

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月3日

採択番号	2022-共同-5		
研究部門	国際連携協力部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	麻田 正仁
研究課題名	熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトの細胞接着に必要な表層分子の同定		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	みやざき しんや 宮崎 真也	長崎大学熱帯医学研究所細胞環境構築学分野・助教 実験の実施、研究の総括	
研究分担者	Blandine Franke- Fayard	Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, The Netherlands. Assistant Professor 熱帯熱マラリア原虫の遺伝子改変・細胞接着に関する技術提供	
	あさだ まさひと 麻田 正仁	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授 (役割分担) 考察、マラリア原虫の細胞接着に関する技術提供	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>本研究の目的は、熱帯熱マラリア原虫のガメトサイトがヒト骨髄の中に潜伏するために必要な原虫分子を同定することである。マラリアは熱帯地域で蚊により媒介され、甚大な数の感染者・死者を出す原虫感染症である。その病原体である熱帯熱マラリア原虫は、ヒト赤血球内で増殖する一方で、一部の原虫はガメトサイトと呼ばれる形態へと分化しヒトから蚊へと伝播する。熱帯熱マラリア原虫が赤血球内で増える際には、その感染赤血球は末梢の血管系の中に滞留するが、ガメトサイト感染赤血球は骨髄の中の微小環境に潜伏する。この潜伏過程では、ガメトサイト感染赤血球の表面に発現する表層分子を介した骨髄中の間葉系細胞への接着が起こると考えられている。しかしながら、骨髄中の細胞への接着に関与する原虫分子の実体は未同定である。この不明点を明らかにするために、遺伝子ノックダウンの手法と骨髄間葉系幹細胞の系を用いて、ガメトサイト期の細胞接着に必要な原虫分子を同定する。本研究によりガメトサイトの骨髄潜伏の分子基盤が明らかになり、ガメトサイト生物学・抗マラリア薬開発における新機軸が打ち出される。</p>		
研究経過の概要	<p>本研究計画では熱帯熱マラリア原虫ガメトサイトのヒト細胞への接着メカニズムを解明するために、以下の複数のアプローチで研究を行った。</p> <p>① <u>ガメトサイト感染赤血球の表層分子の遺伝子改変および発現・局在解析</u></p> <p>本研究ではガメトサイト細胞表層への局在が確認されている6種類の遺伝子を選定し、ノックダウン原虫を作出する。本研究では、これら6種類の遺伝子ノックダウン用のプラスミドを作出し、そのうちのひとつを熱帯熱マラリア原虫 NF54 株にトランスフェクションした。薬剤選択を行うことでプラスミドを保持する原虫の作出に成功し、現在多段階の薬剤選択を進めて目的のノックダウン原虫の作出を行っているところである。</p>		

	<p>② 熱帯熱マalaria原虫遺伝子改変レポーターラインの性状解析 ガメサイト期研究のための新たなツールとなるレポーターラインの開発研究に従事した。本研究では、以前に作出した GFP-NanoLuc 発現熱帯熱マalaria原虫の性状解析を行い、この原虫がガメサイト期での薬剤アッセイに使用できることを示した。</p> <p>③ ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養系および接着アッセイのセットアップ ヒト体内では、熱帯熱マalaria原虫ガメサイトはヒトの骨髄間葉系幹細胞に接着することが示唆されている。この現象を <i>in vitro</i> で再現するために、市販の骨髄間葉系幹細胞を入手し研究室で培養系を立ち上げた。また、不死化した骨髄間葉系幹細胞も入手することができ、この細胞も順調に培養することができた。これらの細胞を使った熱帯熱マalaria原虫ガメサイト接着アッセイを構築中である。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>本研究では、熱帯熱マalaria原虫ガメサイト感染赤血球の表層分子の遺伝子改変原虫の作出を進めた。また、これと並行して新たなレポーターラインの開発研究を行い論文発表の準備を進めた。さらに、ガメサイトのヒト細胞への接着アッセイ系の構築を志向して、ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養系を構築した。本研究成果により、ガメサイトのヒト細胞への接着の分子基盤が明らかになると期待される。</p> <p>以下に発表予定の原著論文の概要を記載する。 【概要】 ルシフェラーゼを発現するマalaria原虫は、抗マalaria化合物の評価に広く利用されている。我々は、マalaria原虫の複数のステージに有効な新規抗マalaria薬をスクリーニングするために、ライフサイクル全体を通して NanoLuciferase (NanoLuc) を構成的に発現する新規熱帯熱マalaria原虫レポーターラインを作成した。NanoLuc を発現するレポーターラインは赤内期、ガメサイト、蚊、肝臓の各ステージで定量的な NanoLuc シグナルを示した。また、化合物の抗マalaria活性を赤内期、ガメサイト、肝臓の段階で評価するアッセイ系を確立し、いくつかの抗マalaria化合物の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) 値を決定しました。この堅牢なハイスループット・スクリーニング・システムの開発を通じて、赤内期の寄生虫を死滅させる抗マalaria化合物を同定した。本研究は NanoLuc レポーターラインの有用性を明らかにするものであり、ヒトマalaria原虫を標的とする化合物の多段階スクリーニングにより抗マalaria薬開発を促進することができる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>【原著論文】 A versatile <i>Plasmodium falciparum</i> reporter line expressing NanoLuc enables highly sensitive multi-stage drug assays. Miyazaki Y*, Vos MW, Geurten FJA, Bigeard P, Kroeze K, Yoshioka S, Arisawa M, Inaoka DK, Soulard V, Dechering KJ, Franke-Fayard B, <u>Miyazaki S*</u> <i>Communications Biology</i>. In press. * Corresponding author</p> <p>【学会発表など】 1. オンラインセミナー熱研夏塾 2022「感染症研究のキャリアパス」(長崎大学アウトリーチ活動) 「マalaria原虫がヒト・蚊に寄生する仕組みに魅せられて」宮崎真也 2. 招待講演: 第 95 回日本生化学会大会シンポジウム「若手研究者が切り拓く生化学の学際的フロンティア」 「創薬・ワクチン開発のための遺伝子組み換えマalaria原虫レポーターライン」宮崎真也</p>