

熱帯医学講座

教授：嘉糠 洋陸 寄生虫感染と衛生動物学
 准教授：石渡 賢治 寄生虫感染と粘膜免疫
 講師：熊谷 正広 寄生虫症の検査・診断法の開発

教育・研究概要

I. 腸管寄生虫感染における腸管免疫応答の解析

微生物、食物など様々な異種抗原が侵入する腸管には、それらに対する排除あるいは寛容を誘導・制御する免疫機構が存在する。このシステムは、体内の免疫を司る全身免疫とは異なる独自の自然・獲得免疫系であることが明らかになりつつある。一方、ヒトの腸管寄生虫症はそのほとんどが慢性感染であり、何度も感染する。病原体として腸管寄生虫を“排除する”という免疫応答が成立しづらいと考えられる。ネズミの腸管寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* 感染では、2週間以内に Th2 免疫応答依存性の排虫が起き、再感染防御が誘導される。腸管寄生虫に対して適切な免疫応答がなされていると考えられるこの系の免疫応答を解析した。*N. brasiliensis* の腸管侵入後、翌日には腸間膜リンパ節の樹状細胞は活性化し、T 細胞の初期活性化も認められた。このリンパ節での Th2 応答 (IL-4 産生) は3日後に認め、排虫は7日後になされた。興味深いことに、一時的に活性化した樹状細胞は以降、抗原提示分子の MHC class II 発現を低下させた。侵入後5日の樹状細胞は、同翌日の樹状細胞に比して抗原特異的な T 細胞増殖を半減させた：寄生が続いているにも関わらず。また、外来性抗原を T 細胞に提示すると考えられている CD4 陽性樹状細胞の消失を認めた。この現象は、侵入後翌日に薬剤で駆虫し、抗原暴露をなくした状態でも認めた。これら応答を、1ヶ月以上感染が持続する *Heligmosomoides polygyrus* 感染に対する免疫応答と比較することでその適切・有効性を検証する予定である。

II. 超高速シーケンサーを用いた *Entamoeba* のトランスクリプトーム解析

我々は、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) と *E. invadens* のトランスクリプトーム解析を行ってきた。*E. invadens* は爬虫類寄生のアメーバであり、宿主が違うものの赤痢アメーバと形態と生活史が類似しており、赤痢アメーバが *in vitro* でほとん

ど嚢子を形成しないのに対し、*in vitro* (無菌液体培養) で容易に嚢子形成を誘導できるので、赤痢アメーバの嚢子形成の代替モデルとして用いられている。我々のこの研究の発端は、「赤痢アメーバの mRNA の 5' 非翻訳領域 (5'UTR) が短い」ということが少数の遺伝子の解析をもとに言われていたが、全体として本当にそうなのか否かを明らかにしようと思ったことである。共同研究により、様々なテクノロジーを用いたシーケンシング、パイオインフォマティクス解析を行うことができた。これまで、(1) オリゴキャップ法 (従来の方法では得難かった 5' 末端が欠失していない cDNA ライブラリーを得ることができる) による完全長 cDNA のシーケンシング、(2) TSS-seq (オリゴキャップ法と次世代シーケンサーの長所を組み合わせたもので、転写開始点から始まる 35 塩基のシーケンシングを大量に決定できる) のタグ・シーケンシング、(3) RNA-seq (トランスクリプトームをショットガン法によってシーケンシングする) のタグ・シーケンシングを得、それらを赤痢アメーバおよび *E. invadens* の既存のゲノム・シーケンシング上にマッピングした。先に、完全長 cDNA のデータベースを 'Full-Entamoeba' (<http://fullent.hgc.jp/>) として公開していたが、今回、TSS-seq および RNA-seq データと統合したデータベース (<http://fullent.genome.ad.jp>) を再構築した。これにより、ユーザーは、統合され視覚化された情報をサーチし、ダウンロードできるようになった。赤痢アメーバおよび *E. invadens* の mRNA の 5'UTR は平均約 10 塩基で、全体的に短いことが確認された。TSS-seq により、転写開始点が必要しも一定しておらず「揺れ」があること、RNA-seq により、*E. invadens* の栄養型と嚢子間でイントロンが違う (alternative splicing が起きている) 遺伝子があることが明らかとなった。また、両種のアメーバで、ゲノムの遺伝子間領域にマップされるシーケンシングが合わせて 500 以上見つかった。これらを Pfam 解析したところ、29 個は新規 (遺伝子予測されていなかった) タンパク質遺伝子であった。Rfam 解析により、4 つは tRNA で、ひとつは 5S_rRNA であることがわかった。他のシーケンシングは、non-coding RNA ではないかと思われるが、確認には構造解析が必要である。

III. 熱寄生感染時の宿主血中アミノ酸インフォマティクス

血液寄生性のマラリア原虫は、寄生部位である血中赤血球細胞内において分裂・増殖を繰り返すが、

これにあたり周囲の環境から栄養素を取り込んでいる。マラリア原虫は1種類以上のアミノ酸の合成経路を欠いており、アミノ酸源を宿主のヘモグロビンおよび血漿中アミノ酸に依存していることなどから、宿主血漿中の遊離アミノ酸パターンはマラリア原虫の寄生成立にあたり重要な役割を果たしていると考えられる。

我々はこれまでの研究において、網羅的な宿主血漿中アミノ酸パターンの解析（アミノグラム解析）により、齧歯類特異的なマラリア原虫（*Plasmodium berghei*）感染が各種血漿中遊離アミノ酸の濃度を劇的に変動させることを見出している。これらアミノ酸群の代謝合成経路は複雑な栄養ネットワークとして構成されていることから、この結果は相互に関連するアミノ酸多変量が感染症の過程を定義する可能性を強く示唆している。また、宿主血漿中アミノグラムは摂取する餌のアミノ酸成分と強い相互作用を持ち、そのバランスを変化させた餌を給餌することにより人為的な調整が可能である。上記の知見をもとに、特定のアミノ酸配合率を有する人工合成餌を給餌したマウスにマラリア原虫を感染させた結果、コントロール餌群と比べ赤血球感染率が有意に減少することが明らかとなった。網羅的な宿主血中遊離アミノ酸情報（アミノ酸インフォマティクス）を解析パラメータとしたこれらの実験結果は、感染症に対する新規アプローチの有効性を強く示唆するものである。

IV. マラリア媒介蚊における非共生細菌の表現型揺らぎ

共生・寄生の関係にある生物は、双方に密接な生物間相互作用とそれを介した自然選択が作用し、共進化が進むと考えられる。我々は、節足動物媒介性疾患であるマラリア原虫（*Plasmodium*）と、その媒介節足動物であるハマダラカ（*Anopheles stephensi*）、そして蚊の非共生細菌であるセラチア菌（*Serratia marcescens*）に着目することで、限局されたコンパートメント内における生物間相互作用を解明することを試みた。まず我々は、セラチア菌とハマダラカの実験室内共生系の形成過程における、セラチア菌の各種表現型の変化と、それに伴うハマダラカのマラリア原虫感染率の推移を詳細に観察した。はじめに、ハマダラカ中腸内に生着できないセラチア菌野生株（HB3）に、蚊の中腸内で選択圧を与えることによって、セラチア菌の形質転換をおこなった。その結果、蚊の中腸内に生着可能な菌株（HB18）を作出することに成功した。また、HB3

がHB18に形質転換する過程を観察した結果、オリジナルであるHB3は、各種表現型が多様であるのに対し、HB18は細胞形態および鞭毛の形成能力における多様性が著しく減少していることが明らかとなった。さらに、HB3はマラリア原虫の分化抑制能を有する一方、HB18はこの能力が欠損していることも明らかとなった。マラリア流行地域である西アフリカ（ブルキナファソ）で採取した野生ハマダラカ中腸から分離されたセラチア菌群について、各種表現型とマラリア原虫抑制能力の相関解析を行ったところ、細胞形態および鞭毛の形成能力とマラリア原虫抑制能力の間には強い相関関係が見出された。これらの結果は、腸管内非共生細菌の表現型揺らぎの振幅が、宿主やその寄生体の適応・進化に大きく影響を与えている可能性を示唆している。

V. 寄生性線虫の生活環における環境応答性トランジション機構

寄生性線虫であるフィラリアの生活環は、媒介昆虫（蚊）と哺乳動物宿主の二つの動物ステージを経て完結する。蚊－宿主間の移行に伴う温度変化の“乗り越え（適応）”システムを解明するため、犬フィラリア（*Dirofilaria immitis*）の第3期幼虫（L3）における脱皮機構をモデルとして解析した。このL3は、吸血時に蚊から宿主へ移行する際に、急激な環境変化を経験する。フィラリアの脱皮をin vitroで再現し、温度（37℃）と栄養環境の二つが蚊から宿主への移行時におけるフィラリア発育の重要な刺激因子であることを見出した。その際、自由生活線虫である*C. elegans*では、熱応答パラメータである*hsp70*の発現が持続的に維持されるのに対し、フィラリアではごく短時間にその応答が収束することが明らかになった。これらの環境刺激によって誘導される遺伝子群を同定したところ、クチクラ関連因子（cut-1）、フォン・ヴィレブランド様因子（vWFA）およびシステインプロテアーゼ（カテプシン-L）が見出された。これらの遺伝子のノックダウンによりL3の脱皮が抑制されたことから、寄生性線虫であるフィラリアは、温度変化に対する適応機構とともに、それを刺激としてライフサイクルを促進する遺伝子制御メカニズムを有することが示された。また、*C. elegans*のJNKおよびp38は37℃環境下において迅速に活性化するのにに対し、フィラリアでは両方とも低レベルの活性上昇に留まった。興味深いことに、フィラリアのJNKは第6エクソンの重複によりキナーゼドメインの一部が繰り返される構造を取っていることが明らかになっ

た。この特徴的な遺伝子構造は、他の寄生性糸条虫であるマレー糸状虫 (*Brugia malayi*) およびロア糸状虫 (*Loa Loa*) においても保存されていた。これらの結果から、フィラリアは温度変化を利用して、“乗り越え”のみならず発育の“切り替え”(トランジション)を行っていると考えられる。

Ⅵ. ハエ類による病原細菌の摂食媒介

節足動物による感染症媒介において、その感覚器官が重要な役割を持つことが知られている。マラリア媒介蚊などの吸血性節足動物は、分泌物、体温またはCO₂濃度などを様々な付属肢により認識し、標的宿主を効率的に捉える。一方、イエバエのように、病原体を食品などに直接運ぶタイプの節足動物では、脚や体表などを介したシンプルな機械的伝播方式が主流であると考えられている。我々は、ハエ類による病原体の機械的伝播メカニズムを解析するために、以下のような実験モデル系を構築した。平板寒天培地上にGFP発現大腸菌をスポット状に滴下し、その上でキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を自由行動下にて飼育した後、GFPの蛍光を追跡することにより、大腸菌の挙動を解析した。その結果、ショウジョウバエの腹部に大腸菌摂食の結果とみられる強いGFPの蛍光が認められた。さらに、寒天培地上のショウジョウバエ糞内にも大腸菌が観察されたことから、ショウジョウバエは細菌を直接摂食し、糞を介して効率的に感染拡大を引き起こすことが示された。この媒介は、触覚を切除したショウジョウバエではほぼ消失し、嗅覚受容体サブユニットをコードする *Or83b* 遺伝子の変異体ショウジョウバエでもその効率は激減することから、ショウジョウバエは細菌由来の化学物質を触覚における嗅覚により認識することが予想された。そこで、ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) を用いて、ショウジョウバエを誘引する細菌由来の化学物質の同定を試みた。その結果、インドールやブタノールが同定され、ショウジョウバエを用いた誘引実験でその効果が確認された。以上の結果から、細菌の誘引物質がハエ類に直接摂食を誘導し、媒介が促進されることが示唆された。

「点検・評価」

1. 研究について

講座担当教授として新たに嘉糠洋陸が着任し、従来の原虫学ならびに蠕虫免疫学に加え、衛生動物学が講座研究領域として加えられた。これにより、各種寄生虫種の生活環全体を俯瞰的に構築できるよ

うなった結果、新規と既存研究テーマとの有機的連携が促進され、講座研究体制が大いに補完された。それに伴い、ポスドク研究員2名、大学院博士課程学生2名、臨時研究職員1名が新たに参画、また研究費では内閣府最先端次世代・研究開発支援プログラム1件、文科省科研費2件、財団助成金等2件、学内研究奨励費1件を擁し、十分な研究実施状況と相成った。また、分子生物学実験室、共焦点レーザー顕微鏡を有する顕微鏡室、感染動物飼育室、感染動物実験室、昆虫飼育室、感染用培養室等を順次整備し、名実共に「真核生物の病原体を研究対象とする最先端研究グループ」の基盤が整いつつある。このような状況のもと、宿主(媒介動物)と寄生虫間の相互作用に関する新規の基礎研究課題を4つ立ち上げた。また臨床指向研究課題として、寄生虫症の迅速・簡便診断法の開発と、Maggot Debridement Therapyの技術改良を目指した調査研究に着手した。熱帯医学は寄生虫学・医動物学を内包し、その研究対象も多岐に渡る。当講座は、伝統的に講座構成員が個別の課題に取り組む姿勢を大事にしており、引き継いだ嘉糠もそれを踏襲した。それにあたり肝要なことは、まず方法を含めて仮説の証明または実用化が可能かを見定め、さらにその研究の寄生虫学・医動物学における意義の高さを判断し、より普遍的で新しい概念を提起することである。多様性のある研究テーマを、講座構成員の全員参加型議論により、前向きに検証することが望ましい。

2. 教育について

全教員が「寄生虫と感染」ユニットの講義と実習、「感染・免疫テュートリアル」「研究室配属」および「選択実習」を、一部教員が「免疫と生体防御ユニット」を担当した。寄生虫症自体はマイナーな鑑別疾患でありながら、何れの診療科にも現れる可能性があるステルス型疾患であることから、従来のコアカリキュラムに準拠しつつも医療現場のニーズに則した講義・実習を心掛けた。しかし、寄生虫症の国内での疾病構造の急激な変化、および国際社会の発展に伴う寄生虫感染症のボーダーレス化を踏まえ、寄生虫講義のシラバス再検討(=講義内容選択)と、実習内容(特に検査法項目)のブラッシュアップを進める必要性を再認識した。

研 究 業 績

I. 原著論文

- 1) Sawaguchi M¹⁾, Tanaka S¹⁾, Nakatani Y¹⁾, Harada Y²⁾, Mukai K³⁾, Matsunaga Y⁴⁾, Ishiwata K, Oboki K (Natl. Res. Inst. Child Health Develop.), Kambayashi

- T (Univ. Pennsylvania), Watanabe N, Karasuyama H³⁾ (³Tokyo Med. Dent. Univ.), Nakae S (Univ. Tokyo), Inoue H⁴⁾ (⁴Kyushu Univ.), Kubo M^{1,2)} (¹RIKEN, ²Tokyo Univ. Sci.). Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. J Immunol 2012; 188(4): 1809-18.
- 2) Makioka A, Kumagai M, Hiranuka K (Kyoto Univ.), Kobayashi S¹⁾, Takeuchi T¹⁾ (¹Keio Univ.). Different structure and mRNA expression of *Entamoeba invadens* chitinases in the encystation and excystation. Parasitol Res 2011; 109(2): 417-23.
- 3) Doi Y, Shinzawa N, Fukumoto S, Okano H, Kanuka H. Calcium signal regulates temperature-dependent transformation of sporozoites in malaria parasite development. Exp Parasitol 2011; 128(2): 176-80.
- 4) Kuranaga E, Matsunuma T, Kanuka H, Takemoto K, Koto A, Kimura K, Miura M. Apoptosis controls the speed of looping morphogenesis in *Drosophila male* terminalia. Development 2011; 138(8): 1493-9.
- T¹⁾, Wakaguri H¹⁾, Suzuki Y¹⁾, Sugano S¹⁾, Watanabe J¹⁾ (¹Univ. Tokyo), Makioka A. Transcriptome analysis of *Entamoeba* using next generation sequence data. 17th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. Nara, Sept. [Program of the 17th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases]
- 5) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 渡辺直熙, 平糠和志 (京大), 小林正規¹⁾, 竹内 勤 (¹慶応大). *Entamoeba invadens* の 4 種のキチナーゼの構造及び嚢子形成・脱嚢における発現の違い, 第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 7 月. [第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会プログラム・抄録集]
- 6) 熊谷正広, 西野多聞, 嘉糠洋陸, 林 淳也, 中澤 靖, 堀 誠治, 今村浩子 (あまきクリニック). スナノミ症の 1 例および日本における過去の症例について, 第 29 回北陸病害動物研究会, 金沢, 7 月. [第 29 回北陸病害動物研究会プログラム・抄録集 2011; 29(1): 16]
- 7) 熊谷正広, 西野多聞, 嘉糠洋陸, 林 淳也, 中澤 靖, 堀 誠治, 今村浩子 (あまきクリニック). 本邦におけるスナノミ症-自験例を含めて, 第 81 回日本寄生虫学会大会, 西宮, 3 月. [第 81 回日本寄生虫学会大会プログラム・抄録集 2012; 96]
- ## II. 総 説
- 1) 熊谷正広, 西野多聞. 【新版 感染症診療実践ガイド 有効な抗菌薬の使いかたのすべて】主な感染症に対する実地医家の抗菌薬使用の実際 主要感染症からみた抗菌薬の選択と使用の実際 マラリア. Med Pract 2011; 28(臨増): 506-9.
- 2) 横山卓也, 青沼宏佳, 嘉糠洋陸. 自然免疫の応答と制御 その共通性と多様性 病原体を運ぶ蚊の免疫システム. 化と生 2012; 50(3): 196-202.
- ## III. 学会発表
- 1) 石渡賢治. 腸管内寄生蠕虫感染における宿主免疫応答. 平成 23 年度第 5 回日本大学生物資源科学部動物医科学研究センターセミナー. 藤沢, 9 月.
- 2) 熊谷正広, 平糠和志 (京大), 片山俊明¹⁾, 若栗浩幸¹⁾, 鈴木 穰¹⁾, 菅野純夫¹⁾, 渡辺純一¹⁾ (¹東大), 牧岡朝夫. RNA-seq 法を用いた *Entamoeba* のトランスクリプトーム解析. 第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 7 月. [第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会プログラム・抄録集]
- 3) 平糠和志 (京大), 片山俊明¹⁾, 若栗浩幸¹⁾, 鈴木 穰¹⁾, 菅野純夫¹⁾, 渡辺純一¹⁾ (¹東大). *Entamoeba* 完全長 cDNA ライブラリーデータベース 'Full-Entamoeba' と次世代シーケンスデータの統合. 第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 7 月. [第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会プログラム・抄録集]
- 4) Kumagai M, Hiranuka K (Kyoto Univ.), Katayama