

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
戦略的国際科学技術推進事業 (インド)

(英語) International Collaborative Research Program
Strategic Japanese-Indian Research Cooperative Program (India)

研究開発課題名：(日本語) 三日熱マラリアの重症化における TLR の役割と重症化を予知する早期診断
技術の開発

(英語) Role of TLRs in patients with severe complicated malaria due to *Plasmodium vivax*
and the development of diagnostic method for predicting the severity

研究開発担当者 (日本語) 医学部 教授 小林 富美恵

所属 役職 氏名：(英語) Fumie Kobayashi, Professor; Department of Infectious Diseases, Kyorin University
School of Medicine

実施期間：平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(和文)

マラリアの重症化は一般に熱帯熱マラリアで起こる。しかし最近、三日熱マラリア (Pv) による重症化例がインドで増加している。本研究は、マラリア重症化の早期診断技術の開発に向けて、三日熱マラリアの重症化に関与する宿主因子や原虫因子の役割をフィールドとラボの双方で検証することを目的とした。

先行研究および日本側チームの研究成果によって、様々な病原体を感知して宿主免疫を作動させる機能がある Toll like receptor (TLR)の機能不全がマラリア重症化に関与することが示唆されている。そこでインド側チームでは、TLR やその関連遺伝子の多型と三日熱マラリアの病態重症化との関係について解析した。三日熱マラリア患者の診断と検体収集は、インドの Postgraduate Institute of Medical Education and Research (PGIMER) 附設病院、ならびに Government Medical College and Hospital (GMCH) にてなされた。臨床データと血液検体は患者の同意を得てから収集された。これまでに三日熱マラリア患者 170 人の臨床データと DNA 検体が収集され、119 人 (70%) において重症三日熱マラリアの指標とな

る血小板減少症が認められた。血小板減少症を呈する三日熱マラリア患者の DNA 検体を解析した結果、33 検体で TLR 4 遺伝子に多型が検出された。また、58 検体で TLR9 遺伝子に多型が検出された。これらの結果から、TLR 4 および TLR9 で検出された変異は、三日熱マラリアの病態重症化に關与する可能性が示唆された。

日本側チームは、これまでにマラリア原虫のプリンヌクレオチド生合成系關連分子群を欠損させることによって、マラリア原虫の弱毒株を作出してきた。この研究成果によって、マラリア原虫の代謝活性はマラリアの病態重症化に密接な關係があることが明らかとなっている。本年度の研究によって、マラリア原虫が有する 8 種の TCA 回路關連酵素のうち、マラリア原虫に特異的に保存されているリンゴ酸：キノン酸化還元酵素 (MQO) はプリンヌクレオチド生合成系と TCA 回路との代謝ネットワークの鍵分子であり、赤内期マラリア原虫の代謝活性に重要な役割を果たしていることが示された。さらに、本研究によって、MQO は妊娠中のマラリアの病態重症化にも關わることが明らかとなった。これまで、妊娠中のマラリアの病態の重症化は、妊娠による免疫抑制が主な原因であると考えられてきたが、本研究結果によって、「妊娠宿主においてマラリア原虫の代謝活性が亢進することで病態が重症化する」という新たな病態重症化機構が存在する可能性が示唆された。妊娠中のマラリアに対する治療法は未だに確立されていないため、マラリア流行地において、妊娠中のマラリアは重大な社会問題となっている。MQO は、マラリア原虫に特異的な酵素で、ヒトなどの哺乳類にはホモログが存在しないことが知られている。本研究結果により、MQO は妊娠時特異的なマラリアの病態重症化抑制にも効果的な新規創薬の標的になると期待される。

(英文)

Severe malaria is known to be associated with *Plasmodium falciparum* infection. However, in recent few years there has been an increase in the reported cases of severe malaria due to *Plasmodium vivax* in India. The goals of this study are; 1) to investigate the role of host and parasite factors that are involved in severe complicated malaria due to *P. vivax*, and 2) to develop the diagnostic method for predicting the severity on the basis of knowledge obtained by field and lab works.

Toll-like receptors (TLRs) play an important role as mediators of innate immune response to malaria. To investigate pathogenesis in severe vivax malaria, The Indian side assessed a polymorphism in TLR- and TLR signaling-related genes in *P. vivax* malaria patients. The clinical data and blood samples related to the vivax malaria were collected at Postgraduate Institute of Medical Education & Research (PGIMER) and Government Medical College and Hospital (GMCH), India. The informed consents were taken from patients before taking the clinical history and blood samples. Analyses of data obtained from the 170 *P. vivax* malaria patients revealed that 119 (70%) *P. vivax* patients showed thrombocytopenia, which may be associated with increasing severity in vivax malaria. TLR- and TLR signaling-related genes were assessed in *P. vivax* malaria patients showing thrombocytopenia using polymerase chain reaction (PCR) combined with DNA sequencing. Among the available sequences, variation in the TLR4 and TLR 9

region was observed in 33 subjects and 58 subjects, respectively. Therefore, the severity of clinical illness would be correlated with the mutations present in the TLR- and TLR signaling-related genes. These studies are still ongoing.

The Japanese side have demonstrated that the growth and virulence of *P. berghei* ANKA, a high virulent-rodent malaria parasite, were suppressed by purine restriction. Subsequent purine restriction resulted in a substantial reduction in ATP levels relative to intact parasites, suggesting that the ATP levels in parasites might be useful for predicting the disease severity during malaria. Recently, we have revealed that malate:quinone oxidoreductase (MQO), one of the TCA-cycle enzymes in malaria parasites, is a key molecule for metabolic cross-talk between purine salvage pathway and TCA cycle in *Plasmodium* parasites and is involved in parasite viability during the blood stage. Moreover, we found that MQO is associated with severity in malaria during pregnancy. It is considered that immune tolerance by action of pregnancy-associated hormones is involved in the severity in malaria during pregnancy. Our results suggest that maternal metabolic adaptations are associated with increase of viability of malaria parasites and with the severity in malaria during pregnancy. Malaria during pregnancy is a significant public health problem with substantial risks for the pregnant woman. Our finding suggest that MQO would be a potential target for the treatment of severe malaria, including pregnancy-associated malaria.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Hajime Honma¹, Mamoru Niikura², Fumie Kobayashi², Toshihiro Horii³, Toshihiro Mita⁴, Hiroyoshi Endo¹ and Makoto Hirai⁴ (¹Department of International Affairs and Tropical Medicine, Tokyo Women's Medical University, Japan; ²Department of Infectious Diseases, Kyorin University School of Medicine, Japan; ³Department of Molecular Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan; ⁴Department of Molecular and Cellular Parasitology, Juntendo University, Japan): Mutation tendency of mutator *Plasmodium berghei* with proofreading-deficient DNA polymerase delta. Sci Rep 6:36971, 2016. DOI: 10.1038/srep36971.
2. Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Yoichiro Iwakuwa¹, Yashushi Kawakami², Fumie Kobayashi (¹Research Institute for Biological Sciences, Tokyo University of Science, ²Laboratory of Parasitology, School of Life and Environmental Science, Azabu University): Preferentially expanding V γ 1⁺ γ δ T cells are associated with protective immunity against *Plasmodium* infection in mice. Eur J Immunol. 47:685-691, 2017. DOI: 10.1002/eji.201646699.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 井上信一, 新倉 保, 朝日博子, 小林富美恵: マラリア原虫感染防御における V γ 1⁺ γ δ T 細胞

- の重要性とその疲弊. 第 27 回日本生体防御学会学術総会, 九州大, 2016 年 7 月 7-9 日, 口頭発表, 国内.
2. Hiroko Asahi, Mohammed E. M. Tolba, Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Fumie Kobayashi: Copper homeostasis for the developmental progression of intraerythrocytic malarial parasite. The XIX International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM 2016), Brisbane, Australia, September 18th-22nd, 2016, ポスター発表, 国外.
 3. Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: $V\gamma 1^+ \gamma\delta$ T cell is a major subset responding to *Plasmodium berghei* XAT infection. The XIX International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM 2016), Brisbane, Australia, September 18th-22nd, 2016, ポスター発表, 国外.
 4. Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: Maternal IFN- γ receptor signaling promotes placental pathology during *Plasmodium* infection. The XIX International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM 2016), Brisbane, Australia, September 18th-22nd, 2016, ポスター発表, 国外.
 5. 小林富美恵: 日本原生生物学会賞受賞講演: マラリア原虫感染に対する宿主免疫機構. 第 49 回日本原生生物学会, 岡山, 2016 年 10 月 8-9 日, 口頭発表, 国内.
 6. Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: The effect of schizont membrane-associated cytoadherence protein (SMAC)-deficiency on the adverse pregnancy outcomes during *Plasmodium* infection. 第 76 回日本寄生虫学会東日本支部大会, 東京, 2016 年 10 月 22 日, 口頭発表, 国内.
 7. 井上信一, 新倉 保, 朝日博子, 小林富美恵: $V\gamma 1^+ \gamma\delta$ T 細胞は *Plasmodium berghei* 感染防御免疫に関与する. 第 76 回日本寄生虫学会東日本支部大会, 東京, 2016 年 10 月 22 日, 口頭発表, 国内.
 8. Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: Preferentially expanding $V\gamma 1^+ \gamma\delta$ T cells are associated with protective immunity against *Plasmodium* infection. The 18th Forum Cheju, Daejeon, Korea, October 28-30, 2016, 口頭発表, 国外.
 9. Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: IFN- γ receptor signaling plays a pivotal role in adverse pregnancy outcomes during severe malaria. The 18th Forum Cheju, Daejeon, Korea, October 28-30, 2016, ポスター発表, 国外.
 10. 井上信一, 新倉 保, 朝日博子, 小林富美恵: マラリア原虫感染は $\gamma\delta$ T cell exhaustion を引き起こす. 第 45 回杏林医学会総会, 東京, 2016 年 11 月 19 日, 口頭発表, 国内.
 11. 遠藤沙佑美, 井上信一, 蔵田 訓, 新倉 保, 朝日博子, 大崎敬子, 神谷 茂, 小林富美恵: サルモネラ感染によるマラリア免疫記憶の減弱効果. 第 45 回杏林医学会総会, 東京, 2016 年 11 月 19 日, 口頭発表, 国内.
 12. 松田理沙, 新倉 保, 井上信一, 朝日博子, 小林富美恵: マラリア原虫のプリンヌクレオチド生合成を介した新たなエネルギー代謝システムの解明. 第 45 回杏林医学会総会, 東京, 2016 年 11 月 19 日, 口頭発表, 国内.
 13. Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: The effect of schizont membrane-associated cytoadherence protein (SMAC)-deficiency on the accumulation of erythrocytes infected with murine malaria parasites to placenta. The 14th Asian-Pacific

- Congress for parasitic zoonoses (APCPZ-2016). Sagamihara, Kanagawa, November 26-27, 2016, 口頭発表, 国内.
14. Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. The 14th Asian-Pacific Congress for parasitic zoonoses (APCPZ-2016). Sagamihara, Kanagawa, November 26-27, 2016, 口頭発表, 国内.
 15. Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Fumie Kobayashi: $V\gamma 1^+$ $\gamma\delta$ T cell-exhaustion during *Plasmodium* infection. 第45回日本免疫学会学術集会. 沖縄, 2016年12月5-7日, 口頭発表, 国内.
 16. Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: Mechanisms responsible for increased susceptibility to malaria parasites during pregnancy. 第10回寄生虫感染免疫研究会, 徳島, 2017年2月9-10日, 口頭発表, 国内.
 17. Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: MQO-mediated mitochondrial functions are involved in severe malaria during pregnancy. Seminars in Departmental Lecture Theatre of PGIMER, Chandigarh, India, February 22-25, 2017, 口頭発表, 国外.
 18. Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: $\gamma\delta$ T cells are crucial effector cells for protective immunity to *malaria*. Seminars in Departmental Lecture Theatre of PGIMER, Chandigarh, February 22-25, 2017, 口頭発表, 国外.
 19. Mamoru Niikura: Role of IFNGR1 in pregnant mice infected with *Plasmodium berghei*. Japanese-Brazil Malaria Workshop 2017, Sao Paulo, March 15-17, 2017, ポスター発表, 国外.
 20. Shin-Ichi Inoue: $\gamma\delta$ T cell-related protective immunity against *Plasmodium berghei* infection. Japanese-Brazil Malaria Workshop 2017, Sao Paulo, March 15-17, 2017, ポスター発表, 国外.
 21. Fumie Kobayashi, Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi: Current status of imported malaria in Japan. Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within “Strategic International Research Cooperative Program (SICP)”, Sapporo, February 24, 2017, 口頭発表, 国内.
 22. Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: Role of MQO-mediated mitochondrial functions in severe malaria. Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within “Strategic International Research Cooperative Program (SICP)”, Sapporo, March 24, 2017, 口頭発表, 国内.
 23. Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: $\gamma\delta$ T cells are crucial effector cells for protective immunity to malaria. Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within “Strategic International Research Cooperative Program (SICP)”, Sapporo, March 24, 2017, 口頭発表, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 小林富美恵：女性研究者のキャリアパス形成．北東北女性研究者研究・交流フェア 2016 年度ロールモデル講演会，盛岡，2017年3月2日，国内．
2. 井上信一：やさしい科学技術セミナー「身近な食品から寄生虫をさがそう！」，パナソニックセンター東京，2016年8月18-19日，国内．
3. 小林富美恵：薬がみえる．vol.3，監修，「感染症と薬」章，大項目「寄生虫，原虫感染症，蠕虫感染症」，メディックメディア，2016，国内．
4. 小林富美恵：監修，獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠「寄生虫病学 改訂版」，2017. 3月，国内．
5. 小林富美恵：監修，イヤートート 2018，「監修，感染症」章，「寄生虫感染症」項，メディックメディア，2017. 3月，国内．
6. 小林富美恵：寄生虫症-食品が媒介、火を通して-琉球新聞，2016年12月6日，国内．
7. 小林富美恵：食品が媒介する寄生虫症，岩手日日，2016年12月5日，国内．
8. 小林富美恵：食品が媒介する寄生虫症-輸送技術向上も要因に-苫小牧民法，2016年12月6日，国内．
9. 小林富美恵：杏林医学会第16回例会報告：「New aspect of parasitic diseases in India by Prof. Rakesh Sehgal」，杏林医学会雑誌 47 (2)，2016，国内．
10. 小林富美恵：杏林医学会第20回例会報告：「Malaria in pregnancy by Prof. Alka Sehgal」，杏林医学会雑誌 47 (2)，2016，国内．
11. 杏林大学医学部感染症学講座寄生虫学部門 HP
(http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/did/parasit/p_index.html)，2016年，国内．
12. 杏林大学医学部 HP 教室紹介
(<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/infection/#para>)，2016年，国内．
13. 杏林大学大学院 HP 医学研究科 研究室・研究グループ紹介：感染症学教室
(<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/infect-dis/>)，2016年，国内．

その他、受賞等

1. 小林富美恵：日本原生生物学会賞 「マラリア原虫感染に対する宿主免疫機構」第49回日本原生生物学会，岡山，2016年10月8-9日，国内．
2. 井上信一：第45回杏林医学会総会優秀賞 「マラリア原虫感染は $\gamma\delta$ T cell exhaustion を引き起こす」 第45回杏林医学会総会，東京，2016年11月19日，国内．
3. 遠藤沙佑美：第45回杏林医学会総会優秀賞 「サルモネラ感染によるマラリア免疫記憶の減弱効果」(井上信一，小林富美恵指導論文) 第45回杏林医学会総会，東京，2016年11月19日，国内．
4. 松田理沙：第45回杏林医学会総会優秀賞 「マラリア原虫のプリンスクレオチド生合成を介した新たなエネルギー代謝システムの解明」(新倉 保，小林富美恵指導論文) 第45回杏林医学会総会，東京，2016年11月19日，国内．
5. 遠藤沙佑美：第6回トラベルアワード (平成28年度) 「サルモネラ感染によるマラリア

免疫記憶の減弱効果」(井上信一, 小林富美恵指導論文). 杏林医学会, 東京, 2017年3月12日, 国内.

(4) 特許出願: 該当なし