

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15366

研究課題名(和文)トリパノソーマ原虫のヒト感染能獲得の分子機構の解明

研究課題名(英文)Understanding the human infectivity in *Trypanosoma* species

研究代表者

林田 京子 (Hayashida, Kyoko)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教

研究者番号：40615514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトはトリパノソーマ原虫に対する自然免疫因子であるTLFと呼ばれる血清成分を有し、動物感染性のトリパノソーマの感染は成立しない。一方でTrypanozoon亜属の2種の原虫はヒトへの感染能を獲得し、それらはヒト感染性のトリパノソーマへと進化した。本研究では世界中に蔓延している家畜感染性Trypanosoma evansiを試験管内でヒト血清抵抗性へと馴化させ、ヒト血清抵抗性に関わる原虫因子の同定を試みた。RNAseqの結果、試験管内にてヒト血清抵抗性を獲得した原虫では、TLFのレセプター分子、HpHbRの遺伝子を含む転写単位のmRNA発現が有意に減少していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのアフリカ睡眠病を引き起こすTrypanosoma bruceiと、家畜の病原体であるT. evansiは近縁関係にあるが後者はヒト血清抵抗性を有さない。本研究ではT. evansiを試験管内でヒト血清へ馴化し網羅的遺伝子解析を行った。結果、ヒトの抗トリパノソーマ因子TLFのレセプターHpHbRの発現が血清抵抗性T. evansiで減少していることを明らかにした。本知見はヒト血清抵抗性の獲得という現象が、Trypanozoon亜属に共通して起こりうる現象であることを示唆する。T. evansiが新たな人獣共通感染症の原因となりうるのか、今後慎重に検討すべき課題であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human had evolved to acquire the natural immunity against Trypanosoma infection, called Trypanolytic factor (TLF) in its serum. On the other hand, two Trypanosome species evolved to acquire the mechanism to combat with human anti-Trypanosome immune system, allowing to infect humans. To better understand of host-parasite interaction of the Trypanozoon parasite, we adapted T. evansi parasite into human-serum added media in vitro. Genome-wide transcription analysis using RNA-seq revealed that, several genes are differentially expressed comparing the original strain in these human-serum resistant parasite clones. Notably, the expression of HpHbR gene, that encodes the parasite receptor of TLF was significantly downregulated. This result provided a possible mechanism of African Trypanosoma to acquire human serum resistance, and proposed the potential risk of animal-infective Trypanosoma to become an potential zoonotic parasite.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トリパノソーマ原虫 進化 ゲノム 人獣共通感染症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトアフリカトリパノソーマ症は、ツェツェバエにより媒介される *Trypanozoon* 亜属に属する *T. b. gambiense*、あるいは *T. b. rhodesiense* 感染に起因する致死性の熱性感染症である。サブサハラ地域で風土病として古くから恐れられており、顧みられない熱帯病の一つに挙げられている。同じ *Trypanozoon* 亜属に属する *T. b. brucei* や *T. evansi* はこれらヒト感染性のトリパノソーマ種とそのゲノム構造は極めて類似しているが、家畜にのみ感染性を有しヒトには感染しないことが知られている。これはヒトを始めとする霊長類は血清中に ApoL1 をエフェクターとする Trypanolytic factor (TLF) と呼ばれる抗トリパノソーマ因子を有し、TLF は家畜感染性トリパノソーマに取り込まれて細胞溶解を起こし原虫を殺滅する自然免疫を備えているためである。従って家畜感染性トリパノソーマのヒトへの感染は通常は成立しない。これはヒトへ感染する *T. b. rhodesiense* は TLF に拮抗する serum resistance associated (SRA) という蛋白質を、*T. b. gambiense* は TLF が原虫に結合する際のレセプターとなる HpHbR の発現を減少させて TLF の取り込みを抑制することによって TLF への抵抗性を獲得し、ヒトへ感染することが明らかになっている。このように、家畜感染性トリパノソーマとヒト感染性トリパノソーマの違いは、TLF と原虫の分子間相互作用に帰着されるという、比較的シンプルな宿主-原虫相互作用モデルが提唱されている。

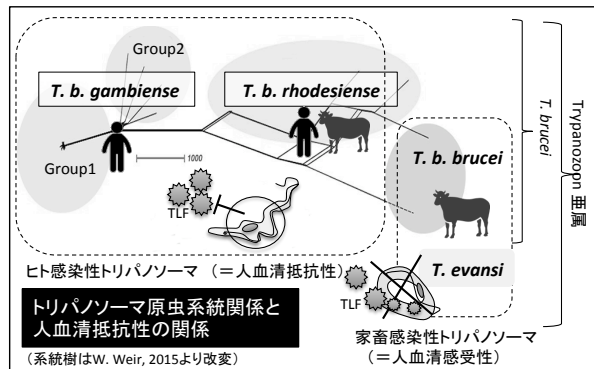


図1) トリパノソーマ原虫系統関係と人血清抵抗性の関係

ただし、これらの分子機構で全てが *Trypanozoon* 亜属原虫の宿主特異性が説明できるわけではなく、例えば *T. b. gambiense* の group2 に分類される原虫のヒトへの感染機構は全く明らかになっていない。さらに、過去にツェツェバエの分布しないはずのインド・スリランカ・スーダン、ベトナムなどにおいてヒトトリパノソーマ症が報告されており、いずれも *T. evansi* の感染が疑われている。最近のベトナムの症例では血清中の TLF に変異などは確認されず (N. Chau et al., 2016)、原虫がヒトへ感染する能力を獲得したと類推されるが、原虫が分離されていないためその分子機構は不明である。*T. evansi* はツェツェバエ以外のアブなどの吸血昆虫や吸血コウモリによって機械的に媒介され、アフリカ大陸以外にもアジア・南米の家畜に広く蔓延している。したがって *T. evansi* を新たな、あるいは見過ごされていた人獣共通感染症の原因として監視すべき病原体であると考え、ヒト血清に抵抗性を獲得する機構を明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

霊長類は長い進化の歴史の中で、アフリカトリパノソーマ原虫に対する自然免疫を獲得してきた。一方の原虫もそれに勝る進化速度でヒトへの感染能を獲得し、その結果としてヒトアフリカトリパノソーマ症で人類は長く苦しめられてきた。この壮絶な戦いは病原体と宿主のレースの典型例と考えられる。これら宿主・寄生体の相互作用による進化のせめぎ合いを実験室で再現すべく、本研究では家畜感染性 *T. evansi* を研究対象材料として、試験管内進化によって人血清抵抗性獲得に関わる因子の同定を試みることにした。すなわち野外より分離培養したトリパノソーマ原虫をヒト血清に暴露して抵抗性を持つ株を作出し、それら原虫の全ゲノム比較と網羅的遺伝子発現解析を行うことで、どのように家畜感染性トリパノソーマがヒトへの感染性を獲得してきたのか、その機構を探ることにした。原虫の寄生宿主を規定する分子機構が明らかになることでアフリカトリパノソーマ原虫の進化を考察できるのみならず、ヒト感染性のトリパノソーマの出現を先回り予測できるマーカーの同定、あるいは原虫の抵抗性因子をターゲットとした、原虫治療薬解決の糸口になることが期待される。

3. 研究の方法

(1) *Trypanosoma evansi* の培養とヒト血清感受性試験

マリのラクダからの分離株である *T. evansi* IL3354 株をマウスに感染させ、採取した血液から液体培地に馴化し、限界希釈後に本試験に用いた。ヒト血清は倫理審査を得て健常人血清を使用した。*T. evansi* IL3354 は 10% の FBS 添加 HMI9 培地を用いて 5% CO₂ 存在下 37°C 条件下で培養した。その後、ヒト血清感受性試験を行うためにプレート状で段階希釈したヒト血清 0-10% を添加し、24 時間培養後の細胞生存率をルシフェラーゼ発光を利用した ATP 測定法により算出した。

(2) ヒト血清に抵抗性の *T. evansi* 原虫株の作出

液体培地に馴化させた *T. evansi* 株は複数個のフラスコ内に分け、原虫を完全に殺滅しうる血清濃度の IC₅₀ 付近の血清濃度から段階的に原虫をヒト血清に馴化させた。0.0005% の血清濃度で 24 時間培養後、ヒト血清を除いた通常培地で十分に細胞数が回復するまで数日~数週間、

その後、より高いヒト血清濃度 0.001%濃度に暴露し、また回復後にさらに濃度を上げていく、といった手順を繰り返し、6ヶ月間培養を行なった。得られた0.1%血清培養5クローン、1%血清培養3クローンについて、再度血清感受性試験を行い、馴化前の細胞株との感受性の比較を行なった。さらに、これら血清抵抗性8クローンをヒト血清を抜いた通常培地に戻し、3-6ヶ月培養をして、継続的に血清感受性試験を行なった。

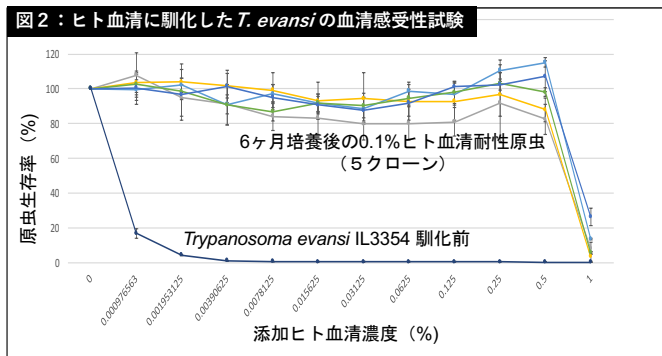
(3) RNA-Seq 解析

ヒト血清抵抗性となった *T. evansi* 細胞株の RNA-Seq 解析とリアルタイム PCR

試験管内馴化で得られた0.1%ヒト血清抵抗性5クローン、1%ヒト血清抵抗性株3クローンについて、培養細胞から RNA を抽出し cDNA ライブラリーを作成後、次世代シーケンサーに (HiSeq) を用いた RNA-Seq 解析を行なった。各クローン平均20Mリードのデータ量を得て、参照ゲノム *T. b. brucei* (TREU927株) にマッピング後、得られたリードカウントから edgeR を用いた比較解析により、馴化前と後に統計的に発現量の変化している遺伝子を選出した。

4. 研究成果

液体培地に馴化させた *T. evansi* IL3354 株の初期ヒト血清感受性は高く、血清濃度依存的に原虫存在量の減少が認められ、0.0005%の正常ヒト血清存在下において半数以上の原虫が溶解・殺滅された。しかし、一部の原虫は明らかに運動量が低下しているものの溶解されずに生存した



ものが少数存在していることが確認された。本原虫株に段階的にヒト血清を添加して培養することで、最終的に6ヶ月後には0.1%のヒト血清に抵抗性の原虫を5クローン、0.1%のヒト血清に抵抗性の原虫を3クローン得ることに成功した (図2)

図2: ヒト血清に馴化した *Trypanosoma evansi* の血清感受性試験結果

血清馴化前の3クローン、馴化後の8クローンの RNAseq 発現解析を行なった結果、馴化後の8クローン全てにおいて mRNA 発現上昇が認められたのが6遺伝子、発現減少が認められたのが6遺伝子同定された。発現上昇が認められたのはアデノシントランスポーターや VSG 関連遺伝子、機能が全く未知の遺伝子であった。これらの発現変化が原虫のヒト血清抵抗性に関与している可能性が示唆されたが、本研究期間内ではこれら遺伝子の機能解析には至らなかった。一方、発現が減少していた6遺伝子のうち5遺伝子は TLF の原虫側レセプターであるハプトグロビンヘモグロビンレセプター (HpHbR) を含むポリシストロニックな遺伝子群に位置する、お互いに隣接した遺伝子であり、これら遺伝子群の有意な転写の減少が認められた。すなわち、転写開始点での転写活性機能が抑制されることによってポリシストロニックに mRNA の発現減少が起こっていることが示唆された。HpHbR の発現の減少はヒトアフリカトリパノソーマ症を起こす *T. brucei gambiense* (Type1) におけるヒト血清抵抗性獲得メカニズムの1つであると類推されていることから、家畜トリパノソーマ *T. evansi* においても、ヒトへの感染性獲得が同様な分子機構で起こりうる可能性が示唆された。HpHbR の mRNA 発現量の減少は定量的リアルタイム PCR においても確認された。

さらに、これら0.1%ヒト血清抵抗性となった5クローンを通常培地に戻して培養したところ、6ヶ月後には血清感受性となることが示された。すなわち血清抵抗性の形質は固定されたゲノムの変異ではなく、可逆的なエピジェネティックな変化であることが示唆された。これら血清感受性を回復した5株について HpHbR の発現量をリアルタイム PCR 法により定量したところ、血清抵抗性と HpHbR の発現量には相関が見られた。HpHbR の発現量が上昇 (回復) した3クローンは血清感受性が高く、中程度の上昇が認められた2クローンは中程度の血清感受性が認められた。これらの結果により、HpHbR の発現量の減少が *T. evansi* 原虫のヒト血清抵抗性に大きく関与していることが明らかになった。また、ポリシストロニックな転写開始のプロモーターレベルにおいて、遺伝子発現が抑制されている機序が存在することが推察された。

T. evansi は家畜の疾病 (スーラ病) の原因病原体として世界中に蔓延している。自然界ではアブなどの吸血昆虫により家畜間で伝播維持されており、人体感染例では、アブの刺咬、または料理の際に傷口から感染したと類推されている。 *T. evansi* を含む *Trypanozoon* 亜属は血液中のみならず皮膚組織内にも分布することが近年明らかとなりつつある (Capewell P. et al., 2016)。また、皮膚組織は末梢血液と比較すると TLF の濃度は低いため、ここで増殖する過程でヒト血清への抵抗性を獲得、または抵抗性を持つ原虫個体が選択され増殖する可能性は否定できない。試験管内で観察された HpHbR の発現減少やヒト血清の抵抗性獲得といった現象が自然界でも認められるかは現在では全く未知であり、これらの探索が今後の課題である。その際に HpHbR の発現量の定量はヒトへの感性能の評価の一指標になる可能性がある

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Qiu Y, Kajihara M, Harima H, Hang'ombe BM, Nakao R, Hayashida K, Mori-Kajihara A, Changula K, Eto Y, Ndebe J, Yoshida R, Takadate Y, Mwizabi D, Kawabata H, Simunza M, Mweene A, Sawa H, Takada A, Sugimoto C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular characterization and phylogenetic analysis of Trypanosoma spp. detected from striped leaf-nosed bats (<i>Hipposideros vittatus</i>) in Zambia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Parasitol Parasites Wildl	6. 最初と最後の頁 234-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijppaw.2019.04.009.	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 Salim B, Hayashida K, Mossaad E, Nakao R, Yamagishi J, Sugimoto C.	4. 巻 260
2. 論文標題 Development and validation of direct dry loop mediated isothermal amplification for diagnosis of <i>Trypanosoma evansi</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vet Parasitol	6. 最初と最後の頁 53-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetpar.2018.08.009.	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 Nambala P, Musaya J, Hayashida K, Maganga E, Senga E, Kamoto K, Chisi J, Sugimoto C.	4. 巻 85(1)
2. 論文標題 Comparative evaluation of dry and liquid RIME LAMP in detecting trypanosomes in dead tsetse flies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Onderstepoort J Vet Res	6. 最初と最後の頁 e1-e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.4102/ojvr.v85i1.1543.	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 Gaithuma AK, Yamagishi J, Martinelli A, Hayashida K, Kawai N, Marsela M, Sugimoto C.	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 A single test approach for accurate and sensitive detection and taxonomic characterization of Trypanosomes by comprehensive analysis of internal transcribed spacer 1 amplicons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Negl Trop Dis.	6. 最初と最後の頁 e0006842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0006842.	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 Nakamura Y, Yamagishi J, Hayashida K, Osada N, Chatanga E, Mweempwa C, Chilongo K, Chisi J, Musaya J, Inoue N, Namangala B, Sugimoto C.	4. 巻 13(7)
2. 論文標題 Genetic diversity and population structure of <i>Glossina morsitans morsitans</i> in the active foci of human African trypanosomiasis in Zambia and Malawi	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Negl Trop Dis.	6. 最初と最後の頁 e0007568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0007568.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林田京子、山岸潤也、杉本千尋
2. 発表標題 Trypanosoma evansi におけるヒト血清抵抗性獲得の分子機構解明
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----