

論文の内容の要旨

農学国際専攻

平成 13 年度博士課程進学

氏 名 森澤 亜希

指導教官名 松本 安喜 助教授

Study on the variation in the cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to host cells

(熱帯熱マラリア原虫感染赤血球の宿主細胞接着における多様性に関する基礎研究)

マラリアはマラリア原虫の感染によって起こる寄生虫性疾患であり熱帯・亜熱帯を中心に世界 100 ヶ国以上で流行している。現在、世界人口の約 40%がマラリア汚染地域に居住し、年間 3 億人以上が感染し、少なくとも 100 万人が死亡していることが WHO（世界保健機構）によって報告されている。また、これまでに開発されてきた抗マラリア薬に対して耐性をもつマラリア原虫が出現していることも、流行原因の一つである。ヒトに感染するマラリア原虫は 4 種類あるが、中でも *Plasmodium falciparum* によって起こる熱帯熱マラリアは重度の貧血や脳性マラリアなどの重篤な症状を併発することが知られており、適切な治療が行われないと致死的である。これらの症状の主要な原因の一つとして、マラリア感染赤血球と宿主の組織血管内皮及び免疫細胞との接着と、これに起因する血流阻害や組織機能障害が挙げられる。この接着は、主にマラリア原虫が産生し感染赤血球上に発現する主要抗原性タンパク PfEMP-1 と宿主細胞、特に血管内皮細胞や免疫細胞上のレセプターとの結合によるものである。これまでにこの抗原性タンパクと宿主細胞の結合機構に関して様々な知見が得られ、抗マラリアワクチン開発の標的分子の一つとして考えられている。しかし抗原性タンパク、*Plasmodium falciparum* infected-erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1) をコードしている *var* 遺伝子は多様性を持っており、その為に PfEMP-1 の接着性にも多様性が生じさせる為、効果的なワクチンの開発を困難なものにしている。

本研究は、マラリア原虫感染赤血球上の抗原性タンパクと宿主細胞上のレセプターとの結合における新たな知見を得て新規抗マラリアワクチンの開発に貢献することを目的と

して、以下の3章で構成される。

(第1章) 株化マラリア原虫感染赤血球の接着性を担う抗原性タンパク (PfEMP-1) をコードする *var* 遺伝子の同定

本章では、まず、ヒト血管内皮細胞の *in vitro* モデルである C32 細胞に対して接着性を持つとされている株化マラリア原虫 ItG 株において発現する *var* 遺伝子の同定を行い、接着性と *var* 遺伝子の発現における相関について検討した。ItG 株では、ある1種類の *var* 遺伝子 (*var-1/ItG*) が mRNA レベルで優位に発現し、この遺伝子にコードされる PfEMP-1 (PfEMP-1/ItG-1) が ItG 株感染赤血球における接着性を担っている可能性が示された。そこで、*var-1/ItG* に特異的なアミノ酸配列をもとにしてペプチドを合成し、BALB/c マウスに投与して抗血清を得た。ItG 株にさらに C32 細胞に接着した感染赤血球を選択培養することにより C32 細胞に対する接着圧を与えて接着性を増加させ、PfEMP-1/ItG-1 の発現を、抗血清を用いた間接蛍光抗体法で確認した。その結果、PfEMP-1/ItG-1 を発現するマラリア原虫数が選択前より増加していることが示された。また、間接蛍光抗体法により、PfEMP-1/ItG-1 を感染赤血球上で発現する感染赤血球 (ItG/8A) と発現しない感染赤血球 (ItG/7B) を分画して増殖させ、それぞれの C32 細胞への接着性を測定した。ItG/8A の C32 細胞への接着性は著しく増加することが示された。また ItG/8A で発現する *var* 遺伝子は、全て *var-1/ItG* と同じであった。これらの結果から、株化されたマラリア原虫において特異的な *var* 遺伝子が発現して PfEMP-1 を生成し、接着性を担っていることが示された。

(第2章) 野外株原虫感染赤血球の接着性と病態及び *var* 遺伝子の発現における相関性

本章では、タイ在住の、熱帯熱マラリアによる重篤な脳症状である脳性マラリアを示した患者由来の株3検体 (TAb28, LEK, DFO2037) および脳性マラリアは陰性だったが、高原虫血症など他の重篤な症状を示した重症マラリア患者由来の株1検体 (CD049) を用い、C32 細胞、CD36, ICAM-1 への接着性及び *var* 遺伝子との相関について検討した。脳性マラリア患者由来の株3検体のうち、TAb28 と LEK は C32 細胞、ICAM-1、CD36 に対して接着性を持っていたが、DFO2037 はほとんど持っていなかった。非脳性マラリア患者由来の株 CD049 もまた全ての細胞に対して接着性を持っており、その接着性は TAb28, LEK と比較して約9倍高かった。各株で発現した *var* 遺伝子内の保存領域の一部に関してアミノ酸配列を解析し比較したところ、CD049 では、発現した *var* 遺伝子の mRNA のうち約60%を占める *var* (*var-1/CD049*) は、TAb28 においても最も多く発現し、TAb28 から同

定された *var* 遺伝子の mRNA の約 23% を占めていた。一方、LEK で発現した *var* 遺伝子の mRNA のうち約 55% を占めた *var-1/LEK* のアミノ酸配列は *var-1/CD049* とは異なっていた。また、TAb28 と CD049、DFO2037 に由来する患者は過去にマラリア罹患の経歴があることが報告されている。以上の結果から、タイ由来の原虫株において接着性の強さの程度と脳性マラリアの発症における共通性は示されなかった。しかしながら、接着性を持っている原虫株で共通して発現する *var* 遺伝子が同定され、その発現率は接着性の強弱と相関していた。

(第3章) PfEMP-1 の ICAM-1 結合をもとにした合成された組換えタンパク質による熱帯熱マラリア原虫感染赤血球の細胞接着阻害

マラリア原虫感染赤血球上の抗原性タンパク PfEMP-1 と結合する宿主細胞上のレセプターは多種類存在する。そのひとつである Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) と感染赤血球との結合は、熱帯熱マラリアによる併発症の中でも重篤な脳障害を誘発する脳性マラリアの原因となりうることを示されている。本章では、PfEMP-1 内の ICAM-1 結合領域をもとにした組換えタンパク質を大腸菌によるタンパク発現システムで合成し、このタンパク質による感染赤血球と ICAM-1 の結合阻害能力及び一旦 ICAM-1 に結合した感染赤血球に対する解離能力を、タイの熱帯熱マラリア患者由来マラリア原虫 (CD049) を用いて測定した。高濃度の組換えタンパク質を予め ICAM-1 発現細胞と結合させてから感染赤血球と共培養すると、ICAM-1 と結合する感染赤血球の数が減少した。また、ICAM-1 と結合した感染赤血球に組換えタンパク質を投与し共培養させると、濃度依存的に感染赤血球を ICAM-1 から解離させた。以上のことから、この研究で合成された組換えタンパク質は結合阻害効果及び解離効果いずれも持っていることが示され、特に脳性マラリアに置ける抗マラリア治療の新しいアプローチとしての可能性が示された。

以上の研究結果から、株化マラリア原虫において優位に発現する *var* 遺伝子とその感染赤血球の接着性を担うことが示された。同様の結果がタイのマラリア患者由来株においても観察された。しかしながら、今回用いられた症例数が少なかった為、タイ全体または他国の原虫株において共通する知見かどうかは不明である。また、野外分離株における感染赤血球の細胞接着性と発現する *var* 遺伝子の細胞優位性の可能性については、感染赤血球に接着圧を与えることで *var* 遺伝子の発現が増加するかどうかを検討する必要がある。また、PfEMP-1 の 1 ドメインの解析だけでなく接着に関与するドメインの解析も必要であることが示唆された。また、株化原虫マラリアに由来するペプチドがマラリア患者由来の感染赤血球と交差反応をして接着を阻害することが示され、PfEMP-1 の ICAM-1 結合領域の保存性が示唆された。今後さらに多くの野外分離株における接着阻害効果を評価する事によって、今回合成された組換えタンパクの汎用性について検討することが望ましい。以上

のことから、マラリアをコントロールする為には野外株を用いた研究が株化されたマラリア原虫と並行して行われる必要性を示している。