

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19083

研究課題名(和文)多包虫がもつ宿主補体活性からの逃避機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of complement-inhibitory function in larval stage of *Echinococcus multilocularis*

研究代表者

佐々木 瑞希 (Mizuki, Sasaki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00632126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：多包虫症は、多包条虫の幼虫(包虫)が中間宿主の肝臓や肺およびその他の臓器で増殖することにより引き起こされる感染症である。包虫は中間宿主の補体系による細胞傷害を回避しながら増殖すると言われている。そのメカニズムを明らかにするため、補体経路の阻害に関与すると考えられるセリンプロテアーゼインヒビターを3つ同定し、その機能を解析した。その結果、これらは補体阻害能を示さなかったが、多包虫の分裂が活発な胚細胞ならびに条虫において特有に見られる石灰小体に局在していることが明らかとなり、幼虫の発育においてセリンプロテアーゼインヒビターとしての機能、あるいはそれ以外の機能を担っていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Alveolar echinococcosis (AE) is a zoonotic infectious disease caused by the larval stage of the cestode *Echinococcus multilocularis*. In humans, metacestodes develop asexually like a tumor, mainly in the liver. I identified new genes of the serpin family (serpin) in *E. multilocularis* using genome and gene data sets, and attempted to determine their functions as inhibitor of complement cascade. As a result, all of three serpins did not show the complement-inhibitory activity. However, I demonstrated the secretion of these gene products from larval stage of *E. multilocularis* and protein expression in the germinal layer the parasite.

研究分野：寄生虫学

キーワード：多包虫症 補体

1. 研究開始当初の背景

多包虫症はイヌ科動物を終宿主とする多包条虫 (*Echinococcus multilocularis*) の幼虫 (多包虫) がヒト肝臓に寄生することによって引き起こされる感染症であり、現在も北海道において発生が見られる。ヒト肝臓においては多包虫の胚細胞が無限に増殖して多数の小胞を形成する。感染後、成人では約10年、小児では進行が早く数年で悪性腫瘍様の病像を呈する。外科手術以外の有効な治療法がなく、新たな治療法の開発が求められているが、宿主体内における寄生虫の動態とこれに対する宿主の免疫応答について情報が少なく困難な状況にある。肝臓で浸潤増殖する多包虫は宿主の免疫応答に絶えずさらされており、虫体は抗体および補体活性化の最終産物である膜侵襲複合体により傷害されるはずである。しかしながら、多包虫は傷害を受けることなく増殖可能である。このことから、多包虫は補体による傷害から逃避するしくみを持つと考えられるが、その機序については不明である。

補体活性化経路において、セリンプロテアーゼ活性を持つ分子が重要な働きを担うことが知られている。古典経路はC1r と C1s の活性化により開始するが、これらはセリンプロテアーゼであり、C2 および C4 を分解する。代替経路ではセリンプロテアーゼである D 因子が C3b に結合した B 因子を切断し、B 因子もまたセリンプロテアーゼとして活性化する。レクチン経路ではマンノース結合レクチンが病原体に結合するとマンノース関連セリンプロテアーゼ (MASP) 1 および 2 が活性化し、古典経路と同様に C2 および C4 を分解する。全ての経路において、セリンプロテアーゼとしての機能を持つ分子がカスケードの進行に重要な役割を果たし、最終産物である膜侵襲複合体が形成される。

補体による応答のバランスをとるため、宿主には C1 インヒビター (C1INH) による古典経路の調節機構が存在している。C1INH はセリンプロテアーゼインヒビター (serpin) ファミリーの一員であり、C1r および C1s の抑制因子として機能する。serpin ファミリー遺伝子は脊椎動物以外の動物においても広く保存されており、多包虫がこの機構を利用して宿主の補体活性を抑制している可能性がある。多包条虫の serpin ファミリー分子として serpinEmu (Merckelbach and Ruppel 2007) が知られているが、この分子の補体阻害活性については明らかになっていない。

2. 研究の目的

多包条虫の幼虫 (多包虫) は中間宿主の肝臓に寄生している間、抗体補体複合体による免疫応答に常時さらされているにもかかわらず、浸潤・増殖が可能である。しかしながら、多包虫がどのような機構で補体による傷害から逃避しているのかは不明である。脊椎動物の

セリンプロテアーゼインヒビター (serpin) は補体活性化経路の調整に重要な役割を果たしている。本研究では、多包条虫がもつ serpin ファミリー分子を探索し、その機能を解析することで、宿主の免疫応答に対する逃避機構のしくみの一端を解明する。これにより、未だ治療法のない多包虫症対策につなげるとともに、serpin ファミリー分子の機能の変化と多包虫の寄生への適応進化の関係を探る。

Echinococcus は他の条虫と異なり幼虫が中間宿主の体内で無数の原頭節を形成するが、宿主への適応機構や増殖能の詳細については不明な点が多い。本研究により、多包条虫という特殊な生態を持つ条虫が進化の過程で手に入れた宿主への適応機構が明らかになる。脊椎動物において過剰な免疫応答を抑制する分子と起源を同じくする分子が、条虫では宿主における増殖に有利に働いているとすれば、『寄生に適応するための進化』という寄生虫学における最大のテーマの解明に貢献することは間違いない。未だ有効な治療法がない本感染症に対する新たな対策にもつながる。

3. 研究の方法

(1) 多包虫セリンプロテアーゼインヒビターファミリー分子の同定

多包条虫のゲノム解読が行われ、情報が公開されている (Tsai et al. 2013)。多包条虫ゲノムならびにトランスクリプトームデータから、tBLASTn を用いて C1INH と相同な配列を検索した。

(2) 組み換えタンパク質の発現と試験管内における補体活性阻害能評価

多包条虫 serpin ファミリー分子の組み換えタンパク質を作成し、試験管内における各種セリンプロテアーゼ活性阻害能ならびに補体活性阻害能を評価した。

(3) 虫体における発現の確認とターゲット分子の探索

それぞれの分子に対する抗血清を作成し、多包虫における発現ならびに局在を観察した。また、虫体において serpin ファミリー分子が実際にターゲットとしている分子を探索した。

4. 研究成果

(1) 多包虫セリンプロテアーゼインヒビターファミリー分子の同定

多包条虫ゲノムならびにトランスクリプトームデータから、tBLASTn を用いて C1INH と相同な配列を検索した。その結果、既知の serpinEmu (EmuJ-1193100) を含む 3 つの配列を見出した (SerpimEmu、Serpim2Emu、ならびに Serpin3Emu)。これらの配列について、多包虫 cDNA から RACE 法を用いてコード領域の塩基配列完

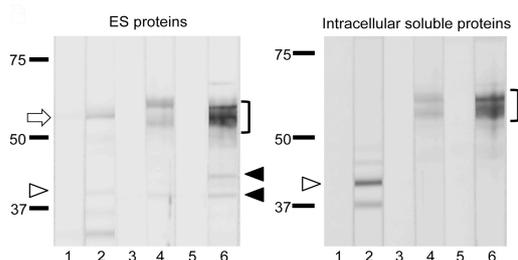
全長を明らかにした。いずれの分子も **serpin** スーパーファミリーに共通する配列を有していた (Pfam ID: PF00079)。なお、同様にして種々の動物の **serpin** ファミリー分子と相同な配列を検索したところ、上記 3 つの配列以外は検出できなかったことから、多包条虫が持つ **serpin** ファミリー分子はこれら 3 つのみと考えられた。

(2) 組み換えタンパク質の発現

同定した 3 つの多包条虫セリンプロテアーゼインヒビター分子 (**SerpimEmu**, **Serpim2Emu**, **Serpim3Emu**) について、大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質を作成した。このうち組み換え **SerpimEmu** のみが可溶性となり、他の 2 つは不溶性となった。しかしながら、コムギ胚を用いた無細胞系での発現により可溶性のタンパク質が得られた。大腸菌を用いて作成した組換えタンパク質をポリクローナル抗体作成に、コムギ胚を用いて作成した組換えタンパク質を補体活性阻害試験に用いることとした。

(3) 虫体における発現の確認とターゲット分子の探索

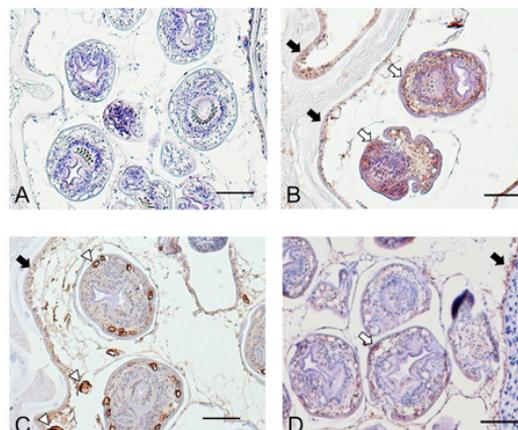
多包虫セリンプロテアーゼインヒビターファミリー分子に宿主補体活性阻害能は認められなかったが、他の機能を持つ可能性が考えられた。大腸菌発現系を用いて作成した組換えタンパク質をもとに 3 つの **Serpim** 分子に対するポリクローナル抗体を作成し、これを用いたウエスタンブロットにより多包虫虫体抗原ならび **Excretory-secretory (ES)** タンパク質における局在を調べた。その結果、全ての **Serpim** 分子が虫体内のみならず **ES** タンパク質中に含まれ、虫体外に分泌されていることがわかった (図)。



ES タンパク質 (左) および虫体内可溶性タンパク質中に見られる **SerpimEmu** (レーン 2)、**Serpim2Emu** (レーン 4)、**Serpim3Emu** (レーン 6)

さらに、免疫染色により幼虫ステージでの局在を観察した。その結果、**SerpimEmu** および **Serpim3Emu** は胚細胞層および原頭節に発現が見られたが、**Serpim2Emu** については石灰小体に強く発現していた (図)。石灰小体は補体活性抑制作用を示すことが知られている (Kassis and Tanner 1976)。3 種類

のポリクローナル抗体を用いた免疫沈降法により、虫体あるいは宿主タンパク質から **Serpim** のターゲットとなる分子の同定を試みたが、目的のタンパク質は得られなかったため、さらなる条件検討が必要である。



3 つの **Serpim** 分子の局在を示す免疫染色像。
A. ネガティブコントロール、B. **SerpimEmu**、
C. **Serpim2Emu**、D. **Serpim3Emu**

(4) 試験管内における補体活性阻害能評価

補体活性測定キットを用いて可溶性の組換えタンパク質の補体活性阻害能を調べた。しかしながら、いずれのタンパク質においても宿主補体活性の阻害効果は認められなかった。これらは宿主の補体経路を阻害しないことが分かった。一方で、多包虫 **ES** タンパク質 (分泌抗原) は代替経路とレクチン経路、細胞内可溶性タンパク質は古典経路とレクチン経路を阻害することを見出した。今後は、とくに虫体外に分泌される **ES** タンパク質中の補体活性阻害分子の同定を目標にする。

<引用文献>

Merckelbach and Ruppel 2007. Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*. Mol. Biochem. Parasitol. 156: 84-88.

Kassis and Tanner 1976. The role of complement in hydatid disease: in vitro studies. Int. J. Parasitol. 6: 25-35.

Tsai et al. 2013. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. Nature 496: 57-63.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Sasaki M., Sako Y. 2017. The putative serine protease inhibitor (serpin) genes encoded on *Echinococcus multilocularis* genome and their expressions in metacystod stage. *Veterinary Parasitology* 233: 20-24.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 佐々木瑞希、in vitro 培養系における *Hymenolepis microstoma* 六鉤幼虫の発育、第 9 回蠕虫研究会、2015 年 7 月 17 日、岩手県
- ② 佐々木瑞希、in vitro 培養系における *Hymenolepis microstoma* 幼虫ステージの発育、第 23 回分子寄生虫学ワークショップ・第 13 回マラリア研究フォーラム合同大会、2015 年 8 月 30 日、北海道
- ③ 佐々木瑞希・迫康仁、多包虫は宿主の補体活性を阻害するー多包虫セリンプロテアーゼインヒビターのはたらきー、第 61 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2015 年 10 月 10 日、北海道
- ④ Sasaki M. and Sako Y. *Echinococcus multilocularis* evades host complement system: the function of *E. multilocularis* serinprotease inhibitor family. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会、2015 年 12 月 1 日、兵庫県
- ⑤ 佐々木瑞希・迫康仁、多包虫は宿主の補体活性を阻害するー多包虫セリンプロテアーゼインヒビターのはたらきー、第 85 回日本寄生虫学会大会、2016 年 3 月 19 日、宮崎県
- ⑥ 佐々木瑞希、*Hymenolepis microstoma* 幼虫の成熟における 昆虫細胞との“接触”の意義、第 62 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2016 年 10 月 15 日、青森県
- ⑦ Mizuki Sasaki、Observation of development of *Hymenolepis microstoma* larval stage in vitro by co-culture with mammalian cells. 第 86 回日本寄生虫学会大会、2017 年 5 月 28 日、北海道
- ⑧ 佐々木瑞希、*Hymenolepis* 属条虫の自家感染メカニズムの解明に向けて。第 25 回分子寄生虫学ワークショップ / 第 15 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2017 年 8 月 27 日

[その他]

旭川医科大学寄生虫学講座ホームページ
<https://asahikawa-parasitology.jimdo.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 瑞希 (SASAKI, Mizuki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：00632126