

平成22年5月20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009年度

課題番号：20790324

研究課題名（和文） マラリア原虫による自然免疫制御機構の解明

研究課題名（英文） Innate immune regulation by malaria parasites

研究代表者 Coban Cevayir (チョバン ジェヴァイア)

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授

研究者番号：00397712

研究成果の概要（和文）：

我々はマラリア原虫の粗抽出液を使って全粒子ワクチンとして有効であることを示し、その効果がトル様受容体9 (TLR9)を介したアジュバント効果によることを世界で始めて証明した。そしてそのアジュバント因子がヘモゾインであり、TLR9 に特異的に結合しその高次構造を変化させることも世界で始めて示した。さらにヘモゾインが実際にイヌのアレルギーワクチンのアジュバントとしてその効果を証明した。

研究成果の概要（英文）：

Although whole-parasite vaccine strategies for malaria infection have regained attention, their immunological mechanisms of action remain unclear. We find that immunization of mice with a crude blood stage extract of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* elicits parasite antigen-specific immune responses via Toll-like receptor (TLR) 9 and that the malarial heme-detoxification byproduct, hemozoin (HZ), but not malarial DNA, produces a potent adjuvant effect. Malarial and synthetic (s)HZ bound TLR9 directly to induce conformational changes in the receptor. The adjuvant effect of sHZ depended on its method of synthesis and particle size. Although natural HZ acts as a TLR9 ligand, the adjuvant effects of synthetic HZ are independent of TLR9 or the NLRP3-inflammasome but are dependent on MyD88. The adjuvant function of sHZ was further validated in a canine antiallergen vaccine model. Thus, HZ can influence adaptive immune responses to malaria infection and may have therapeutic value in vaccine adjuvant development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：原虫

1. 研究開始当初の背景

マラリアワクチン開発においては、マラリア原虫の複雑な生活史や抗原変異、また原虫による様々な宿主免疫逃避機構の存在など、各種の障壁が重なりその成功を拒んでいる。これらの障壁を打破するためには、マラリア感染症における宿主と原虫の複雑な相互作用を理解し、それらの分子、作用経路を有効に活用することが重要であると考えられる。マラリア感染においては自然免疫を活性化、または抑制する現象の存在が示唆されているが、実際にマラリア原虫の構成成分の何が自然免疫制御に関与しているかという観点から網羅的検索はなされていない。

また、宿主側においても原虫に対する自然免疫制御の分子レベルのメカニズムや、それらが宿主の感染防御に働くのか病原性に寄与するのかといった生理的意義は十分に解明されていない。その中でも我々はあまり解明の進んでいないマラリア原虫に対する宿主自然免疫反応に注目し、Toll様受容体を介した原虫-宿主相互作用に関する研究を進めてきた。我々は最近マラリア原虫代謝産物ヘモゾインがToll様受容体 (TLR) 9 を介して樹状細胞を活性化することを示し (Coban, C et al J. Exp. Med 2005)、その自然免疫制御が脳マラリアなどによるマラリア感染時の病態に深く関わっていることを示してきた (Coban, C et al Int. Immunol. 2007, Coban, C et al Trends in Microbiology 2007)。

2. 研究の目的

本研究では、TLR9 とヘモゾインの分子レベルでの認識機構を明らかにし、さらにマラリア原虫由来の自然免疫賦活化もしくは抑制因子を網羅的にスクリーニング、同定を目指す。また、これらの知見を基に宿主側のTLR9を含めた自然免疫関連分子群のマラリア感染における役割を生体レベルで明らかにする。また、マラリア原虫由来の物質による免疫制御機構をりょうしたワクチンアジュバントなどの開発研究もおこなう。

3. 研究の方法

宿主TLR9がマラリア原虫由来ヘモゾインをどのようにして認識しているかという命題を分子レベルで解明する。まず、① 具体的な工夫として、リコンビナントTLR蛋白を精製しマラリア原虫由来及び合成ヘモゾインとの相互作用を各種方法で解析する。できるだけ多くの解析方法を用い、実験原理など

によるバイアスを除くため、現在 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、Quartz Crystal Microbalance (QCM)、蛍光偏光解消法など実験を進め、相互作用を定量化することに成功している。これらの解析結果を踏まえTLR9とヘモゾインの直接会合、またはコファクターの同定をおこなう。

4. 研究成果

Toll様受容体もしくはそのシグナル伝達経路が実際のマラリア感染においてどのような生理的意義を有するのか原虫、宿主両方の視点から動物モデルを用いて検証した結果、TLR2, TLR9 を介してマラリア原虫成分の GPI やヘモゾインが自然免疫を賦活化し、脳マラリアに見られるようなマラリア感染病態に関与していることが示唆された。この結果は International Immunology (2007) に掲載され、マラリア感染における Toll 様受容体などを介した自然免疫反応が感染時の防御免疫のみならず病態にも関与していることを総説した論文が Trends in Microbiology (2007) に掲載された。

我々はマラリア原虫の粗抽出液を使って Whole parasite vaccine として有効であることを示し、

その効果がToll様受容体9 (Toll-like receptor (TLR) 9) を介したアジュバント効果によることを世界で始めて証明した。そしてそのアジュバント因子が、マラリア原虫が赤血球のヘモグロビンを消費した後にヘムの代謝産物として生成する、ヘモゾイン (Hemozoin (HZ)、ヘムの2量体のポリマーで、nm- μ m サイズの結晶体。マラリア毒素 (Malaria toxin) ともいう) であること、ヘモゾインがTLR9に特異的に結合し、TLR9タンパクの高次構造を変化させることも世界で始めて示した。NMR解析によりTLR9リガンドであるCpGDNA (免疫賦活化作用のある一本鎖オリゴ核酸) とヘモゾインはTLR9のシステイン、ヒスチジンを介して結合していることが判明した。

さらに、合成のヘモゾインも作成し、20-200nmのサイズのヘモゾインが最もアジュバント効果が高く、実際にイヌのアレルギーワクチンのアジュバントとしてその効果を証明した。

これらの知見は、Cell 姉妹紙の Cell Host and Microbe 2010年1月号に「Featured Article」として掲載された。

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17件)

- ① Shokouhi B, Coban C, Hasirci V, Aydin E, Dhanasingh A, Shi N, Koyama S, Akira S, Zenke M, Sechi AS. Biomedical polymers subvert dendritic cell function and adhesion through the activation of multiple Toll-like receptor signaling cascades. *Biomaterials*, 2010, in press. PEER REVIEWED.
- ② Coban C*, Horii T, Akira S, Ishii KJ. TLR9 and Endogenous Adjuvants of the Whole Blood-stage Malaria Vaccine. Review, *Expert Reviews of Vaccines*, 2010, in press. (*corresponding author) PEER REVIEWED.
- ③ Coban C*, Yagi M, Ohata K, Igari Y, Tsukui T, Horii T, Ishii KJ, Akira S. The malarial metabolite hemozoin and its potential use as a vaccine adjuvant. Review, *Allergology International*, 2010, 59 (2) in press (*corresponding author) PEER REVIEWED.
- ④ Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Science Translational Medicine*, 2010, Vol. 2, Issue 25, p. 25ra24. PEER REVIEWED.
- ⑤ Coban C, Igari Y, Yagi M, Reimer T, Koyama S, Aoshi T, Ohata K, Tsukui T, Takeshita F, Sakurai K, Ikegami T, Nakagawa A, Horii T, Nuñez G, Ishii KJ, Akira S. Immunogenicity of Whole Parasite Vaccines Against *Plasmodium falciparum* Involves Malarial Hemozoin and Host TLR9. *Cell Host and Microbe*, 2010, 7 (1) :50-61. PEER REVIEWED.
- ⑥ Coban C, Ishii KJ, Akira S. Immune interventions of human diseases through Toll-Like Receptors. Review, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2009, 655:63-80. PEER REVIEWED.
- ⑦ Reimer T, Shaw MH, Franchi L, Coban C, Ishii KJ, Akira S, Horii T, Rodriguez A, Nuñez G. Experimental Cerebral Malaria Progresses Independently of the Nlrp3 Inflammasome. *European Journal of Immunology*, 2009, 40 (3) :764-9. PEER REVIEWED.
- ⑧ Culleton R, Ndounga M, Zeyrek FY, Coban C, Casimiro PN, Takeo S, Tsuboi T, Yadava A, Carter R, Tanabe K. Evidence for the Transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, West Central Africa. *Journal of Infectious Diseases*, 2009, 200 (9) :1465-1469. PEER REVIEWED.
- ⑨ Koyama S, Coban C, Aoshi T, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity. Review, *Expert Review Vaccines*, 2009, 8 (8) :1099-1107. PEER REVIEWED.
- ⑩ Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S. Innate immune response to viral infection. Review, *Cytokine*, 2008, 43 (3) :336-341. PEER REVIEWED.
- ⑪ Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host Innate Immune Receptors: Making Sense of Microbial Infections. Review, *Cell Host and Microbe*, 2008, 3 (6) :352-363. PEER REVIEWED.
- ⑫ Coban C, Koyama S, Takeshita F, Akira S, Ishii KJ. Molecular and cellular mechanisms of DNA vaccines. Review, *Human Vaccines*, 2008, 4 (6) :453-456. PEER REVIEWED.
- ⑬ Yildiz Zeyrek F, Babaoglu A, Demirel S, Dirim Erdogan D, Ak M, Korkmaz M, Coban C. Analysis of naturally acquired antibody responses to 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1 of *Plasmodium vivax* from individuals in Sanliurfa, Turkey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008, 78 (5) :729-732. PEER REVIEWED.
- ⑭ Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, Uematsu S, Takeuchi O, Takeshita F, Coban C, Akira S. Tank-binding kinase-1

delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*, 2008, 451(7179):725-729. PEER REVIEWED.

- ⑮ Hisaeda H, Tetsutani K, Imai T, Moriya C, Tu L, Hamano S, Duan X, Chou B, Ishida H, Aramaki A, Shen J, Ishii KJ, Coban C, Akira S, Takeda K, Yasutomo K, Torii M, Himeno K. Malaria Parasites Require TLR9 Signaling for Immune Evasion by Activating Regulatory T Cells. *Journal of Immunology*, 2008, 180(4):2496-2503. PEER REVIEWED.
- ⑯ 青枝大貴、小山正平、チョバン・ジェヴァイア、石井健 「DNA ワクチンのあらたな免疫学的作用機序」*医学のあゆみ*, 227(5):387-392, 2008. 査読有
- ⑰ 小山正平、ジェバイア チョバン、審良静男、堀井 俊宏、石井健 「ウイルスワクチン用のアジュバント」*VIRUS REPORT* Vol. 5 No. 1 74-81 2008. 査読有

[学会発表] (計9件)

- ① Coban C. Immunogenicity of whole parasite vaccine against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. 第3回原虫感染免疫研究会, 2010年3月26-27日, 長崎大学・熱帯医学研究所.
- ② Coban C. Hemozoin, a malaria parasite nanocrystal: from malaria infection to vaccine adjuvant. Workshop on Current Trends in Molecular Nanobiosciences (Member of Organizing Committee), January 13th-16th, 2010, Bilkent University, Ankara, TURKEY.
- ③ Coban C. Innate immune system receptors and malaria. Winter School on Frontiers in Nanomedicine and Nanobiotechnology, January 10th-13th, 2010, Bilkent University, Ankara, TURKEY.
- ④ Coban C. Innate immune responses to malaria infection. 生化学若い研究者の会, 京都支部企画, 2009年11月28日, 京大会館.
- ⑤ Coban C. TLR9 and the ASC-inflammasome differentially mediate the inflammatory and adjuvant effects of hemozoin, a heme-metabolite of the

malaria parasite. 2009 JST-KICOS Cooperative Programme of IFRc and IVI: Regulation of Innate Immunity. International Vaccine Institute (IVI), September 18-19th, 2009, Seoul, KOREA.

- ⑥ Coban C. Host immune responses to malaria. Bogazici University Department of Molecular Biology and Genetics, August 8, 2009, Istanbul, TURKEY.
- ⑦ Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M, Kawai T, Takeuchi O, Hisaeda H, Horii T and Akira S. Pathological roles of Toll-like receptor signaling on cerebral malaria. AFRIMS, August 11, 2006, Bangkok, THAILAND.
- ⑧ Coban C, Ishii KJ, Uematsu S, Arisue N, Sato S, Yamamoto M, Kawai T, Takeuchi O, Hisaeda H, Horii T and Akira S. Pathological roles of Toll-like receptor signaling on cerebral malaria. BIOTEC, August 12, 2006, Bangkok, THAILAND.
- ⑨ Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. IMV 2nd International Conference on Immunopotentiators in Modern Vaccines, May 12, 2005, Malaga, SPAIN.

○出願状況 (計1件)

特許の名称:「新規アジュバント」出願番号:
特願 2007-285737 出願人:国立大学法人大阪大学、日本全薬工業 発明者:審良静男、石井 健、チョバン ジェヴァイア、津久井利広

[その他]

ホームページ等

<http://www.ifrec.osaka-u.ac.jp/jpn/labatory/malariaimmunology/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Coban Cevayir (チョバン ジェヴァイア)
(大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授)
研究者番号：00397712

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

審良 静男 (教授, 大阪大学免疫学フロンティア研究センター拠点長)
堀井 俊宏 (教授, 大阪大学微生物病研究所, 分子原虫学分野)
武下 文彦 (客員教授, 横浜市立大学, 微生物学 (旧細菌学)・分子生体防御学)
小山 正平 (助教, 大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学)
川越 龍方 (助教, 大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学)