

「免疫難病・感染症等の先進医療技術」

平成14年度採択研究代表者

鎮西 康雄

(三重大学医学部 教授)

## 「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」

### 1. 研究実施の概要

マラリアは毎年数億人が感染し数百万人が死亡する、世界で最も重要な感染症の一つである。薬剤耐性原虫や殺虫剤抵抗性媒介蚊が広がるなかその対策は困難を極めている。マラリアの制御のための基礎研究として、マラリア原虫の肝臓への感染を中心とした宿主細胞感染機構に着目した。解析方法として逆遺伝学的手法を導入し、EST解析と遺伝子ノックアウト原虫を用いて感染に必須の分子を複数同定した。それらの分子の機能を解析することで、原虫の宿主細胞感染の機構に迫っている。特に血流に乗って肝臓に達した原虫はクッパー細胞を通過して肝細胞に達することを初めて明らかにした。今後更に関連する分子の同定を行い、宿主細胞感染機構を解明し、関連する分子を利用した新しい感染阻止法の創出を目指す。

### 2. 研究実施内容

#### (目的)

マラリアコントロールのための基礎的研究として、マラリア原虫のスポロゾイトの肝臓への感染を中心とした宿主細胞感染機構に着目した。スポロゾイトは蚊から人への感染に関わる重要なステージで、医学的にも生物学的にも興味深い対象である。しかし、これまで材料としての扱いにくさのために十分には研究されて来なかった。当課題では原虫の宿主細胞感染にかかわる分子を同定し機能を解析して、宿主細胞感染の分子機構を解明すると共に、感染阻止ワクチン分子を創出するのが目的である。

#### (方法)

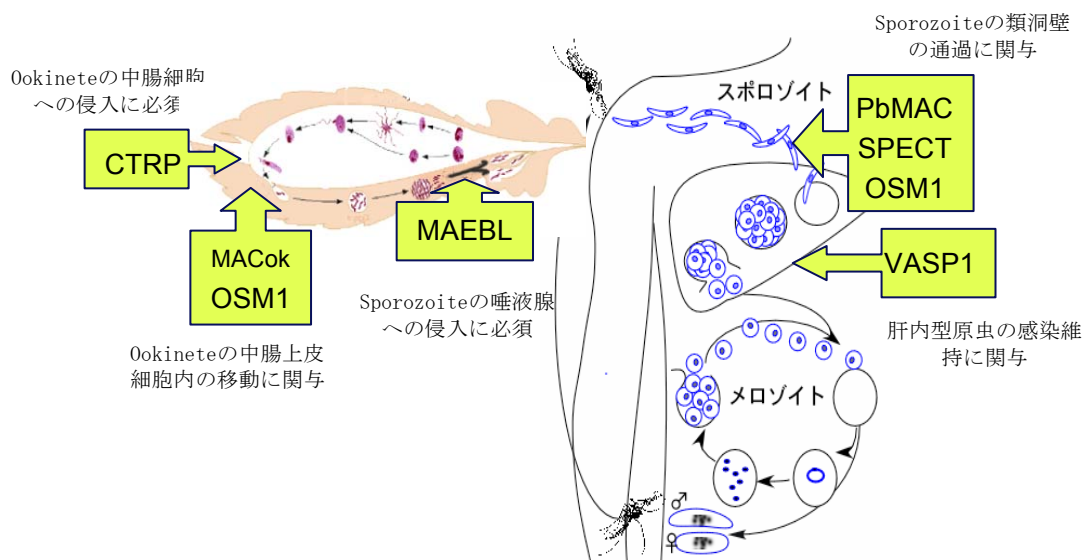
モデル動物としてネズミマラリアを用い、原虫の生活環の中で宿主細胞に感染寄生するステージすなわち、①オオキネート（媒介蚊中腸細胞に感染）、②中腸スポロゾイト（唾液腺細胞に感染）、③唾液腺スポロゾイト（肝細胞に感染）④肝内型原虫（肝臓での増殖と赤血球への感染）の4つのステージの原虫を調整し、そこで発現している遺伝子の網羅的な解析を行って、EST(expressed sequence tags)データベースを構築した。これらの中から、ヒトゲノムに相同体があり、感染に関わる特性を備えていると考えられる遺伝子を

選定し、薬剤耐性遺伝子の標的遺伝子への相同組み替えによってこれらの遺伝子をノックアウトした原虫を作成しクローン化した。遺伝子ノックアウト原虫を感染したマウス、媒介ハマダラカ体内での動向を詳細に検討することによって、遺伝子機能を解析した。またこれらの遺伝子の原虫内局在を免疫電顕によって明らかにした。

遺伝子を選定し、薬剤耐性遺伝子の標的遺伝子への相同組み替えによってこれらの遺伝子をノックアウトした原虫を作成しクローン化した。遺伝子ノックアウト原虫を感染したマウス、媒介ハマダラカ体内での動向を詳細に検討することによって、遺伝子機能を解析した。またこれらの遺伝子の原虫内局在を免疫電顕によって明らかにした。

(結果)

- (1) オオキネートのマラリア媒介蚊中腸細胞への接着と侵入に必須の分子としてCTRPを同定した。
- (2) オオキネートの媒介蚊中腸上皮細胞内の移動に関する分子として MACok と OSM1 を同定した。
- (3) スポロゾイトのハマダラカ唾液腺への侵入に必須の分子 MAEBL を同定した。
- (4) スポロゾイトの肝臓類洞壁の通過に関する分子として PbMAC, SPECT, OSM1を同定した。
- (5) 肝内型原虫の感染維持に関する分子 VASP1 を同定した。



- (6) 血流に乗って肝臓の類洞に達した原虫は類洞壁を通過して肝細胞に達し、寄生する。この研究によって、原虫は類洞壁のクッパー細胞を通過することを初めて明らかにした。
- (7) 原虫が宿主細胞への侵入と移動に関わる機構は中腸上皮と肝臓のクッパー細胞で類似の機構があることがわかった。移動に関わると考えられる分子としてのOSM1は共通分

子であるし、MACok およびPbMACについては共にMAC/PFドメインを持つ相同な分子である。

#### (考察と結論)

逆遺伝学的方法で、cDNAの網羅的解析、EST データベース構築、遺伝子ノックアウト原虫の作成によって遺伝子機能の解析を進め、非常に効率よく感染に必須の分子を多数同定することができた。我々は日本では唯一原虫遺伝子のノックアウト技術をすでに確立しており(JEM, 90:1711, 1999)、この研究は我々独自の特色ある研究である。ヒトマラリアの全ゲノム解析が2002年に公表されこれらが有効に利用できたこともこの研究にとっては有利であった。ポストゲノムの研究として相応しい。

肝臓に達した原虫が様々な障壁(バリアー)を通過して肝細胞に達するが、そのルートは明らかでなかった。この研究で初めて、クッパー細胞を通過していることを明らかにした意義は大きい。また、宿主細胞への感染に関わって重要な多くの分子が同定でき、感染機構の一端を明らかにできた意味も大きく、成果は革新的である。

今後更に新規な関連分子を網羅的に同定し、これらの分子の機能の詳細を明らかにして、マラリア感染の特にハマダラカからヒトへの感染機構の全貌を明らかにしていきたい。将来的には、これらの分子の中から、マラリア感染を阻止する新規薬剤や感染阻止ワクチンの開発に繋がる分子が開発されることが期待できる。

### 3. 研究実施体制

三重大学グループ

- ① 研究分担グループ長：鎮西康雄（三重大学医学部、教授）
- ② 研究項目：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

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文発表

- Tomoko Ishino, Kazuhiko Yano, Yasuo Chiznei and Masao Yuda (2004)  
Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. PLoS Biology, 2: 77-84

#### (2) 特許出願

H15年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：1件）