

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15140

研究課題名(和文) 糞線虫ベネスタチン/宿主RAGEを介する寄生生理機構の解明

研究課題名(英文) The host-parasite relationship mediated by Strongyloides venestatin/RAGE axis

研究代表者

坪川 大悟 (Tsubokawa, Daigo)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30714901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では消化管寄生蠕虫の糞線虫の分泌物中から、新規のカルシウム結合タンパク質「ベネスタチン」を同定し、機能解析を行った。ベネスタチンは終末糖化産物受容体(RAGE)に結合し、炎症性サイトカインや細胞接着分子の発現の抑制により、糞線虫感染による炎症細胞の浸潤を緩和することを明らかにした。さらに、糞線虫はベネスタチンの抗炎症機能を利用して、ニッチである消化管への移行を有利に進めることが示唆された。炎症性腸疾患やアレルギー性喘息の発症にはRAGEが関与することが知られており、ベネスタチンが持つ治療効果が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、消化管寄生蠕虫の分泌物がマクロファージを誘導し、大腸炎モデルマウスの病態を緩和することが報告されており、寄生蠕虫が有する抗炎症物質が炎症性疾患に対する治療薬候補として注目されている。ベネスタチンのようなカルシウム結合タンパク質は多くの寄生蠕虫種に存在しているが、遺伝子単離や機能解析が成されたのはベネスタチンが世界初である。ベネスタチン/RAGEを介する抗炎症機構を解明した本研究成果は、癌、糖尿病、喘息、潰瘍性大腸炎、アルツハイマー病などのRAGE介在性炎症性疾患の新規治療法としての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the effects of venestatin, an EF-hand Ca²⁺-binding protein secreted by the parasitic helminth *Strongyloides venezuelensis*, on RAGE activity and immune responses. Our results demonstrated that venestatin bound to RAGE and downregulated the host immune response. Venestatin suppressed RAGE-mediated immune responses in host skin induced by helminthic infection, thereby promoting larval migration. The anti-inflammatory mechanism of venestatin may be targeted for the development of anthelmintics and immunosuppressive agents for the treatment of RAGE-mediated inflammatory diseases.

研究分野：蠕虫学

キーワード：蠕虫 宿主応答 幼虫体内移行 カルシウム結合タンパク質 RAGE

1. 研究開始当初の背景

(1) **寄生虫症制圧技術開発への新たな展開**：人類が持続的な健康社会を送るためには感染症対策は何より重要である。とりわけ、糞線虫症や鉤虫症などの土壌媒介性寄生虫性疾患は、顧みられない熱帯病として途上国を中心に蔓延しており、世界人口の4分の1以上が感染のリスクにさらされている (Jourdan, 2017)。皮膚侵入性の糞線虫や鉤虫は、既存薬の単回投与では十分な駆虫効果が得られないこと、再感染の機会が非常に多いこと、薬剤耐性虫体の出現などの理由から、新たな駆虫薬やワクチンが待たれる (Keenan, 2013)。寄生虫は我々と同じ真核生物でありながら、宿主にはない、寄生虫特有の生理活性分子を保有する。こうした分子は体内移行など寄生虫ならではの寄生適応を支えていることから、寄生虫を宿主から人為的に排除する駆虫薬の格好の標的となり得ることが分かってきた (Kita, 2012)。

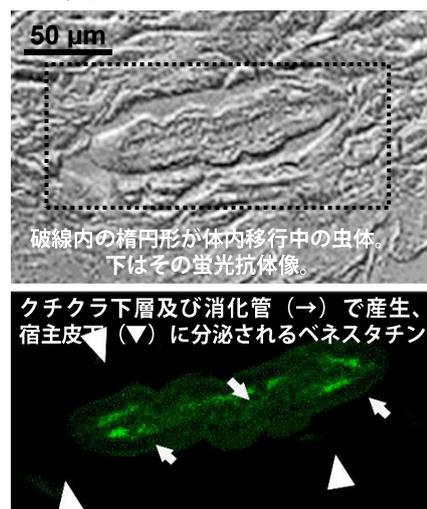
(2) **宿主免疫攪乱機能を持つ寄生虫 Excretory-secretory products (ES 物質)**：寄生虫が体内移行する際、自身の体表や排泄口を通して宿主体内に ES 物質を放出する。ES 物質には、宿主は保有せず、細菌やウイルスといった原核微生物でも見つからない多種多様な生理活性物質が含まれ、免疫応答抑制能を持つことが分かってきた (Maizels, 2018)。近年では ES 物質の構造・機能を基にしたアレルギーや自己免疫疾患に対する治療薬開発への応用が進んでいる。我々は、ベネズエラ糞線虫を用いた ES 物質の研究から、糞線虫幼虫が体内移行する間にクチクラ表層より分泌するベネスタチンを同定した (Tsubokawa, 2017)。ベネスタチンが鉤虫や住血吸虫などの経皮侵入性寄生虫に広く保存されていることから、体内移行の実行因子であると考えられる。

(3) **ベネスタチンによる RAGE 介在性の炎症の新展開**：終末糖化産物受容体 (Receptor for Advanced Glycation End-products : RAGE) は、終末糖化産物の受容体として同定されたパターン認識受容体であり、糖尿病や癌の発症に関わる哺乳動物の皮膚や肺組織の単球、マクロファージ、上皮細胞、線維芽細胞に強発現し、炎症メディエーターの S100 蛋白や high mobility group B1 などのダメージ関連分子パターンを認識することで、サイトカインや接着分子の発現亢進を誘導し炎症反応を進行させる。糞線虫は RAGE 高発現部位の皮膚や肺を移行することから、ベネスタチンが幼虫体内移行の間、炎症性サイトカインや白血球誘導の制御に関与する可能性は極めて高い。経皮侵入性寄生虫と RAGE の関わりを解明することで、炎症細胞浸潤などの宿主防御応答を回避しながら展開される体内移行のメカニズムが解明できると考えられる。

2. 研究の目的

申請者はベネスタチンの体内移行への関与として、クチクラ下層や消化管から宿主組織内に放出される分泌型ベネスタチンの存在を明らかにしている【図1】。また、ベネスタチンが Ca^{2+} 依存性の RAGE 結合能を有することや、ベネズエラ糞線虫が属する糞線虫属に高度に保存されていることも判明している。本研究では、ベネスタチンの RAGE 拮抗薬としての機能を実証し、経皮侵入性寄生虫の宿主体内移行における役割を明らかにする。同時に、炎症性疾患などの RAGE シグナルを発端して発症する病態への作用を明らかにすることを目的とする。

図1. 宿主皮下組織を移動する糞線虫と宿主に放出されるベネスタチン



3. 研究の方法

(1) 組換えベネスタチンの

作製：高活性ベネスタチンの

大量発現を目的として、

バキュロウイルス発現ベク

ターシステムにより、蚕発

現の組換えベネスタチン

(蚕ベネスタチン)を作製し

た。発現蛋白の N 末側に蚕

シグナルペプチド、C 末側

にはヒスチジンタグと

Strep タグを含むようにプ

ラスミドを設計し、組換え

バキュロウイルスを産生

した。蚕幼虫にバキュロウ

イルスを注入し、4 日後に

血リンパを回収、2 種の精製カラム (HisTrap Excel、Strep-Tactin Superflow) により蚕ベネスタチンを精製した【図 2】。

(2) 組換えベネスタチンの機能解析：

①ベネスタチンの性状検討：ベネスタチンのカルシウム結合蛋白としての性質を確認するため、カルシウム存在下、及び、非存在下で SDS-PAGE を行い移動度の相違を検討した。また、カルシウム結合蛋白に反応するルテニウムレッドによる染色を行った。

②ベネスタチンの RAGE への結合親和性の検討：大腸菌発現のベネスタチンと蚕発現のベネスタチンの RAGE との結合親和性についてプレート上で比較検討した。さらに、既知リガンドを用いて量的、質的差異の検討を行い、大腸菌により発現した RAGE の各ドメイン (V, C1, C2) との結合試験により結合ドメインを検討した。

③in silico 解析によるベネスタチン-RAGE 結合モデルの作製：ベネスタチンの 3 次元構造モデルを Swiss model program を用いて作製した。RAGE との 3 次元結合モデルを Clus Pro 2.0 を用いて解析した。

④in vivo 炎症モデルにおけるベネスタチンの機能解析：RAGE 介在性炎症を惹起する G1a-BSA、及び、AGE 非依存性炎症を惹起するカラゲナンを野生型 (WT) マウスに投与した。足蹠へ皮下投与を施したマウスは皮膚炎症モデル、経鼻腔投与を施したマウスは肺炎モデルとした。これらのモデルマウス作製過程において、ベネスタチン同時投与群と非投与群を用意した。それぞれのモデルマウスの皮膚組織と肺組織の炎症細胞浸潤の程度を病理組織学的に比較検討した。

(3) 糞線虫寄生における内在性ベネスタチンと RAGE の相互作用の検討：

①ベネスタチンノックダウン (kd) 糞線虫の作製：ベネスタチンの遺伝子配列をもとに、2 本鎖 RNA (dsRNA) を T7 Ribomax™ Express RNAi System により作製した。対照にはルシフェラーゼ遺伝子の dsRNA を用いた。S. venezuelensis 幼虫を dsRNA 含有培地内に 24-72 h 浸漬し、Kd 効率を虫体 RNA のリアルタイム RT-PCR、ES 内蛋白のウエスタンブロッティング、虫体の蛍光免疫染色により評価した。

②kd 糞線虫感染実験による内在性ベネスタチンの機能解析：dsRNA 処理後の幼虫を WT マウスおよび RAGE 欠損 (RAGE^{-/-}) マウスへ皮下感染し、肺と小腸への移行虫体数を計測した。さらに感染

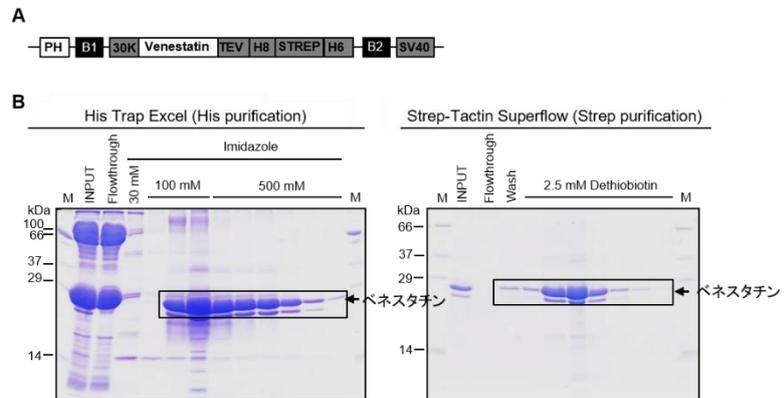


図 2. 蚕ベネスタチンの発現と精製 (A) 蚕ベネスタチンの発現ベクター。PH : polyhedrin promoter、SV40 : SV40 polyadenylation signal、B1 and B2 : recombination sites for Gateway cloning、30K6G : signal peptide of silkworm 30k protein、H8 and H6 : 8-histidine (H8)-tag and 6-histidine (H6)-tag、STREP : Eight amino acids Strep (STREP)-tag、TEV : Tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site (B) 蚕血リンパからの分泌型成熟ベネスタチンの精製 [Tsubokawa et al., Infect Genet Evol(2019) Fig. 1 より一部改変]

後の皮膚組織の病理組織化学的検討を行い、宿主由来遺伝子の発現変化をリアルタイム RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 組換えベネスタチンの機能解明:

①カルシウムの有無における SDS-PAGE やルテニウムレッド染色により、蚕発現のベネスタチンは Ca^{2+} 結合蛋白としての性質を有した。

②大腸菌ベネスタチンに比べ、蚕ベネスタチンは RAGE への高い結合性を示した (Kd 値: 蚕ベネスタチン 75 ± 9 nM vs 大腸菌ベネスタチン 111 ± 13 nM)。

③ベネスタチンは、RAGE の C1 ドメインと C2 ドメイン

へ結合性を示した。C1 ドメインへの結合が最も顕著であった。また、カルシウムを含まない緩衝液や、キレート剤(EDTA)を用いて反応性を検討することにより、C1 ドメインと C2 ドメインはカルシウム存在下でベネスタチンと結合することが明らかとなった。

④in silico 解析により、ベネスタチンの RAGE への C1 ドメインを中心とする結合モデルが得られた。⑤皮膚炎症モデル、及び肺炎モデルにおいて、ベネスタチンが RAGE 依存的に炎症細胞浸潤を抑制する結果が得られた【図 3】。

(2) 糞線虫寄生におけるベネスタチン/RAGE 軸を介する寄生生理機構の解明:

①Kd 糞線虫の作製実験では、糞線虫幼虫の 72h の dsRNA 含有培地内で、ベネスタチン mRNA の発現が 82.8%低下した。ES 内や虫体角皮下におけるベネスタチンの発現低下が蛋白レベルでも確認された。

②Kd 糞線虫のマウスへの感染実験では、WT マウスにおいて、Kd 幼虫は、対照幼虫に比べ、肺や小腸への移行幼虫数が有意に減少していた。RAGE^{-/-}マウスでは、Kd 幼虫と対照幼虫の間で移行幼虫数に有意な差はみられ

なかった【図 4】。皮膚組織の病理組織標本を感染幼虫周囲中心に観察したところ、WT マウスで

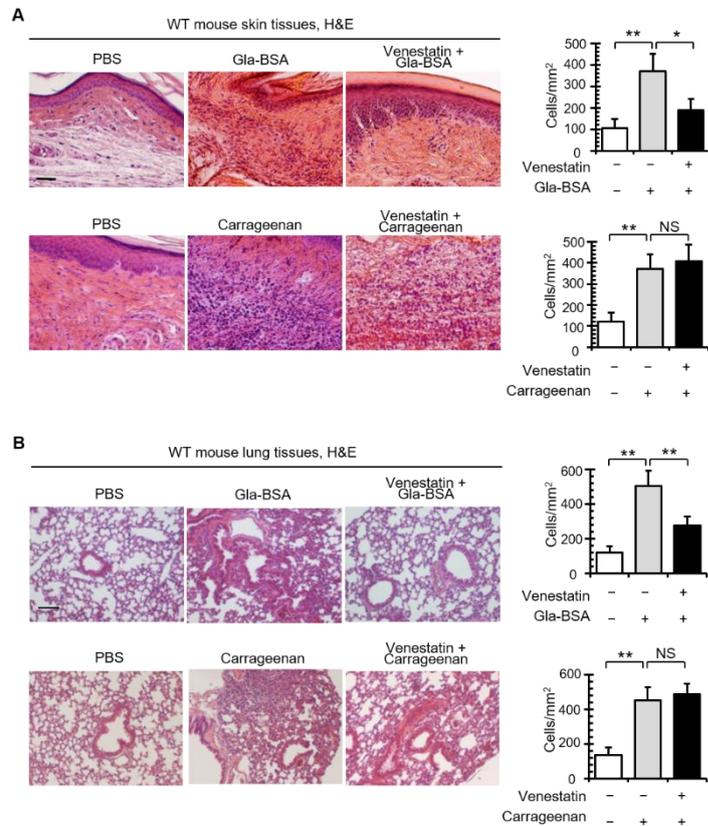


図 3. RAGE 介在性(Gla-BSA)/非介在性(Carrageenan)炎症モデルへのベネスタチンの効果 (A) 皮膚炎症モデル (B) 肺炎モデル [Tsubokawa et al., *PLoS Pathog* (2021) Fig. 2 より一部改変]

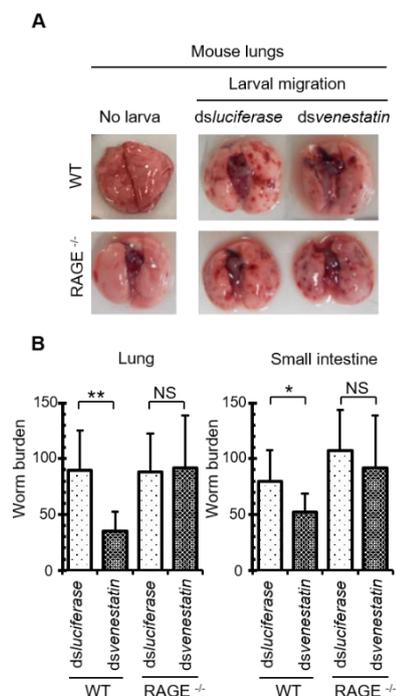


図 4. 内在性ベネスタチンの糞線虫感染数への影響 (A) 感染 3 日目の肺マクロ写真 (B) 肺・小腸内幼虫数 [Tsubokawa et al., *PLoS Pathog* (2021) Fig. 3 より一部改変]

は幼虫周囲に炎症細胞浸潤がみられ、対照幼虫に比べ、ベネスタチン kd 幼虫で有意に浸潤細胞数が増加した。RAGE^{-/-}マウスではいずれの感染群においても細胞浸潤は認められなかった【図5】。免疫組織化学染色

により、幼虫周囲の浸潤細胞種の同定を試みたところ、マクロファージと好中

球が主であることが明らかとなった。対照糞線虫感染後の Wt 皮膚組織において、RAGE リガンド (HMGB1、S100B、S100A6) の発現が有意に上昇した。しかし、RAGE 自体の発現には変化は認められなかった。Wt 皮膚組織では、対照幼虫感染で炎症性分子や接着分子 (TNF- α 、COX-2、VCAM1、ICAM 1、eSelectin 遺伝子) の有意な発現上昇が認められた。さらに Kd 糞線虫幼虫感染では、対照幼虫感染における発現上昇に比べ、有意にこれら遺伝子の発現が上昇した。RAGE^{-/-}マウスでは対照幼虫と Kd 幼虫どちらの感染でも炎症性分子や接着分子の有意な発現上昇は認められなかった。Th サイトカイン (IL-4、IL-5、IFN-g) の発現は、Wt と RAGE^{-/-}マウスどちらの感染実験においても発現の変化は認められなかった。

以上より、ベネスタチンは RAGE に結合し、糞線虫感染における炎症性サイトカインや細胞接着分子の発現の抑制により、炎症細胞の浸潤を緩和することを明らかにした。さらに、糞線虫はベネスタチンの抗炎症機能を利用して、ニッチである消化管への移行を有利に進めることが示唆された。

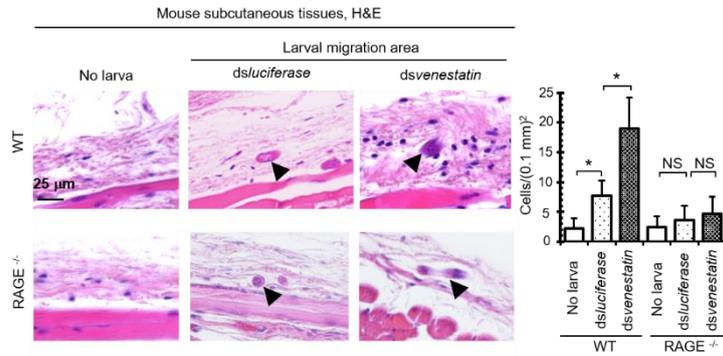


図5. 内在性ベネスタチンの糞線虫周囲における細胞浸潤への影響感染後のマウス皮膚組織(HE染色) 矢印: 幼虫断面 [Tsubokawa et al., *PLoS Pathog* (2021) Fig. 8 より一部改変]

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsubokawa D, Kikuchi T, Lee JM, Kusakabe T, Yamamoto Y, Maruyama H	4. 巻 17
2. 論文標題 Venestatin from parasitic helminths interferes with receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated immune responses to promote larval migration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1009649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1009649	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 Tsubokawa D, Lee JM, Hatta T, Mikami F, Maruyama H, Arakawa T, Kusakabe T, Tsuji N	4. 巻 75
2. 論文標題 Characterization of the RAGE-binding protein, Strongyloides venestatin, produced by the silkworm-baculovirus expression system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infect Genet Evol	6. 最初と最後の頁 103964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.meegid.2019.103964.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 坪田理央, 坪川大悟, 八田岳士, 辻尚利	4. 巻 49
2. 論文標題 経皮侵入性線虫Strongyloides venezuelensisの宿主体内移行における終末糖化産物受容体の働き	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 北里医学	6. 最初と最後の頁 111-113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Maeda H, Hatta T, Tsubokawa D, Mikami F, Nishimaki T, Nakamura T, Anisuzzaman, Matsubayashi M, Ogawa M, Costa CP, Tsuji N	4. 巻 67
2. 論文標題 Positive phototropism is accelerated in Biomphalaria glabrata snails by infection with Schistosoma mansoni.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 609-611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2018.06.003.	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Tsubokawa D, Hatta T, Tsuji N	4. 巻 15
2. 論文標題 Tapeworm-related cutaneous larva migrans is caused by a cysteine protease from the larvae themselves.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Atlas of Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 坪川大悟、八田岳士、小泉頌歌、関口智也、三上房子、山本靖彦、辻 尚利
2. 発表標題 ベネズエラ糞線虫の成虫寄生における終末糖化産物受容体(RAGE)の役割
3. 学会等名 第13回蠕虫研究会(宮崎)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉頌歌、坪川大悟、八田岳士、三上房子、中村健、山本靖彦、辻尚利
2. 発表標題 Manson 住血吸虫による肉芽腫形成への終末糖化産物受容体(RAGE)の関与
3. 学会等名 第79回日本寄生虫学会東日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小泉頌歌、坪川大悟、八田岳士、三上房子、中村健、山本靖彦、辻尚利
2. 発表標題 住血吸虫症における肉芽腫性炎症と終末糖化産物受容体(RAGE)との関連
3. 学会等名 第60回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪川大悟、八田岳士、小泉頌歌、三上房子、山本靖彦、丸山治彦、辻尚利
2. 発表標題 糞線虫の宿主体内移行における終末糖化産物受容体(RAGE)の役割.
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会(長崎)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪川大悟、小泉頌歌、八田岳士、三上房子、丸山治彦、辻尚利
2. 発表標題 終末糖化産物受容体(RAGE)欠損マウスをもちいた蠕虫感染実験
3. 学会等名 第12回蠕虫研究会(湯河原)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪川大悟、八田岳士、小泉頌歌、三上房子、辻尚利.
2. 発表標題 ベネスタチン遺伝子ノックダウン糞線虫を用いた感染実験の展開
3. 学会等名 第26回分子寄生虫ワークショップ/第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム(松山)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daigo Tsubokawa, Takeshi Hatta, Taisei Kikuchi, Fusako Mikami, Haruhiko Maruyama and Naotoshi Tsuji
2. 発表標題 RNAi mediated suppression of venestatin in the subcutaneous migration of Strongyloides venezuelensis
3. 学会等名 ICOPA 2018 (DAEGU, KOREA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪川大悟、八田岳士、小泉頌歌、三上房子、辻尚利
2. 発表標題 ベネスタチン遺伝子ノックダウンによる糞線虫の宿主体内移行への影響
3. 学会等名 第31回北里大学バイオサイエンスフォーラム(相模原)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap (坪川大悟) https://researchmap.jp/daigo0525

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
研究協力者	菊地 泰生 (Kikuchi Taisei)		
研究協力者	李 在萬 (Lee Jaeman)		
研究協力者	日下部 宜宏 (Kusakabe Takahiro)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	丸山 治彦 (Maruyama Haruhiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関