赤血球のマンノースとの特異的な結合を介するものであることが示唆された。

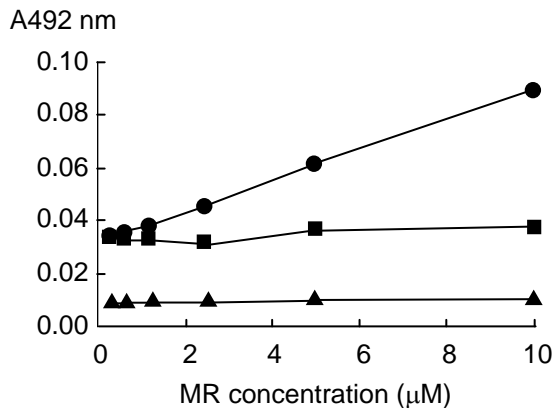


図 2. ブタ MR と感染赤血球抽出物の結合。96 穴プレートに固定した感染赤血球抽出物 (●)、非感染赤血球抽出物 (■) をブタ MR とインキュベートし、結合した MR を抗 MR 抗血清によって解析した。縦軸は 2 次抗体の標識西洋ワサビペルオキシダーゼの活性を示す。コントロールとして非固定化 96 穴プレート (▲) を用いた。

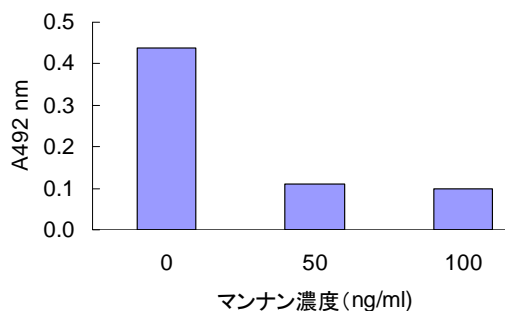


図 3. コンカナバリン A と感染赤血球抽出物の結合。縦軸はコンカナバリン A の標識に用いた西洋ワサビペルオキシダーゼの活性を示す。

MR のリガンド分子をさらに詳細に解析するため、レクチンブロッティングによる解析を行った。感染マウス赤血球および非感染マウス赤血球を SDS-PAGE 後、膜に転写し、コ

ンカナバリン A によって解析した。図 4 に示すように、コンカナバリン A と結合した 2 本のバンド (分子量約 34 kDa および 25 kDa) が明瞭に検出された。しかし、非感染赤血球ではバンドが検出されなかった。したがって、マラリア感染赤血球抽出物には、マンノースを介して MR と結合するリガンドが含まれていることが明らかとなった。

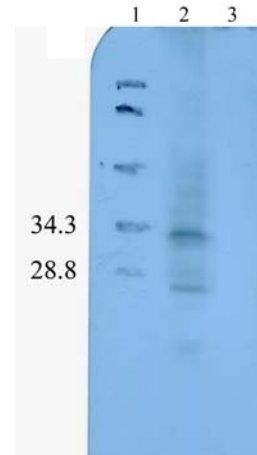


図 4. 感染マウス赤血球のレクチンブロッティング。レクチンとして西洋ワサビペルオキシダーゼ標識コンカナバリン A を用いた。1: 分子量マーカー、2: 感染赤血球、3: 非感染赤血球

MR のリガンド分子として感染赤血球あるいは原虫由来のマンノースを含むタンパク質が考えられる。マラリア原虫は N 型糖鎖を持たないことが知られている。一方、マラリア原虫は哺乳類とは構造が異なる glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーを合成し、感染赤血球膜に発現することが知られている。GPI はマウスにおいてプロ炎症性サイトカインの発現を誘導し、急性マラリアの症状を引き起こすことが報告されている¹⁾。また、*P. falciparum* の GPI はプロ炎症反応の誘導に関与しており、Toll-like receptor (TLR) 2/MyD88 経路によって宿主の細胞性免疫を惹起することが報告されている²⁾。GPI にはマンノースが含まれていることから、MR が関与するマラリアの重症化においても、GPI が MR のリガンドである可能性が高いと考えられる。

¹⁾J. Biol. Chem., 280(9), 8606-8616 (2007)

²⁾Trends Parasitol., 23(12) 596-604 (2007)

本研究結果より、MR によるマラリアの重症化機構は、炎症性のサイトカインの発現誘導による過剰な炎症反応の惹起であると考えられた。さらに、ブタ MR を用いて、MR と感

染赤血球成分がマンノースを介して結合することを明らかにした。これより、MRの活性は感染赤血球あるいは原虫そのものの成分との結合によって発揮されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1. D.T. Uyen, N. T. Huy, D. T. X. Trang, N. T. Nhien, T. Oida, K. Hirayama, S. Harada, and K. Kamei. Effects of amino acids on malarial heme crystallization. *Biol Pharm Bull.*; **31**(8), pp. 1483-1488 (2008) 査読有り

2. N. T. Huy, K. Mizunuma, K. Kaur, N. T. T. Nhien, M. Jain, D. T. Uyen, S. Harada, R. Jain, and K. Kamei; 2-tert-Butyl-8-quinolinamines exhibit potent blood schizontocidal antimalarial activity via inhibition of heme crystallization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), pp. 2842-2847 (2007) 査読有り

3. N. T. Huy, A. Maeda, D. T. Uyen, D. T. X. Trang, M. Sasai, T. Shiono, T. Oida, S. Harada, and K. Kamei: Alcohols induce beta-hematin formation via the dissociation of aggregated heme and reduction in interfacial tension of the solution. *Acta Tropica*, 101(2), pp. 130-138 (2007) 査読有り

4. Nguyen Tien Huy, Dinh Thanh Uyen, Atsushi Maeda, Dai Thi Xuan Trang, Tatsuo Oida, Shigeharu Harada, and Kaeko Kamei: Simple colorimetric inhibition assay of heme crystallization for high-throughput screening of antimalarial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), pp. 350-353 (2007) 査読有り

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

亀井 加恵子 (KAMEI KAeko)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・
准教授
研究者番号：00214544

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者