

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590486

研究課題名(和文)クルーズトリパノソーマ原虫慢性感染症(シャーガス病)に対するワクチン治療モデル

研究課題名(英文)Animal model for the treatment of Chronic Chagas Disease using the combination of drug and vaccine

研究代表者

平山 謙二(Hirayama, Kenji)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：60189868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：シャーガス病慢性患者の新しい治療法創出を目的とした。慢性シャーガス病モデルとして、慢性感染マウスを用い、これに主要な3種の遺伝子をDNAワクチン(TcG1、TcG2、TcG4遺伝子とpVAX 200DEST)として投与し、その免疫防御効果を感染原虫量の変化として観察した。Y株あるいはルシフェラーゼ遺伝子導入原虫株の投与直後から3か月間の感染状況を定量PCRにより観察した。DNAワクチンの効果については明らかな防御効果を確認することが困難であった。現在ナノ粒子によりコーティングしたDNAプラスミッドを用いて免疫を行っている。イメージング技術による慢性感染の可視化が可能になったことが成果である。

研究成果の概要(英文)：To find a new strategy to treat a chronic Chagas adult patient, we tried to establish a chronic infection model with mouse and luciferase gene transfected Y strain of Trypanosoma cruzi and successfully obtain a protocol to observe the chronic status using whole body imaging system. Then we prepared the DNA vaccine using previously reported three candidate genes namely TcG1, TcG2 and TcG4 and our recently established pVAX 200DEST nano-particle adjuvant to observe that effect on the elimination of chronically infected parasites. The evaluation of the vaccines has not yet finished but the vaccination could provoke substantial immunological effect by B and T cell levels.

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：シャーガス病 ワクチン 慢性感染症 ベンズニダゾール 遺伝子導入原虫 画像解析 DNAワクチン ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

- (1) 慢性患者の治療が喫緊の課題となっている：前述したように現在でも中南米地域では特に貧困層を中心に 1600 万から 1800 万人の慢性感染者が存在し、そのうちの 3 割から半数に心不全や巨大結腸症などの合併症が発生し、重大な保健衛生問題となっている (WHO レポート 2004)。媒介昆虫であるサシガメの対策によりブラジルなどでは感染者が激減したが、そのような地域でも保有宿主を介した森林型のサイクルが保存されており、再興することが懸念されている。慢性感染者に対する治療法の開発は遅れており、治療薬として承認されているベンズニダゾールは、新生児に効果が認められるが、小児や成人の慢性患者に対する効果は弱く、薬疹などの副作用が強いことが指摘されている。
- (2) 治療薬開発は遅れている：ベンズニダゾールの副作用や効果の不確実性、さらに発がん性などにより新たな治療薬が期待されている。
- (3) ワクチン開発：細胞内寄生ステージのタンパクを標的としたワクチンの可能性が指摘され、効果的な殺原虫活性を刺激できる T 細胞防御ワクチン開発研究が活発化している。
- (4) 慢性感染症に対する免疫治療の進歩：すでにウイルス性肝炎を対象に免疫学的な排除が困難な慢性持続性感染患者を対象にワクチンと抗ウイルス剤との併用療法、あるいは免疫賦活剤との併用療法が行われ、一定の効果を挙げている。
- (5) シャーガス病の病害に関する調査結果：中南米での共同研究により、地域差はあるものの慢性期の病害が非常に大きいことが明らかになった。(del Puerto et al.2010, PLoSNTD)。
- (6) シャーガス病の合併症：拡張型心筋症や巨大結腸症を引き起こす患者の実態調査を行い自覚症状に乏しいがすでにこのような合併症の進行した患者が多数存在し、合併症の進展に遺伝素因として HLA 遺伝子の多型が関連していた。この HLA 遺伝子は主にクラス I に特徴があり、細胞障害性 CD8T 細胞の活性化がヒトの病態の決定に重要であることが強く示唆された。すなわちワクチン治療の可能性が大きい。
- (7) 樹状細胞を標的とした DNA ワクチンの

新たな投与法の開発：佐々木らが開発したナノパーティクル技術 (ナノボール) を利用してマラリア感染防御効率の高い DNA ワクチンを開発した。この技術は毒性がなく、効率よく樹状細胞へ遺伝子導入できるという利点がある。(Kurosaki et al., Biomaterials 2009) 慢性シャーガス病のような全身性の細胞内寄生原虫を標的にするワクチンに適したものであると考えられた。

(8) 患者由来の原虫株：ボリビアの現地で流行する原虫の患者由来株はいずれも II_d グループに属していた。ワクチン株も同系統が望ましい。

(9) 治療効果判定のためのイメージング：遺伝子導入をすでに行っており、蛍光遺伝子導入についても作製可能である。

(10) 流行地での治療成績：現在ボリビアの小児を対象としたベンズニダゾールによる治療プログラムの反応性の個体差について研究を企画しており、臨床研究の準備体制が現地で整いつつある。

2. 研究の目的

クルーズトリパノソーマ感染症であるシャーガス病は、毎年十万人が幼小児期に罹患しそのほとんどが治療もなく、慢性感染症へと移行する。初期 10 年程度の無症状の慢性期から約 3 割以上が拡張型心筋症や巨大結腸症を発症し若年性の心臓死や急性腹症を引き起こしている。現在新生児や 15 歳以下の小児を対象にベンズニダゾールによる治療プログラムが各地で行われているが、副作用も強く治療効果も十分ではない。本研究ではこの慢性感染症に移行した患者の新しい治療法創出を目的として基礎的な研究を行う。

1. ワクチンによる細胞内寄生病原体に対する免疫賦活効果
2. 上記ワクチン効果によるベンズニダゾール投与量の軽減

上記のワクチン治療薬組み合わせ治療法のモデルを先端的な技術 (DNA ワクチン、ナノボール、GFP 導入原虫、定量 PCR) を導入することにより作出し、臨床開発へと発展させる。

3. 研究の方法

慢性シャーガス病の治療モデルとして、慢

性感染マウス（通常の実験室原虫、ポリビアの患者由来の原虫、あるいは蛍光遺伝子を強く発現する組み換え原虫を感染）を用い、これに最近ワクチン効果が報告された TcVac2 ワクチンを含む数種の遺伝子を DNA ワクチンとして投与し、その免疫賦活効果を感染原虫量の変化として観察する。この実験系にすでにマウスの急性感染への効果が報告されているベンズニダゾール治療（Bustamante et al. Nat.Med. 2008）を組み合わせるにより、完治のための薬剤用量を減少させることができるか検討する。

(1) 慢性感染マウスの作出

- ①6週令雌の C57BL/6 マウスに細胞培養系により得られた Y、SC(ポリビア)あるいは遺伝子導入原虫のトリポマスティゴート (Trypo) 100000 個を腹腔内投与する。
- ②投与後 2 日、4 日、6 日後の尾静脈血を採血し PCR にて原虫血症を確認する。
- ③感染後 2 週、4 週、6 週、8 週目、および 12 週目の尾静脈での原虫血症を観察すると共に、観察の際に 3 頭を殺処分し、各組織の原虫の寄生状況を病理像および定量 PCR により観察する。遺伝子導入原虫の場合は、蛍光顕微鏡、FACS および蛍光画像解析（全身画像）による観察も行う。
- ④上記の感染経過を解析し、慢性感染の標準経過を確定する。

(2) ルシフェラーゼ遺伝子導入原虫の作製（上村、柳）

- ①すでに確立された相同組み換えを用いた遺伝子導入法（Pires et al. Intl.J.Parasitol. 2008）を用いて、Tulahuen 系統および SC 株にルシフェラーゼ遺伝子を導入し発現を確認する。
- ②組み換え原虫が細胞培養系で Trypo に変換できるか、さらに細胞への感染やマウスへの感染が可能であるか確認する。
- ③マウスへの感染の際に、尾静脈血での塗抹標本や FACS による定量、全身蛍光撮影、臓器ごとの直接撮影による感染の状況や感染量測定が可能であるかどうかを検討する。

(3) DNA ワクチンの調整（シュアイブ、上村、菊池、佐々木）

- ①TcVac2 ワクチンの主要抗原遺伝子の cDNA クローニング：すでに報告のある TcG1、TcG2、TcG4 遺伝子は、AY727914、

AY727915、AY727917 として登録、さらにトランスシアリダーゼ、クルジパイン、ASP2 についてもゲノムデータベースの配列を参考に、リバーズ PCR を行い、TA クローニングを行う。

②DNA ワクチンの調整：DNA ワクチン用のベクターはすでに FDA によりヒトワクチン用に承認された pVAX 200DEST を用いる（Shuaibu et al. Vaccine, 2010）。各遺伝子は調整の際にその配列を確認する。ナノボールにより 6 種の遺伝子 DNA ワクチンを個別に調整し、すでにマラリアワクチンに応用した方法を用いて、マウスに腹腔内投与し、抗体産生などを指標にワクチンとしての効率を検討する。

③各遺伝子産物であるタンパクについては、ワクチンとは独立して大腸菌の発現系で調整し、ワクチン効果の免疫学的な検討を行う。

④慢性感染マウスへの投与のために、Mock ベクターについても準備し、最終的なワクチン接種のための準備を完了する。

(4) ベンズニダゾール (Roche) による治療実験

- ①すでに報告された方法（Bustamante et al.Nat.Mad.2008）に従い、Roche 社の錠剤 100mg/Tab を粉砕し蒸留水で可溶化した溶液を 100mg/kg/day で経口投与し、20 日間連日継続する。治療成績を検討し、投与量や投与期間を調整後、ワクチンとの組み合わせ実験を行い、ワクチンの薬剤治療への影響について検討する。

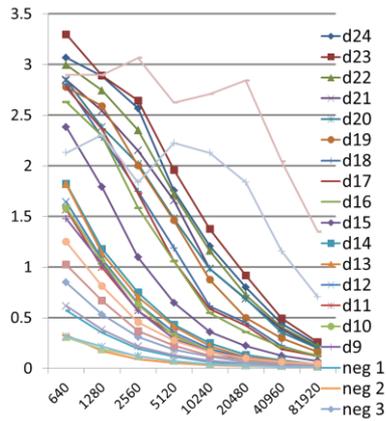
4. 研究成果

(1) 慢性感染マウスの作出

- ①C57BL/6 マウスにトリポマスティゴート (Trypo) 100000 個を腹腔内投与
感染後毎日末梢血中の原虫を観察し原虫血症は DDY マウスでは 12 日目から見られるのに対し B6 マウスでは 18 日後まで見られないことが分かった。

日数	塗抹標本	浮遊原虫
1-9	Neg	neg
10-11	Neg	B ₆ (+) DDY (-)
12	B6 (-) DDY (+)	B ₆ (+) DDY (+)
13	B6 (-) DDY (-)	B ₆ (-) DDY (-)
14	B6 (-) DDY (+)	B ₆ (+) DDY (-)

15	B6 (-) DDY (-)	B ₆ (+) DDY (+)
16-17	B6 (-) DDY (+)	B ₆ (+) DDY (+)
18	B6 (+) DDY (+)	B ₆ (+) DDY (+)
19	B6 (-) DDY (-)	B ₆ (+) DDY (+)
20	B6 (-) DDY (+)	B ₆ (+) DDY (+)
21	B6 (-) DDY (-)	B ₆ (+) DDY (+)
22-23	B6 (+) DDY (+)	B ₆ (+) DDY (+)
24	B6 (-) DDY (-)	B ₆ (-) DDY (-)



感染後の粗抗原に対する抗体価は9日後には上昇し23日まで上昇を続ける。このように感

染モデルマウスの作出条件について、ほぼ完成し、さらに感染後2週間における再現性の高いPCRによる原虫レベルの測定系を確立した。慢性感染したマウスの各臓器からDNAを抽出し、ミニサークル、染色体DNAのプライマーによる定量的なPCRを行い、心臓に局在した原虫の感染レベルを測定する系も完成した。

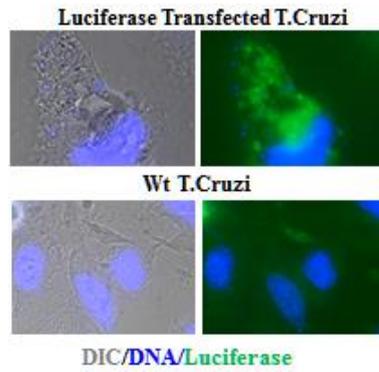
(2) ルシフェラーゼ遺伝子導入原虫作製

①すでに確立された相同組み換えを用いた遺伝子導入法を用いて、Y, Tulahuen、CLBrenner,およびML系統にルシフェラーゼ遺伝子を導入し選択マーカーであるG418により陽性の株を得た。得られた組み換え原虫について

昆虫型のepiでの強い発現

を luciferin を基質に用いるピカジーン の添加により確認した。培養により得られた Trypomastigote においても発現は見られたが、やや低下傾向が観察された。

株による相違も見られ、Y株で最も強い発現がみられた。次に線維芽細胞に侵入増殖させた amastigote での発現を顕微鏡下で観察するために、固定後 FITC 標識抗ルシフェラーゼ

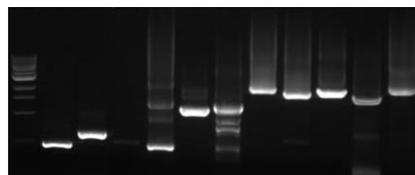


抗体で細胞内染色を行い、宿主細胞質内に分泌されたルシフェラーゼを認めることができた。

た。

(3) DNA ワクチンの調整

①TcVac2 ワクチンの主要抗原遺伝子の cDNA クローニング



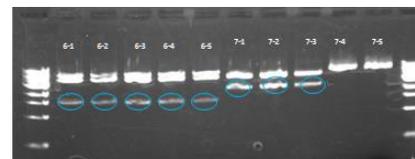
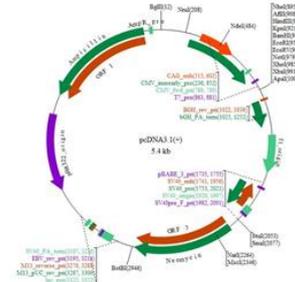
まずプライマーをデザインし、6

つの遺伝子DNAのPCR断片を原虫のcDNAより増幅した。上図の左から1= TG1(498bp); 2= TG2(660bp); 3= TG4(536bp); 4= TC24(498bp); 5= TC52(1.2kb), 6= Cruzipain (1.4kb); 7= ASP2(2kb-full); 8= ASP2 (1.8kb-partial); 9= TSA1(1.7kb); 10= ASP1(1.8kb); 11=

DNA ワクチン プラスミドとして

pcDNA3.1(+)

(図)に組み込んだ。クルジパイン遺伝子を組み込んだプラスミド



の確認実験の結果を図

に示す。

DNA ワクチンの免疫原性について以下の実験を行った。

ナノ粒子処理した各DNAワクチンを腹腔内投与し、その後の急性感染について末梢血中の原虫血症を指標に観察した。また各ワクチンの抗体価について検討した。いずれも現在のところ顕著な影響を見ていない。

(4) ベンズニダゾール (Roche) による治

療実験

上記のようにDNAワクチンによる防御効果が十分に観察できなかったため、さらにルシフェラーゼ発現原虫株によるイメージングを用いた原虫殺滅活性の測定系の確立を現在行っている。この生体観察の系ができ次第、治療薬とワクチンの相互作用の実験を行う予定である。

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 2 件)

- ① Del Puerto F, Kikuchi M, Nishizawa JE, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Gutierrez Velarde FU, Hirayama K. 21-Hydroxylase gene mutant allele CYP21A2(*)15 strongly linked to the resistant HLA haplotype B*14:02 - DRB1*01:02 in chronic Chagas disease. Hum Immunol. 2013, Jun; 74(6):783-6. doi: 10.1016/j.humimm.2013.01.023. Epub 2013 Jan 31. 査読有
- ② Del Puerto F, Nishizawa JE, Kikuchi M, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Miura S, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. Protective Human Leucocyte Antigen Haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against Chronic Chagas Disease in Bolivia. PLoS Negl Trop Dis. 2012 Mar; 6(3):e1587. Published online 2012 March 20. doi: 10.1371/journal.pntd.0001587 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Kenji Hirayama: GENETIC ANALYSIS OF CHRONIC CHAGAS DISEASE IN BOLIVIA -HOST OR PARASITE FACTOR? XLIX CONGRESS OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE, August 06th to 10th, 2013 in Campo Grande, MS, Brazil, at the Centro de Convenções Arquiteto Rubens Gil de Camilo
第 49 回ブラジル熱帯医学会年次大会招待講演 2013 年 8 月 8 日 Campo Grande, MS, Brazil, ブラジル、カンポグランデ市
- ② 平山 謙二: 淘汰圧としての熱帯感染症,

シンポジウム 7 感染症の遺伝学: ゲノムと環境の相互作用 日本人類遺伝学会第 57 回大会 平成 24 年 10 月 24 日-27 日、京王プラザホテル、東京都

(日本人類遺伝学会第 57 回大会 解析から応用へ、そして未来への飛躍 プログラム、p p 110、2012)"

③ Florencia Del Puerto Rodas, Eiki J. Nishizawa, 菊池三穂子, Yelin Roca, Luis A. Renjel, 小宮憲洋、前村浩二、平山謙二: V281L of the CYP21 gene causing 21-Hydroxylase deficiency located in the class III region of resistant HLA haplotype in the chronic Chagas disease. 第 21 回日本組織適合性学会大会, 平成 24 年 9 月 15 日-17 日、明治大学駿河台キャンパス リバティホール、東京
(日本組織適合性学会誌 MHC Vol. 19 No. 2, 2012、pp106, 2012) "

④ 平山 謙二: 熱帯感染症と HLA. 第 21 回日本組織適合性学会大会, 平成 24 年 9 月 15 日-17 日、明治大学駿河台キャンパス リバティホール、東京
(日本組織適合性学会誌 MHC Vol. 19 No. 2, 2012、pp61, 2012)

⑤ Ramona F. del Puerto Rodas, Kenji Hirayama et al. No Correlation Between Trypanosoma cruzi Level and Clinical Manifestation in a Cross Sectional Study on Chronic Patients in Bolivia. 60th ASTMH Annual Meeting, Dec 4-8 2011, Philadelphia Marriott Downtown, Philadelphia, PA, USA. (Am J Trop Med Hyg, Vol. 85 Dec 2011 Number 6 Supplement; American Society of Tropical Medicine and Hygiene 60th Annual Meeting Program: LB2276)

⑥ Florencia del Puerto Rodas, Juan Eiki Nishizawa, Mihoko Kikuchi, Naomi Iihoshi, Yelin Roca, Cinthia Avilas, Alberto Gianella, Javier Lora, Freddy Udalrico. Gutierrez. Velarde, Luis Alberto. Renjel, Sachio Miura, Hiroo Higo, Norihiro Komita. Kouji Maemura, Michio Yasunami, and Kenji Hirayama: Immunogenetic analysis of chronic Chagas disease in Bolivia. 第 20 回日本組織適合性学会大会、ツインメッセ静岡 北館および中央棟、静岡、2011 年

8月28日—30日(日本組織適合性学会誌MHC、
Vol. 18 No. 2, 2011、pp152. 2011)

⑦Puerto Florencia del、Nishizawa Juan Eiki、
菊池 三穂子、Iihoshi Naomi、Roca Yelin、
Avilas Cinthia、Gianella Alberto、Lora Javier、
Velarde Freddy Udalrico Gutierrez、Renjel Luis
Alberto、三浦 左千夫、肥後 広雄、小宮 憲
洋、前村 浩二、安波 道郎、平山謙二；
Quantification of Trypanosoma cruzi parasitemia
in peripheral blood of Chronic Chagasic patients
in Bolivia using real time PCR. 第80回日本寄
生虫学会大会、東京慈恵会医科大学、東京、
2011年7月17日—18日(第80回日本寄
生虫学会大会・第22回日本臨床寄生虫学会大
会 プログラム・抄録集、pp72. 2011)

[図書] (計 6件)

①藤田 紘一郎、平山謙二著、医動物学 臨床
検査学第2版、2014年1月10日発行 医歯薬
学出版株式会社 pp.1-142

②平山謙二：コメント、心疾患や消化器疾患
の原因が寄生原虫だった!?, トレンドビュー
③シャーガス病を知っていますか?, 日経メ
ディカルオンライン、2013年9月20日

③平山謙二:5.シャーガス病, 特集 世界に広
がるトロピカルディジェーズ、化学療法の領
域、Vol.29、No.8、pp60-68.,株式会社 医薬ジ
ャーナル社、2013年8月号,(2013年7月25
日発刊)

④藤田 紘一郎、平山 謙二 著者:臨床検査学
講座 第2版 医動物学、2012年10月20日、
医歯薬出版株式会社 pp.1-142

⑤平山謙二: 熱帯医学と感染症, 感染症事
典、pp35-49, 医学書院, 編集;感染症事典編集
委員会, 2012, (2012年1月10日発刊)

⑥平山謙二: 感染症とは、感染症事典、pp1-34.,
医学書院, 編集;感染症事典編集委員会, 2012,
(2012年1月10日発刊)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/hiraken/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 謙二 (HIRAYAMA Kenji)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 60189868

(2)研究分担者

菊池 三穂子 (KIKUCHI Mihoko)
長崎大学・熱帯医学研究所・講師
研究者番号: 40336186

シュアイブ モハマッドナシル
(SHUAIBU, Mohammed Nasir)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (H25.6
まで)
研究者番号: 30535745

柳 哲雄(YANAGI Tetsuo)
長崎大学・熱帯医学研究所・助手
研究者番号: 10174541

上村 春樹(UEMURA Haruki)
長崎大学・熱帯医学研究所・講師
研究者番号: 60184975