

「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

マラリアは年間数億人に感染し数百万人が死亡する世界最大の感染症である。薬剤耐性マラリア原虫の蔓延や殺虫剤抵抗性媒介蚊の出現で、その対策は困難を極めており、新しいマラリア対策が求められている。マラリア原虫の人への感染は、蚊の吸血により唾液中のスポロゾイトが皮膚に放出されることで始まる。その後、スポロゾイトは肝実質細胞に感染寄生し、赤血球感染型になる。本研究は原虫の肝臓感染の分子機構を明らかにし、それを基盤としてマラリア感染を阻止する新規抗マラリア薬またはマラリアワクチンを開発するのが目的である。この目的を実現するために、スポロゾイトで発現している遺伝子の解析を行い、このステージで特異的に発現する遺伝子を同定すると共に、逆遺伝学的手法により感染機構を解析してきた。その結果、スポロゾイトが皮膚の中を通過し循環系に入る過程および循環系を離脱し肝実質中に侵入する過程で機能する複数の分子を同定することに成功した。さらにスポロゾイトが肝実質細胞を認識するさいに機能する分子を世界で初めて同定することに成功した。今後はこれらの分子の機能を更に検討し、これらを標的分子とした感染阻止の可能性を明らかにしていく。

2. 研究実施内容

研究目的

昨年度までの研究によって、我々はスポロゾイトが細胞通過能をもつこと、SPECT1及びSPECT2と命名した分子が、この能力を発揮するために必須であることを明らかにした。また細胞通過能はスポロゾイトが循環系と肝実質を隔てる肝類洞細胞壁（血液／肝実質バリア）を通過し、肝実質に侵入するために必要であることを明らかにした。今年度は、1. スポロゾイトの細胞通過能が（すなわちSPECT1及びSPECT2が）、蚊の吸血により注入された皮膚の内部からが循環系へ（皮膚／血液バリア）侵入するために必要であるという仮説をたて、これを検証した。2. また新たに複数の肝臓感染に関わる分子を同定し、その機能を解析した。3. さらにマラリア原虫が蚊の中腸に感染する過程が細胞通過を必要とする類似の侵入過程であることに着目し、中腸侵入ステージの遺伝子の機能を解析した。

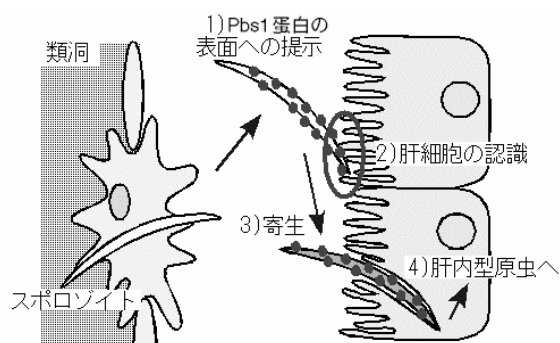
結果・考察

SPECT1及びSPECT2の皮膚／血液バリア侵入過程への関与

SPECT1及びSPECT2ノックアウト原虫にGFP発現コンストラクトを組み込み、この原虫の皮膚内での運動をリアルタイムに観察した。また原虫を皮下にインジェクションして皮膚から血管内への侵入にこの分子が関与しているかを調べた。その結果、SPECT1及びSPECT2ノックアウト原虫は皮膚内を血管へ移動することができないこと、従って感染性が100分の1まで低下することがわかった。以上のことよりスポロゾイトが循環系に侵入するためには皮膚内の細胞がバリアになっており、細胞通過能はここでも重要な役割を果たしていることが明らかになった。

肝実質細胞認識に関わる分子の同定

スポロゾイト期に特異的に発現する分子を同定し、それらの遺伝子を網羅的にノックアウトした原虫を作製し、その感染性を調べた。s1およびs2と命名した遺伝子をノックアウトすると、スポロゾイトの感染性が1万分の1以下に低下することが明らかになった。そこでこの原虫の表現型をさらに詳しく解析した。In vitroでの観察の結果、これらの原虫は細胞通過能は正常であるが、肝実質細胞に感染できなくなっていることが分かった。一方、細胞通過能を肝実質細胞を用いてアッセイした時に限り、ノックアウト原虫は野生型原虫より5倍以上高い通過活性を示すことが明らかになった。以上の結果よりノックアウト原虫は肝実質細胞を認識できず障害物として通り抜けてしまうこと、言い換えれば、細胞通過から内部への寄生のためのスイッチングが出来なくなっていることが推測された。この仮説を検証するためにノックアウト原虫を実際にラットに打ち込み、in vivoでの表現型をしらべた。ノックアウト原虫は肝実質に到達したが、肝実質細胞



に寄生することが出来ず、肝実質内を移動し続けた。以上の結果よりこの分子は肝実質細胞を認識するために機能していることが明らかとなった（右図）。肝実質細胞への感染はスポロゾイトの肝臓感染で最も重要なステップであり、その過程で鍵を握る分子を初めて同定することに成功した。

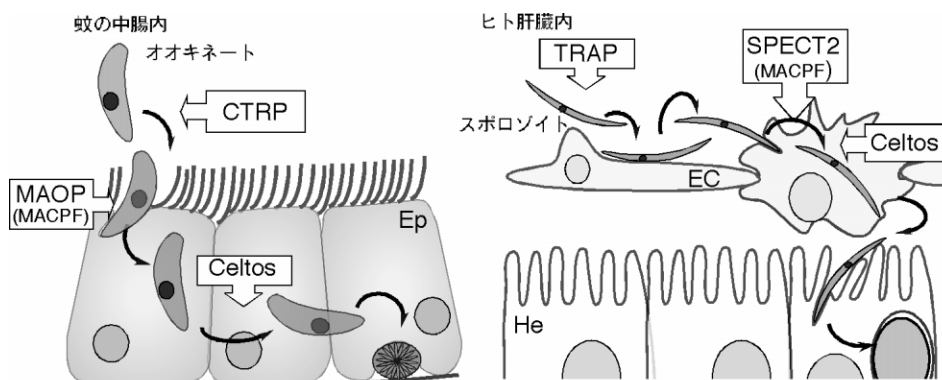
異なる宿主への侵入における共通の分子基盤の存在

オオキネートは蚊の中腸上皮細胞内を通過し、その基底膜上でスポロゾイトへ分化する。このさい感染する中腸上皮細胞がオオキネートの中腸への侵入を阻止するバリアーとして機能することが知られている。このステージでSPECT2と類似した分子(MAOPと命名)が発現していることを見だし、その機能をノックアウト法により解析した。MAOPノックアウト原虫は中腸上皮細胞内に侵入できず、細胞膜に先端を突き刺す形で停止した。上皮細胞の細胞膜は全く障害を受けていなかった。

MAOPとSPECT2はともに補体やパーホリンの膜チャンネル形成ドメインであるMACPFドメインを有している。このことはスポロゾイおよびオオキネートにおいて、膜チャンネルの

形成による細胞膜の障害が、宿主細胞へ侵入するために必須であることを示唆している。蚊およびヒトという異なる

宿主への侵入において、マラリア原虫が共通する分子機構を進化させてきたというモデルを提唱した（右図）。



今後の展望

ここまでの研究により、蚊の吸血から肝実質細胞への感染までの主要な経路と、それに関わる分子を明らかにした。原虫は肝臓へ感染するために複数のバリアを超えなければならず、そのために特殊な分子機構を発達させてきたことを明らかにした。またバリアである細胞と肝実質細胞を判別するための分子機構が存在していることもわかった。今後はこれらの原虫分子を標的とすることにより、実際に感染を阻止ができることを実証することが重要である。さらに現在、肝臓内での増殖とメロゾイトへの分化に関わる分子の同定も進めている。肝実質細胞内への寄生の分子機構の詳細を明らかにすることも今後の目標である。

マラリア原虫は血液感染ステージになると蚊に伝播することが可能となる。その前段階である肝臓感染ステージを標的とした感染阻止法は、マラリア原虫の生活環を断ち、ひいてはマラリア撲滅を可能にする唯一の手段である。今後の研究により、さらに詳細に感染の分子基盤を解明し、感染阻止法の確立につなげたい。

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（原著論文）発表

- Kimie Kadota, Tomoko Ishino, Takahiro Matsuyama, Yasuo Chinzei, Masao Yuda (2004)

Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host

P. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **16**:16310-16315.

- Masao Yuda, Tomoko Ishino. (2004)

Liver invasion by malarial parasites -how do malarial parasites break through the host barrier?

Cell. Microbiol. **6**: 1119-1125.

- Tomoko Ishino, Yasuo Chinzei, Masao Yuda (2005)

A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection

Cell. Microbiol. **7**: 199-208.

- (2) 特許出願

H16年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：1件）