

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05023

研究課題名(和文) イヌ・リーシュマニア症におけるエキソソームRNAの解析と早期診断法の開発

研究課題名(英文) Molecular analysis of small nucleic acid molecules for the development of novel diagnostic methods of canine leishmaniasis

研究代表者

片倉 賢 (KATAKURA, KEN)

北海道大学・獣医学研究院・特任教授

研究者番号：10130155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：イヌのリーシュマニア症はリーシュマニアという寄生虫による慢性の感染症です。この研究の目的は、この寄生虫に感染しているかどうかを正確に判断するために、精度の高い診断法を開発することです。リーシュマニアに野外で感染した犬、実験的に感染させた犬やマウスの血液を調べたところ、リーシュマニア由来のセルフリーDNAやsmall RNAと呼ばれる小さな核酸分子が血液中にごく微量含まれていました。したがって、これらの低分子核酸はリーシュマニア症の新しい診断マーカーとして役に立つ可能性のあることが分かりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、リーシュマニアという寄生虫に感染しているかどうかを、できるだけ早期にそして正確に判断するために、より精度の高い診断法を開発することを目的として行われました。リーシュマニアに感染した犬やマウスの血液を調べたところ、リーシュマニア由来の小さな核酸分子が、感染動物の血液中にごく微量含まれていることが分かりました。用いた次世代シーケンスデータ解析技術は、1つの検体から様々な情報を得ることができる技術です。今回、この方法が寄生虫感染の診断にも応用できることを実証することができました。この結果は、今後のさらなる診断技術の開発・改良に貢献するものです。

研究成果の概要(英文)：Canine leishmaniasis is a chronic disease caused by infections with several Leishmania species. This study aims to develop more sensitive novel diagnostic methods of leishmaniasis based on analysis of small nucleic acids such as cell-free DNA and small RNA molecules in the peripheral blood. Cell-free DNAs of possible Leishmania-origin were detected by next generation sequence analysis from the blood of Leishmania donovani-infected stray dogs captured in the endemic area of human visceral leishmaniasis in Bangladesh. Meanwhile, small RNA molecules derived from possible Leishmania rRNAs and tRNAs were detected in the blood of mice 2 weeks after experimental infection with Leishmania donovani. These results suggest that small nucleic acids such as cell-free DNA and small RNA molecules are useful for novel diagnostic molecular markers of leishmaniasis.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：イヌ・リーシュマニア症 人獣共通感染症 エキソソームRNA セルフリーDNA 早期血清診断法 次世代診断法 低分子核酸 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

(1) 内臓リーシュマニア症におけるイヌの役割

旧大陸におけるヒトの内臓リーシュマニア症は、ヨーロッパから北アフリカおよび中東にかけては *Leishmania infantum* が原因虫種である。これらの地域では、イヌが保虫宿主としての役割を果たしている zoonotic な伝播である。一方、東アフリカ諸国やインド亜大陸（インド、ネパールおよびバングラデシュ）の内臓リーシュマニア症では、*Leishmania donovani* が主要原虫種であり、これらの地域では、リーシュマニア原虫がサシチョウバエによってヒトからヒトへ伝播される anthroponotic な伝播であるといわれている。しかし、われわれは、バングラデシュでは、野犬がリーシュマニアに不顕性に感染していることを突き止めた。そのため、リーシュマニアの保虫動物の調査には、不顕性感染をより高精度に診断できる新規免疫診断法の開発や微量な原虫由来の核酸を検出する次世代型診断法の開発が必要であると考えた。

(2) *L. donovani* によるイヌ・リーシュマニア症モデルの実験結果

イヌにおける *L. infantum* の自然感染症例や実験感染例は数多く報告されている。しかし、イヌにおける *L. donovani* の感染病態解析に関する報告はきわめて少ない。そこでわれわれは、ビーグル犬を用いて原虫接種実験を実施し、リーシュマニア原虫が不顕性感染すること、また、分子量約 88 kDa の抗原（抗原 X）に対する抗体を長期にわたり産生していることを突き止めた（科学研究費助成事業研究成果報告書、2012~2014、課題番号 24380163）。

(3) 低分子核酸（small nucleic acids）をリーシュマニア感染のバイオマーカーとする可能性

近年、ヒトやマウスの各種細胞からエキソソーム（エクソソーム）と呼ばれる直径 30-100 nm の膜小胞が放出され、細胞間の情報伝達機能を介して、宿主の免疫機能などを調節していることが明らかになってきた。エキソソームは、リーシュマニア原虫をはじめ各種寄生虫からも放出されていることが判明しており、エキソソームに含まれる分子の役割についての解析が進められている。しかし、リーシュマニア原虫由来のエキソソームには、真核生物で通常にみられるようなマイクロ RNA（miRNA）分子は存在せず、small non-coding RNA 分子である ribosomal RNA 断片（中央長が 39 塩基長）や transfer RNA の断片（中央長が 55 塩基長）を多く含んでいることが報告されている（Lambertz et al., 2015）。これまでのところ、ヒトのリーシュマニア症やリーシュマニア症モデル動物からリーシュマニア原虫由来の small RNA 分子が検出されたとの報告はない。一方、セルフリー DNA（cfDNA）分子は、細胞死によって細胞から放出された遊離 DNA が血液や尿中に出現するものであり、腫瘍細胞マーカーとして研究が進められている。しかし、リーシュマニア症における研究は皆無である。

2. 研究の目的

イヌの内臓型リーシュマニア症は慢性感染症であり、不顕性感染も多いことが知られている。したがって、本症の早期診断ならびに不顕性感染の検出は臨床的にも疫学的にも重要である。本研究では、診断ツールの感度向上を目的とし、免疫血清診断法の新規抗原を検索するとともに、血中の低分子核酸であるセルフリー DNA や small RNA 分子が次世代型診断マーカーになり得るか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1) 血清診断用の新規抗原 X の同定

L. donovani の promastigote 型虫体の抗原を電気泳動し、感染犬血清と反応する目的のバンドを切り出し、質量分析装置（TOF MS/MS）を用いて蛋白質 X 候補のペプチド情報を得た。Mascot（<http://www.matrixscience.com/>）を用いてデータベース検索し、蛋白質 X 候補を得た。遺伝子 X の遺伝子情報はリーシュマニアのゲノムデータベースから検索した。

(2) 抗原 X 遺伝子のクローニングと組換え蛋白質 X の作製

遺伝子 X を PCR 増幅し、pET30a ベクターに挿入した。大腸菌で発現させたのち、ニッケルカラムで精製し、組換え蛋白質を得た。

(3) 組換え蛋白質 X のウエスタンブロット解析

L. infantum に自然感染したイヌの血清（陽性血清）とリーシュマニア症の非流行地のイヌの血清（陰性血清）を用いて、ウエスタンブロットの条件を標準化した。実験ビーグル犬およびバングラデシュの野犬血漿を用いて、組換え蛋白質 X に対する抗体の有無を検討した。

(4) *L. donovani* 由来 cfDNA の解析

バングラデシュにおけるヒトのリーシュマニア症の流行地で捕獲した 14 頭の野犬を対象に、血漿中に遊離する cfDNA を網羅的に解析し、寄生虫由来 DNA の検出を試みた。抽出した cfDNA を材料に次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) によるメタゲノム解析を行い、イヌ由来配列を参照ゲノム配列へのマッピングにより除去した後、NCBI nt (non-redundant nucleotide sequences) データベースを用いて、BLASTn プログラムによる相同性検索を行った。

(5) *L. donovani* 由来 small RNA の解析

上記 (4) のイヌの血清または血漿材料から RNA を抽出し、small RNA ライブラリーの作製を試みた。また、当初の実験計画にはなかったが、実験的リーシュマニア感染マウスの末梢血中に原虫由来 small RNA 分子が存在するかについても併せて検討した。解析には、凍結保存してあった *L. donovani* ならびに *L. amazonensis* を感染させた BALB/c マウスの血漿を用いた。感染後それぞれ 2 週間および 2 か月後の血漿を 5 頭分プールし、RNA 抽出したのち、small RNA ライブラリーを作製し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) によるメタゲノム解析を行った。マウス由来配列を除去した後、*L. donovani* データベース (ASM22713v2) との相同性検索を行った。

4. 研究成果

(1) 血清診断用の新規抗原 X の分析

SDS-PAGE から候補抗原分子を切り出して、質量分析 (LC-MS/MS) を行った。得られたデータを MASCOT プログラムで解析したところ、ペプチド情報から得られたタンパク質は GP63、heat shock protein 70 (HSP70)、HSP83、mitochondrial chaperonin HSP60、tubulin beta chain であった。もっともスコアの高い HSP70 を選択し、1962 塩基長の *L. donovani* の HSP70 遺伝子を増幅し、pET30a ベクターに挿入した。大腸菌で発現させたのち、ニッケルカラムで精製し、組換え蛋白質 (rLdHSP70) を得た。これを抗原として、ウエスタンブロット解析を行った。

その結果、rLdHSP70 は、陽性コントロールであるイヌ・リーシュマニア症の臨床例の血清およびバングラデシュの野犬の一部と強く反応した。しかし、実験感染ビーグル犬においては、抗体を産生しているとの確証を得ることができず、rLdHSP70 が *L. donovani* 感染によるイヌ・リーシュマニア症の早期診断に有用であるとの結論を得るには至らなかった。

(2) *L. donovani* 由来 cfDNA の網羅的解析

バングラデシュの野犬 14 頭から抽出した cfDNA をメタゲノム解析した結果、各サンプルあたり約 2,300 万の配列を得た。イヌ由来配列を除去した後、相同性検索を行った結果、寄生虫種の配列と高い相同性を示すリードが計 150 配列得られた。線虫類の配列は糸状虫の感染を反映しており、それらの共生菌と考えられる *Wolbachia* 菌の配列も検出された (表 1)。原虫類の検出はリーシュマニアとバベシア (*Babesia*) の感染を反映しており (表 1)、現地の野犬は複数の寄生虫に混合感染していることが強く示唆された。このことから、イヌ血中の cfDNA は、寄生虫感染を診断するバイオマーカーとして有望であることが示された。

血液を対象とした PCR による原虫検出結果と血中 cfDNA の検出結果を比較すると、赤血球内に寄生するバベシアでは両結果に一致が認められた。しかし、マクロファージ系細胞に寄生するリーシュマニアでは、両者の検査結果は必ずしも一致しなかった。cfDNA が死滅した細胞から放出され、かつ半減期が短いことを考慮すると、リーシュマニア感染犬の末梢血中には、原虫に感染した細胞が存在すること、ならびに死滅原虫の残骸が出現していることが示唆された。今後、寄生虫のゲノム情報がさらに蓄積されるに伴って、cfDNA 解析法がより精度の高い寄生虫感染診断法として発展する可能性が期待された。

(3) 末梢血液中の *L. donovani* 由来 RNA の解析

当初、血漿サンプルからエキソソームを回収し、その後 RNA を回収する計画であった。しかし、サンプル量が少ないことから、血漿材料から直接 RNA を回収した。リーシュマニアの cfDNA が検出されたバングラデシュの野犬の血漿では、回収 RNA 量が不十分であり、それに続く解析は実施できなかった。一方、*L. donovani* ならびに *L. amazonensis* 感染マウスの血漿については、small RNA ライブラリーを作製することに成功し、それぞれ約 1,630 万と約 1,140 万の配列が得られた。データ解析の結果、そのなかでリーシュマニアに固有配列はそれぞれ 71 (28-40 塩基長) と 15 配列 (28-40 塩基長) であり、配列の一部はリーシュマニアの rRNA および tRNA 由来であった。先行研究の結果と長期血漿保存における RNA 分子の安定性を考慮すると、検出されたリーシュマニアの rRNA はエキソソーム由来であると考えられた。以上、リーシュマニアに感染したマウスでは感染初期の末梢血中にリーシュマニア由来の低分子 RNA が出現することが明らかになり、次世代型診断マーカーになり得る可能性が示された。

表 1. *Leishmania*、*Babesia*、および *Wolbachia* と相同性が見られた配列

寄生虫/細菌	シーケンス ID	塩基長 (bp)	コード遺伝子
<i>Leishmania</i>	Leishmania1_32	149	不明
	Leishmania2_36	77	不明
	Leishmania3_43	80	不明
	Leishmania4_43	133	不明
<i>Babesia</i>	Babesia1_30	79	不明
	Babesia2_30	147	<i>B. gibsoni</i> BgP32 gene
	Babesia3_30	131	<i>B. gibsoni</i> small GTP binding protein rab11
	Babesia4_37	169	不明
	Babesia5_37	92	不明
	Babesia6_37	151	<i>B. gibsoni</i> 18S ribosomal RNA gene
	Babesia7_39	145	<i>B. bigemina</i> TRANSLATION elongation factor
	Babesia8_49	116	<i>B. bovis</i> histone 2B protein gene
	Babesia9_49	72	<i>B. gibsoni</i> BgSA1 gene for secreted antigen 1
	Babesia10_49	151	<i>B. gibsoni</i> thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene
	Babesia11_51	61	<i>B. bigemina</i> 28S ribosomal RNA gene
<i>Wolbachia</i>	Wolbachia1_43	140	不明
	Wolbachia2_49	114	不明
	Wolbachia3_49	161	不明
	Wolbachia4_49	169	不明

<引用文献>

Lambertz U, Oviedo Ovando ME, Vasconcelos EJ, Unrau PJ, Myler PJ, Reiner NE : Small RNAs derived from tRNAs and rRNAs are highly enriched in exosomes from both old and new world *Leishmania* providing evidence for conserved exosomal RNA Packaging. BMC Genomics, 16, 151, 2015. DOI:10.1186/s12864-015-1260-7

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件) (すべて査読有り)

Akter S, Nakao R, Imasato Y, Alam MZ, Katakura K: Potential of cell-free DNA as a screening marker for parasite infections in dog. Genomics in press.

DOI: 10.1016/j.ygeno.2018.05.020

Qiu Y, Kaneko C, Kajihara M, Ngonda S, Simulundu E, Muleya W, Thu MJ, Hang'ombe MB, Katakura K, Takada A, Sawa H, Simuunza M, Nakao R: Tick-borne haemoparasites and Anaplasmataceae in domestic dogs in Zambia. Ticks Tick Borne Dis 9, 988-995, 2018.

DOI: 10.1016/j.ttbdis.doi:10.1186/1756-3305-7-357

Bawm S, Kakisaka K, Thu MJ, Chel HM, Oo YMN, Soe NC, Win SY, Htun LL, Win MM, Suzuki H, Nakao R, Katakura K: First molecular detection of *Theileria luwenshuni* from goats in Myanmar. Parasitol Res 117, 3361–3364, 2018.

DOI: 10.1007/s00436-018-6073-6

Kaewthamasorn M, Takeda M, Saiwichai T, Gitaka JN, Tiawsirisup S, Imasato Y, Mossaad E, Sarani A, Kaewlamun W, Channumsin M, Chaiworakul S, Katepongpun W, Teeveerapunya S, Panthong J, Mureithi DK, Bawm S, Htun LL, Win MM, Ismail AA, Ibrahim AM, Sukanuma K, Hakimi H, Nakao R, Katakura K, Asada M, Osamu Kaneko O: Genetic homogeneity of goat malaria parasites in Asia and Africa suggests their expansion with domestic goat host. Sci Rep 8, 5827, 2018.

DOI:10.1038/s41598-018-24048-0

Koarashi Y, Cáceres AG, Saca FM, Flores EE, Trujillo AC, Alvares JL, Yoshimatsu K, Arikawa J, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H: Identification of causative *Leishmania* species in Giemsa-stained smears prepared from patients with cutaneous leishmaniasis in Peru using PCR-RFLP. Acta Trop 158, 83-87, 2016.

DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.02.024

Nzulu CO, Cáceres AG, Guerrero-Quincho S, Tineo-Villafuerte E, Rodriguez-Delfin L, Mimori T, Uezato H, Katakura K, Gomez EA, Guevara AG, Hashiguchi Y, Kato H: A rapid molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool. Acta Trop 153, 116-119, 2016.

DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.10.013.

Qiu Y, Nakao R, Thu MJ, Akter S, Alam MZ, Kato S, Katakura K, Sugimoto C: Molecular evidence of spotted fever group rickettsiae and Anaplasmataceae from ticks and stray dogs in Bangladesh. Parasitol Res 115, 949-955, 2016.

DOI: 10.1007/s00436-015-4819-y

Akter S, Alam MZ, Nakao R, Yasin MG, Kato H, Katakura K: Molecular and serological evidence of *Leishmania* infection in stray dogs from visceral leishmanial-endemic areas of Bangladesh. Am J Trop Med Hyg 95, 795-799, 2016.

DOI: 10.4269/ajtmh.16-0151

Katakura K: An experimental challenge model of visceral leishmaniasis by *Leishmania donovani* promastigotes in mice. Parasitol Int 65, 603-606, 2016.

DOI: 10.1016/j.parint.2016.03.008

〔学会発表〕(計7件)

Katakura K, Bawm S, Chel HM, Thu MJ, Htun LL, Imasato Y, Nakao R: PCR detection and phylogenetic analysis of haemoprotozoan parasites in livestock in Myanmar by sequence analysis of selected target genes. 14th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID XIV), 2018年11月9日, Sitges, Spain.

Akter S, Nakao R, Katakura K: Potential of cell-free DNA as a novel diagnostic biomarker for parasite infections in dog. 26th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), 2017年9月4日, Kuala Lumpur, Malaysia.

今里裕平, 中尾亮, 入江隆夫, 孝口裕一, 松本淳, 八木欣平, 片倉 賢: *Echinococcus multilocularis* の根室株の虫卵感染マウスにおけるマイクロRNA解析. 第86回日本寄生虫学会大会, 2017年5月30日, 北海道大学学術交流会館, 札幌市.

片倉 賢: 寄生虫と人と動物と旅 (特別講演), 第86回日本寄生虫学会大会, 2017年5月29日, 北海道大学学術交流会館, 札幌市.

Akter S, Nakao R, Alam MZ, Yasin G, Katakura K: Molecular and serological evidence of *Leishmania* infection in stray dogs from visceral leishmaniasis endemic areas of Bangladesh. 6th World Congress on Leishmaniasis (Worldleish-6), 2017年5月18日, Toledo, Spain.

今里裕平, 中尾亮, 入江隆夫, 孝口裕一, 松本淳, 八木欣平, 片倉 賢: 幼虫期 *Echinococcus multilocularis* の miRNA 解析. 第159回日本獣医学会学術集会, 2016年9月7日, 日本大学, 藤沢市.

Akter S, 中尾亮, Alam MZ, Yasin G, 片倉 賢: Molecular and serological evidence of *Leishmania* infection in stray dogs from visceral leishmaniasis endemic areas of Bangladesh. 第159回日本獣医学会学術集会, 2016年9月6日, 日本大学, 藤沢市.

〔図書〕(計2件)

Enkai S, Sakamoto K, Kaneko M, Kouguchi H, Irie T, Yagi K, Ishida Y, Matsumoto J, Oku Y, Katakura K, Fujita O, Nozaki T, Kita K: Medical treatment of *Echinococcus multilocularis* and new horizons for drug discovery: characterization of mitochondrial complex II as a potential drug target. Echinococcosis edited by Inceboz T, InTech, Rijeka, Croatia, pp 49-69, 2017.

Print ISBN 978-953-51-3591-3, Online ISBN 978-953-51-3592-0

片倉 賢(木村哲, 喜田宏編), 医薬ジャーナル社, 改訂第3版 人獣共通感染症(リーシュマニア症), pp 431-436, 2016.

ISBN 978-953-51-3592-0

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

研究室ホームページ <https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/parasitol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者(但し、平成28、29年度は連携研究者)

中尾 亮 (NAKAO, Ryo)

北海道大学・(連合)獣医学研究院・准教授

研究者番号: 50633955