

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24406012

研究課題名(和文) 三日熱マalaria原虫感染赤血球表面分子に対する血清疫学

研究課題名(英文) Seroepidemiology of the molecules expressed on the Plasmodium vivax-infected erythrocyte surface

研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、重症化との関与が示唆されている、三日熱マalaria原虫感染赤血球表面に発現するリガンド候補分子PvSTPとVIRについて、東南アジアの三日熱マalaria感染患者の血液中の抗体価と発熱・原虫寄生率との関連を検討した。PvSTP2とVirAに対する抗体価は、メロゾイト表面抗原MSP1-19kDよりも著しく低いものの、三日熱マalaria原虫に対する暴露に伴い増加することが示唆された。また、VirCとVirF、および、PvSTP2とVirAはそれぞれ似たパターンで宿主抗体を誘導していることが分かった。各抗VIR抗体価と発熱・原虫寄生率との間に相関はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Plasmodium vivax expresses several hundreds of proteins on the infected erythrocyte surface, such as VIR protein family, which is proposed to be responsible for the disease severity. However, humoral immunity against these antigens were not understood well. In this study, we examined antibody responses against a panel of VIR. Recombinant proteins were produced for 4 types of VIR (VirA, VirC, VirF, and Vir18) as well as the extracellular cysteine-rich domain of PvSTP2 (PvSTP2-CRD) and 19-kD region of merozoite surface protein 1 (PvMSP1-19kD). Plasma collected from Vivax patients in Southeast Asia were analyzed. The reactivity against all recombinant VIR was much lower than the PvMSP1-19kD. The reactivity pattern is similar between VirC and VirF, and between PvSTP2 and VirA, suggesting that they induce host response independently as groups. No correlation between antibody titre/reactivity against VIR and fever/parasitemia was observed.

研究分野：寄生虫学

キーワード：感染症 マalaria 血清疫学

1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界中で年間 2 - 3 億人の感染者、150 万人の死者を出す重大な感染症である。最も重篤な症状を起こす熱帯熱マラリア原虫に比べて、死亡率が高くない三日熱マラリアは、優先度が低く見られがちであるが、実際は、他の感染症との合併による間接的な死亡や体力低下に伴った生産性の低下による経済的損失が多めで、東南アジアを中心に大きな問題となっている。マラリア原虫はヒト体内では赤血球内で増殖するが、熱帯熱マラリア原虫は感染した赤血球の表面に原虫由来の接着リガンドを発現し、脳の末梢血管内壁に接着することで脳症状を起こし、ヒトを死に至らしめる。さらに、熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球は血管内皮に接着するだけでなく、非感染正常赤血球にも接着し(ロゼット形成)病原性を高める。そのため、熱帯熱マラリアでは感染赤血球表面分子 PfEMP1 を標的として病原性を抑制するワクチンの開発が試みられている。一方、最近になり、従来は良性と考えられてきた三日熱マラリア原虫により、肺水腫や胎盤での集積による流産などの重篤な症状が引き起こされているという報告が相次いでなされ、その病原性発現に三日熱マラリア原虫感染赤血球のロゼット形成や細胞接着が関与していると提唱されてきている。しかし、その詳細はあきらかでない。

代表者らは熱帯熱マラリア原虫の感染赤血球表面に発現している SURFIN という新規リガンド候補分子を見出し、三日熱マラリア原虫にも PvSTP と呼ばれる SURFIN の相同体が最低 2 種類 (PvSTP1 と PvSTP2) 存在することを明らかにした。さらに、三日熱マラリア原虫においては、PvSTP の細胞外領域が VIR と呼ばれる感染赤血球表面分子に進化していたことも見いだした (Winter G et al. 2005)。PvSTP1 の細胞外領域は非常に多型であるが大きくは 2 型に分けられること (SalI 型と non-SalI 型)、また、宿主免疫によると思われる正の選択圧がかかっていること (Zhu et al., unpublished)、PvSTP2 は感染赤血球膜上に点状の局在を示すこと (Sungkapong et al. unpublished) 等を明らかにした。タイの三日熱マラリア感染患者 70 名の血清について、PvSTP1 と PvSTP2 の組換えタンパク質に対する反応性を調べたところ、半数以上がいずれかに対する抗体を保有し、PvSTP1 と PvSTP2 のそれぞれに対して特異的な抗体が存在していることを報告した (Sungkapong et al. 2011)。しかし、これらの解析には患者情報を含まないストック血清を多く使用したため、病勢との関連性について十分な解析を行うことができなかった。

熱帯熱マラリア原虫では感染赤血球表面に発現している分子が宿主免疫の主たる標的で、重症化を規定する PfEMP1 の型もわか

ってきており、それらの阻害により重症化を抑える研究が進んでいる。そのため、PvSTP や PvSTP から進化した VIR が三日熱マラリア原虫感染の重症化を抑制する標的となりうると考え、血清疫学により、PvSTP/VIR に対する特異抗体の有無および抗体価と原虫感染率や熱との関連性を検討することで、重要な型を見出すことができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、三日熱マラリア原虫感染赤血球表面に発現しているリガンド候補分子 PvSTP と VIR について、型特異的抗体の有無、型特異的抗体および抗体価と患者臨床情報との関連性を解析し、これらの分子に対するヒト抗体応答および病原性への関与の有無をあきらかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

【組換えタンパク質】

PvSTP と VIR の代表型の組換えタンパク質を作製するため、ミャンマーの患者由来三日熱マラリア原虫 DNA より、標的分子を PCR 増幅した。組換えタンパク質発現ベクターに組み込み、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系にて Glutathione S-transferase (GST) との融合組換えタンパク質として発現し、グルタチオンカラムにて精製後、GST と組換えタンパク質の間にあるタンパク質切断酵素認識部位をタンパク質切断酵素にて切断した。GST との切断後にタンパク質の精製が困難である場合には、GST 融合タンパク質として解析を行った。

【患者サンプル採取】

三日熱マラリア患者血清は、海外共同研究者の協力のもと、タイとミャンマー、大韓民国のマラリア流行地において患者の同意を得た後に採取した。コントロールとして大韓民国のマラリア非感染健康者の血清を用いた。

【ELISA およびプロテインアレイ】

タイの三日熱マラリア患者血清については 96 穴プレートによる ELISA を行った。ミャンマーと大韓民国の患者血清についてはプロテインアレイを作製して計測した。

4. 研究成果

【組換えタンパク質の作製】

PvSTP1 の SalI 型と non-SalI 型、PvSTP2 については SalI 型に加えて、2 種類の non-SalI 型の細胞外領域の結合領域と考えられているシステイン豊富領域 (Cysteine-rich domain, CRD) の組換えタンパク質 (SalI, non-SalI, PVJ1 型) を作製

した。VIR の代表的な型のうち、A-type および B-type、C-type、F-type および Vir18-type の 5 種類について細胞外領域を組換えタンパク質として発現した。VirA、VirC、VirF、Vir18、PvSTP2-CRD (PVJ1)は GST と切断しても可溶性が高く、十分量のタンパク質が精製できたため、GST を除いたのちに評価に用いた。その他の 5 種類の組換えタンパク質は GST を切断すると精製が困難であったため GST 融合タンパク質として評価に用いた。ネガティブコントロールとして GST 組換えタンパク質を、ポジティブコントロールとして抗原性が高いことが知られているメロゾイト表面抗原 PvMSP1 の 19 kDa 領域(GST とは融合していない)を用いた。

【タイの三日熱マラリア患者標本における解析】

タイ・カンボジア国境地域にある拠点病院を訪れ、マラリア患者からの原虫試料採集の交渉を行い、原虫標本の採取をおこなったが、標本収集率が非常に悪かった。そのため、タイ・ミャンマー国境近辺地区に場所を変更して採集を行ったが充分数の検体をそろえることができなかった。集めた血清については組換えタンパク質に対する抗体価を検討したが、コントロールの GST に対しても高い反応がみられた。問題が多く発生したため、3 年次からミャンマーにおいてマラリア患者標本の採取を行い、GST に対する反応性も含めて新たに検討し直すこととした。

【ミャンマーの三日熱マラリア患者標本における解析】

当初の予定に加えて、タイの隣国でマラリア患者数が多いミャンマーのサンプルを追加して解析を行った。検出方法も 96 穴プレートを用いた ELISA 法ではなく、抗原量と血清希釈程度を最適化したプロテインアレイを用い、より注意深く行った。ところが、ミャンマーにて採取した三日熱マラリア患者血清 90 標本についてもタイのマラリア患者同様に GST に対して反応がみられた。今回使用した組換え GST タンパク質は、多くの組換えタンパク質発現システムで用いられている日本住血吸虫由来の配列を用いている。近年、タイでもミャンマーでも日本住血吸虫症例の報告はないが、隣国のカンボジアとラオスからは 2014 年にも報告されている(Weekly epidemiological record, WHO, 2016)。そのため、近年、日本住血吸虫症例の報告がない大韓民国の三日熱マラリア患者血清を用いて検討したが、同様に GST に対する反応がみられた。この反応はマラリア非感染コントロール群血清では見られないため、マラリア感染そのもの、もしくは、非衛生的な環境で感染した病原体等により GST を認識する抗体が産生されたといった可能性が考えられるが、詳細は不明である。

上述した理由により、GST を除いた組換えタンパク質のみで解析を行ったところ、非感染群コントロールと比較して、ミャンマーの三日熱マラリア患者では VirA、VirC、VirF、Vir18 のすべてに対して有意に高い抗体価を示したが、抗原性が高いことが知られている PvMSP1-19kD と比較すると著しく低かった。また、VirC と VirF には、タイの三日熱マラリア患者血清中に抗体があることが分かっている PvSTP2 と同程度の反応がみられたが、VIR-A と VIR-18 に対する反応はより低かった。この結果は、赤血球表面に発現し、ヒト免疫に暴露している時期が長期にわたるため、VIR に対して三日熱マラリア患者は高い抗体価を示すのではないかとこの予想とは異なっていた。

各組換えタンパク質に対する抗体価と原虫寄生率および体温との相関はコントロールの PvMSP1-19kD を含めて見られなかった。

一方、VirF に対する抗体価と VirC に対する抗体価の間で有意な強い相関がみられた。VirF と VirC の間ではアミノ酸は 12%しか保存していないため、交差反応とは考えにくい。一部の Vir ではグループとしてエピジェネティックに転写・発現が調整されていることが報告されているが VirF と VirC は同時に発現の ON-OFF が切り替わっている可能性がある。また、同様に相同性が低い PvSTP2-CRD と VirA の間にも有意な強い相関が見られたことから、PvSTP2 と VirA は VirC/VirF とは異なる時期に、かつ、同時に発現している可能性がある。PvSTP2-CRD と VirA に対する抗体価は PvMSP1-19kD に対する抗体価とも有意に相関していた。PvMSP1-19kD のアミノ酸配列は原虫株間で比較的保存されており、三日熱マラリア原虫への暴露歴を反映していると考えられている。そのため、PvSTP2-CRD と VirA は VirC/VirF よりも転写・発現される頻度が高く、三日熱マラリア原虫感染の度合いに応じて暴露の度合いも増加しているのかもしれない。(金子ら、第 56 回日本熱帯医学会大会にて成果の一部を口頭発表、2015 年 12 月 4-6 日; 論文投稿準備中)

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Kaneko O, Fauzi M, Han JH, Sungkapong T, Gitaka JN, Takashima E, Tsuboi T, Yahata K, Ha KS, Han ET. Antigenicity of the *P. vivax*-encoded proteins expressed on the parasite-infected red blood cell. 第 56 回日本熱帯医学会大会 大阪大学コンベンシ

ョンセンター(大阪府吹田市)(2015 Dec 4-6)

- (2) Sungkapong T, Kaewthamasorn, Yahata K, Chotivanich K, Kaneko O. Characterization of *Plasmodium vivax* subtelomeric transmembrane protein 第4回感染症若手フォーラム アテナ海月(兵庫県淡路市)(2015 Sep 6-8)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 修 (KANEKO, Osamu)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 50325370

(2) 連携研究者

矢幡 一英 (YAHATA, Kazuhide)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 40467965

坪井 敬文 (TSUBOI, Takafumi)
愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授
研究者番号: 00188616

(3) 研究協力者

麻田 正仁 (ASADA, Masahito)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教

SUNGKAPONG, Tippawan
タイ王国・ナレスワン大学・健康科学部・助手

HAN, Eun-Taek
大韓民国・江原大学・医学部・教授