

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15267

研究課題名(和文) バクテリア叢による寄生虫病制御に向けた相互作用解析

研究課題名(英文) Analyses of interaction between parasites and bacteria inhabiting host guts

研究代表者

菊地 泰生 (Kikuchi, Taisei)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：20353659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は寄生虫感染におけるバクテリアの役割を理解するため、実験室での人工接種実験およびフィールド調査によって寄生虫-バクテリア間の相互関係を明らかにすることを目的とした。人工接種実験の結果、寄生虫の感染によって宿主のバクテリア叢が変化し、特定のグループのバクテリアが増加または減少することが明らかになった。宿主の遺伝子発現解析の結果などから、この変化は2者の直接的な相互作用と宿主を介した間接的な作用が寄与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管内寄生虫は腸内バクテリアと共存してきた長い歴史があり、腸内バクテリアと深い関係を持ってその感染環を成立させていると考えられるが、腸管内寄生虫と腸内バクテリアの相互作用はこれまでほとんど調べられてこなかった。本研究によって、腸管内寄生虫の感染は宿主だけでなく、腸内バクテリア叢にも影響を与えることが明らかとなり、さらに相互作用を深く解析していくことで新たな寄生虫制御法の開発につながることを期待できる。また、フィールド調査のために確立したハイスループット寄生虫検出手法は、今後の寄生虫検査や寄生虫生態研究に有用なものである。

研究成果の概要(英文)：Soil-transmitted helminths infect the gastrointestinal tract of their host where they co-exist and interact with the host gut bacterial flora, leading to the coevolution of the parasites, microbiota, and host organisms. However, little is known about how these interactions change through time with the progression of infection. We used a rodent parasite *Strongyloides venezuelensis* and mice as a model of gastrointestinal parasite infection and conducted a time-course experiment to examine changes in the microbiota. We found that bacterial taxa in the host intestinal microbiota changed significantly as the infection progressed. The microbiota recovered to the pre-infective state after parasite clearance, suggesting that these perturbations are reversible. Microarray analysis revealed that the microbiota transition seems to correspond with the host immune response. These findings give an insight into the dynamics of parasite-microbiota interactions in the host gut.

研究分野：ゲノム生物学、寄生虫学

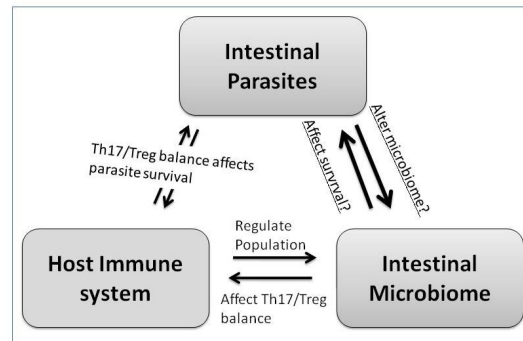
キーワード：寄生虫 バクテリア 共進化 相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの腸管内には 100 兆 (1e+14) を超える数のバクテリアが生息しており、この数はヒトの全細胞数の 10 倍にあたる。腸内バクテリアは免疫機構の調節や有害物質の除去、ホルモン産出などを通じて宿主に密接にかかわっていることが明らかになってきており、腸内バクテリア集合体 (マイクロバイオーム) のゲノムは我々の「第 2 のゲノム」ともいわれる。

腸管寄生虫は、このようにバクテリアに満ちた腸管内に寄生する。先進国以外の地域のヒトや野生動物においては、寄生虫感染はごく一般的であることから、寄生虫ホスト-バクテリアの 3 者の共存関係には長い歴史があり、その間の共進化により 3 者は互いに不可欠な相互関係を構築してきたと考えられる。実際、腸管内では 3



者による複雑な免疫調節が行われていることが少しずつ明らかになってきた(上図)。また、近年、腸管寄生線虫 *Trichuris muris* (鞭虫) が自らの発達に特定の腸内バクテリアを必要とすることが明らかとなったように、寄生虫とバクテリアの関係を明らかにすることは寄生虫病を理解し制御する上で重要なキーとなる。これまでの寄生虫研究は、寄生虫とホストの関係に重点をおいて行われており、寄生虫とバクテリアとの関係については十分な情報が得られていない。

## 2. 研究の目的

本研究では寄生虫感染におけるバクテリアの役割を理解するため、ラボ実験およびフィールド調査によって寄生虫-バクテリアの相互関係を明らかにする。実験材料には 2 種のラット腸管寄生線虫 (*Strongyloides ratti* と *Strongyloides venezuelensis*) を用い、フィールド調査は次世代シーケンサーを用いたハイスループット寄生虫検出法を開発して大規模に行うことで、両者の相互作用の深い理解を目指す。得られた成果は「バクテリアによる寄生虫制御手法の開発」に活用する。

## 3. 研究の方法

本研究では、特に以下のことを研究期間内に実施する。

- ・ホスト体内での相互作用を、腸管寄生線虫接種によるラット腸内のバクテリア叢の変動解析により明らかにする。
- ・ホスト体外における相互作用を、排出線虫卵の発達とバクテリアとの関係から明らかにする。
- ・野生ラットにおける寄生虫叢とバクテリア叢を調査し、2 者の相関関係を明らかにする。
- ・以上の結果から、「寄生虫感染におけるバクテリアの役割」を総合的に考察し、寄生虫の各発達ステージでキーとなるバクテリアを絞り込み、実験的に検証を行う。

## 4. 研究成果

(1) マウスと腸管寄生線虫 *Strongyloides venezuelensis* を腸管寄生虫感染モデルとして用い、接種前、接種後の糞便を系時的に回収し、DNA 抽出後 16SrDNA に基づくメタゲノム解析を行った。*Strongyloides venezuelensis* の感染時にいくつかの細菌群の集団比率が特異的に増大することを見出した。この増大は寄生虫の感染レベルの低下にしたがって減少し、14 日後には感染前の状態に回復することを確認した。特に顕著な増加傾向が見られたグループは、*Bacteroides* と *Candidatus Arthromitus* であり、減少がみられたグループは *Prevotella* と *Rikenellaceae* であった。マイクロアレイによる寄生虫感染時のホストの遺伝子発現変化解析では、バクテリアに対す

る反応に關与する遺伝子群の発現変化がみられ、寄生虫感染によるマイクロバイオームの変化は寄生虫 バクテリアの直接的な相互作用と、宿主を介した間接的な作用が寄与していると考えられた。

(2) フィールドにおける寄生虫多様性調査のための新規寄生虫検出法の開発は以下のように行った。我々のチームでは、真核生物の検出に広く用いられている PCR プライマーと次世代シーケンサーとを併用することで網羅的な寄生虫検出に成功していた。しかし、実際この手法を臨床サンプルへ応用を試みたところ、バクテリア DNA と宿主 DNA のコンタミネーションが高頻度で発生することが明らかとなった。これは、バクテリアを大量に含む糞便サンプルや感染レベルが極めて低い臨床サンプルからの寄生虫検出の障害となることから、手法の改良に取り組んだ。情報学的スクリーニングおよび qPCR による検討によって、約 700 組の候補から 6 組の PCR プライマーを選抜した。野生動物の糞便サンプルを用いて、選抜した PCR プライマーでの寄生虫検出を行ったところ、バクテリア配列のコンタミネーションを劇的に抑えることができ、さらに、従来のプライマーに比べてより詳細で幅広い寄生虫の検出が可能であることが明らかになった。

また、申請者はサンプルからの DNA 抽出法も寄生虫検出感度に重要であると考え、糞便からの DNA 抽出法の検討を行った。これまでの糞便からの DNA 抽出は、不純物や PCR インヒビターを除くため多くのステップを要していたが、申請者らはセルロースビーズの使用によって、簡便に純度の高い DNA を抽出することができることを明らかにした。この手法は自動化が可能であり、臨床検査にも最適な手法である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Akina Hino, Haruhiko Maruyama, Taisei Kikuchi	4. 巻 65
2. 論文標題 A novel method to assess the biodiversity of parasites using 18S rDNA Illumina sequencing; parasitome analysis method	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Parasitology international	6. 最初と最後の頁 572-575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.009">https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.009</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kounosu Asuka, Murase Kazunori, Yoshida Akemi, Maruyama Haruhiko, Kikuchi Taisei	4. 巻 9
2. 論文標題 Improved 18S and 28S rDNA primer sets for NGS-based parasite detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52422-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Afrin Tanzila, Murase Kazunori, Kounosu Asuka, Hunt Vicky L., Bligh Mark, Maeda Yasunobu, Hino Akina, Maruyama Haruhiko, Tsai Isheng J., Kikuchi Taisei	4. 巻 9
2. 論文標題 Sequential Changes in the Host Gut Microbiota During Infection With the Intestinal Parasitic Nematode <i>Strongyloides venezuelensis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00217">https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00217</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanzila Afrin, Asuka Kounosu, Mohammad-Masum Billah, Kazunori Murase, Taisei Kikuchi	4. 巻 53
2. 論文標題 Evaluation of magnetic cellulose bead-based DNA extraction from faecal materials for high-throughput bacterial community analyses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 211-286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-018-0551-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	丸山 治彦  (Maruyama Haruhiko)  (90229625)	宮崎大学・医学部・教授   (17601)	