

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： マラリア感染成立の分子基盤の解明と新たな感染阻止法の創出

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

鎮西 康雄 (三重大学大学院医学系研究科 客員教授)

主たる共同研究者

油田 正夫 (三重大学大学院医学系研究科 教授)

石野 智子 (三重大学大学院医学系研究科 助教)

岩永 史朗 (鳥取大学医学部 講師)

3. 研究内容及び成果

マラリア原虫の肝臓感染ステージであるスポロゾイトと肝内型原虫に着目して、その感染と増殖の機構を明らかにし、それをベースとした新たな感染阻止法を開発することを目的としている。肝臓感染に関わる遺伝子を同定するため、各感染ステージのESTデータベースを構築し肝臓感染ステージに特異的に発現する遺伝子を選択し、遺伝子欠損原虫を作出して機能解析を行った。この結果、蚊の吸血から肝細胞感染に至る過程で必須な多くの分子を同定することに成功した。特にスポロゾイトの細胞通過能とそれに関与する原虫分子が感染の成立に重要な役割を持つことを明らかにすることができた。またスポロゾイトによる肝細胞の認識に関与する複数の分子を明らかにした。これらの成果により、これまでほとんど未解明であった「肝臓感染成立の分子機構」の一端を解明した。また、これらのうちいくつかの分子についてモノクローナル抗体の受動免疫により、感染阻止が可能であることを示した。新たに発見された原虫分子は感染阻止のための標的分子として有望であり、今後この成果をもとに感染防御法の開発を進めることができる。

(1) マラリア原虫の肝臓感染の経路とそれに関わる分子の同定

スポロゾイトが肝臓に感染するために、「細胞通過」能が決定的な役割を果たしていることを明らかにした。「細胞通過」は、スポロゾイトが皮膚の内部を通過し循環系に入る過程、および肝類洞から肝類洞壁を越えて肝実質へ侵入する過程、という2つの独立した感染過程でそれぞれ重要な役割を果たすことを明らかにした。スポロゾイトは障害となる皮膚の細胞内を通り抜け血管に到達すること、細胞通過能を欠いたこれらの原虫ではこの過程で感染効率が数十分の一に低下することを示した。循環系に侵入し血流に乗って肝類洞に到達したスポロゾイトは肝類洞から肝実質へ侵入するさいに Kupffer 細胞を通過していることを証明した。細胞通過能を欠いた原虫ではこの過程で感染効率が 1/30 に低下した。この2つの異なる過程で感染効率がそれぞれ低下し、細胞通過能を欠いた原虫の肝臓への感染性は結局 1000 分の1以下になり、事実上蚊からの感染が不可能になった。以上の結果は通過に関わる分子を標的とした感染阻止が可能であることを示唆している。細胞通過には3種類の原虫蛋白質 (SPECT, SPECT2, CeITOS) が必須であった。これらの分子はマイクロネームと呼ばれる分泌性小胞に蓄えられ、宿主細胞への侵入時に原虫から放出されると考えられる。

(2) 肝実質細胞への感染機構の解明

肝実質に到達したスポロゾイトは次に肝細胞に寄生する。この肝実質細胞の特異的認識に関

わる3種の蛋白質 (Pbs36, Pbs36p, Pbs41)を同定した。Pbs36p, Pbs41 は GPI アンカーを有し原虫の細胞表面に提示される蛋白質と考えられる。これらの分子を欠いた原虫は、肝実質細胞に遭遇しても、それを障害物として「通り抜けて」しまう。すなわち肝細胞を認識し寄生にコミットすることができない。これら3種の分子は肝細胞感染に特異的に関わる事が明らかになった初めての原虫蛋白質である。ノックアウト原虫は肝臓への感染性が約 1/1000 以下に減少する。細胞通過に關与する蛋白質とともに、感染阻止の標的として有望である。

(3) 肝実質細胞内での増殖とそれにかかわる分子の解析

スポロゾイトは肝実質細胞に侵入すると、寄生胞を形成し数千の赤血球感染型原虫 (メロゾイト)へと発育分化し、血中に放たれ マラリア 病態をひき起こす。したがって、肝細胞でのメロゾイトへの増殖は、マラリア伝播の成立に極めて重要なステップである。またこのステージは、唯一細胞性免疫による感染阻止が可能なステージである。しかしながら、宿主と原虫の相互作用、肝内原虫が発現する蛋白質など、その分子基盤は全く明らかにされてこなかった。そこでまず肝内型原虫精製法を確立し、感染肝細胞内での原虫の遺伝子発現を解析し、EST データベースを構築した。肝細胞内ステージで特異的に発現する遺伝子を同定し、その遺伝子欠損原虫を作製して表現型を解析し、肝臓内寄生に必要な原虫蛋白質として、LS1, LS2 の2つの分子を同定した。両者は共に肝内型原虫の寄生胞内に局在しており、これらの蛋白質を欠く原虫の感染性は1/10 以下に低下し、肝実質細胞内での感染の維持に重要な働きをしていることが明らかになった。この研究は今後、マラリア原虫と宿主細胞の相互作用、すなわち肝細胞寄生の分子基盤を解明するための基礎データを提供する。またこのステージを標的としたマラリアワクチンの開発にも資するものと期待される。

(4) 肝臓感染にかかわる分子を標的とした感染阻止

以上の結果をもとに、同定した原虫蛋白質 (SPECT, CeITOS, Pbs36, Pbs36p, Pbs41) に対するモノクローナル抗体を作製し、抗体による感染阻止効果を調べた。作製した抗体のうち、CeITOS を除く全ての抗原に対し、マウスへの受動免疫により約10倍から100倍の感染阻止効果を持つ抗体が得られた。これらの抗体はすべて *in vitro* ではスポロゾイトの細胞侵入を阻止せず、従って宿主の免疫系の内においてのみ阻止効果を持った。これまで肝臓感染ステージで感染阻止効果が報告されているものは、circum-sporozoite protein に対する抗体のみであった。本研究により新たに同定された多数の抗原分子がワクチン候補として有望であることを示した。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

マラリア感染成立過程のうち、sporozoiteの段階に關与する多くの分子とその機能を明らかにした点は高く評価できる。特にSPECT2やPbs36Pはワクチンの標的分子として有望であり、今後の発展が期待できる。マラリア感染に必要な分子の同定では成果をあげたが、感染阻止法に關する研究進展は遅れている。本推進事業によると考えられる外部発表論文が少ない。

これらの研究成果は、論文発表(海外10件、国内1件)、総説(2件)、口頭発表(海外15件、国内20件)として発表されている。Proc Natl Acad Sci USA 1件を初め、Microbiol. 2件など、この分野では国際的に評価の高い学会誌等に発表された。また、ゴードンカンファレンスの招待講演や国際寄生虫学会などの国際会議で研究成果を発表している。特許は、ワクチン候補になる原虫分子について国際特許を1件取得している。

下記はその中で特筆すべきものである。

- 1) マラリア感染過程のうち、蚊の吸血から肝臓感染にかかわる経路を明らかにした。
- 2) これらの経路において、原虫は皮膚の細胞とクッパー細胞を通過するが、この細胞通過に必須の分子 (SPECT, SPECT2, CeITOS) を同定した。
- 3) 肝実質細胞に寄生するために必須の分子 (Pbs36, Pbs36p, Pbs41)、肝内型原虫の増殖分化にかかわる分子 (LSP1,2) を同定した。
- 4) 肝細胞への感染に必須の分子 (SPECT, CeITOS, Pbs36, Pbs36p, Pbs41) が、感染防御免疫を誘導する可能性を示した。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

マラリア感染成立過程のうち、肝臓感染ステージであるスポロゾイトに着目し、その肝臓感染に関わる分子を同定し、感染の機構を明らかにした点は高く評価できる。我が国ではマラリア感染の分子機構の解析者が少なく、研究領域のリーダーとしてマラリア生物学の発展に貢献した。

この研究で同定した肝細胞感染に必須の重要な機能分子は、抗マラリアワクチンの標的としてワクチン開発への可能性が期待できることが示された。薬剤耐性原虫の出現や殺虫剤抵抗性の媒介蚊が出現し、対策には困難を極め、マラリア感染が拡大する中で、ワクチン開発に期待が寄せられている。本研究は、新しいマラリアワクチンの開発に向けた基盤づくりに貢献した。

4 - 3 . その他の特記事項 (受賞歴など)

研究分担者の油田正夫は2007年12月三重大学医学部教授に、また研究協力者の岩永史朗は2007年4月鳥取大学医学部講師に就任した。博士研究員の伊澤晴彦は2004年厚生省感染症研究所昆虫医科学部研究員に、また石野智子は2005年三重大学医学部の助手(助教)に、狩生徹は2006年熊本大学薬学部助教に採用された。

研究代表者鎮西康雄は2007年3月読売東海医学賞(読売新聞社)、研究協力者石野智子は2007年4月日本寄生虫学若手奨励賞(日本寄生虫学会)を受賞した。