

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790305
 研究課題名（和文） RNAiスクリーニングによる住血吸虫免疫回避担当分子の網羅的検索
 研究課題名（英文） Screening of the host evasion-related genes in schistosoma by RNA interference.
 研究代表者
 熊谷 貴（KUMAGAI TAKASHI）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
 研究者番号：40369054

研究成果の概要（和文）：日本住血吸虫は、血管内にて終生寄生生活を行える寄生蠕虫である。その過程で、宿主からの免疫等を巧みに回避することができ、ワクチン開発の妨げとなっている。そこで、感染後に誘導される遺伝子を用いて RNAi スクリーニングを行い、免疫回避に関係する遺伝子を検索した。1 次スクリーニングにおいて、免疫回避としての指標である NO への耐性に関する機能未知を含む 3 つの遺伝子が見つかった。また、生存に関わる遺伝子として、機能未知を含む 8 つの遺伝子が見つかった。

研究成果の概要（英文）：*Schistosoma japonicum* is the parasitic plathelminth living in the bloodstream of host. As this worm have the evasion systems from the host immune systems, vaccine development is not achieved in this field. In the present study, we screened the genes related to these immune evasions using RNAi screening method targeting the specific genes in early infectious stage. As the result of 1st screening, we found 3 genes related to the resistance against nitric oxide, and 8 essential genes for survive.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：蠕虫、住血吸虫、RNA 干渉、抗酸化タンパク質、宿主免疫回避、

1. 研究開始当初の背景

(1). 日本住血吸虫は中国・フィリピンを含むアジア地域の一部で流行する寄生蠕虫症である。効果的な治療薬は存在するものの、ワクチン等は存在しない。特に薬剤については、開発途中の薬剤は多数存在するものの、

今もなおプラジカンテル一つに頼っている状態である。また、ワクチン候補分子についての研究も行われているが、虫体が感染することで獲得する免疫回避機構により、その効果は低く、開発の成功に至っていない。特に、宿主に感染したシストソミュラ幼虫は、細胞

性免疫による、活性酸素種や、活性窒素種に対し抵抗性を持つことが知られており、その免疫効果を低下させていると考えられる。

(2). 住血吸虫はその生活史の複雑さから、遺伝子ノックダウン動物の作成は困難であり、特定の遺伝子の解析をする手段が乏しかった。しかし、最近の RNAi 技術の発展により、住血吸虫でも遺伝子発現を一過性に抑制することが可能となり、遺伝子の機能解析に関する報告が増加した。特に、dsRNA を虫体の培養液に添加するだけで RNAi の効果のある soaking 法が有効であり、非常に容易に遺伝子のノックダウンが可能である。我々も、すでに抗酸化タンパク質の一つであるペロキシレドキシンを標的に RNAi を行い、特異的な遺伝子ノックダウンと過酸化水素耐性機構について研究を行った。

2. 研究の目的

(1). 住血吸虫の新規薬剤開発、および、ワクチン候補分子検索のために、シストソミュラ期に特異的に発現上昇する遺伝子をサブトラクション法により検索する。

(2). サブトラクション法により得られた遺伝子から dsRNA を作成し、住血吸虫虫体に対して RNAi スクリーニングを行い、生存に必要な遺伝子、及び、免疫回避に必要な遺伝子を網羅的に検索する。

(3). 従来の *in vitro* RNAi だけでは、宿主寄生環境内での住血吸虫遺伝子の機能はわからない。スクリーニングで見つかった遺伝子の機能を調べる時にその効果についても検証の必要がある。そこで、*in vivo* RNAi を用いた新たな方法を検証することも同時に試みた。

3. 研究の方法

(1). 研究に用いた材料として、日本住血吸虫（山梨株）を用い、実験室内での維持を確立した。感染幼虫であるセルカリアを中間宿主貝から游出させ、全 RNA を抽出した。一方で、セルカリアはマウスの皮膚に感染させた後、24 時間後に皮膚から回収し、シストソミュラとした。RPMI1640 中で 1 週間の培養を行い虫体から全 RNA を抽出した。これらの 2 つの RNA から、それぞれ super SMART cDNA PCR cDNA synthesis kit を用いて二本鎖 cDNA を作製した。シストソミュラより作製した cDNA をテスター、セルカリア cDNA をドライバーとし、サブトラクションを 2 回行った。サブトラクションされた cDNA を増幅し、pGEM-T ベクターにサブクローニングし、大腸菌への形質転換を行った。192 個のコロニーを取り出し、コロニー PCR による確認後シーケン

ス解析を行い、ホモロジー検索を行った。

(2). RNAi スクリーニングのための dsRNA 作製法としては、コロニー PCR により得られた遺伝子産物から T7, SP6 のプロモーターを認識する転写酵素により直接 *in vitro* transcription を行った。それぞれの ssRNA を合成した後、アニーリングさせることで dsRNA を作製した。dsRNA はすべて、50µg/ml の濃度に調整し RNAi スクリーニングを行った。RNAi スクリーニングには皮膚から回収したシストソミュラを用いた。血清無添加の RPMI1640 培地に虫体を入れた後、dsRNA を添加し、6 日間の培養を行った。その時点での生存率を確認し、生存虫体には、さらに NO 産生剤である DETA/NO を加えて、さらに 48 時間培養し、その生存率を確認した。

(3). *in vivo* RNAi 実験を行うために、BALB/c マウスに日本住血吸虫セルカリアを感染させ、感染 4 週後に 3 日おきに 4 回、日本住血吸虫のペロキシレドキシニンである Prx-1 と Prx-2 の long-dsRNA を 20µg 尾静脈から投与した。感染マウスは感染 40 日後に屠殺し、灌流法により虫体を取り出した。また、肝臓、腸管を取り出し、消化することで虫卵を回収した。虫体はさらに RNA を抽出し、定量リアルタイム PCR を行い、それぞれの mRNA レベルを比較した。

4. 研究成果

(1). シストソミュラ cDNA をテスター、セルカリア cDNA をドライバーとしたサブトラクションを行い、得られた遺伝子産物をサブクローニングした後、シーケン解析を行った。その結果、192 コロニーから 130 遺伝子をクローニングし、ホモロジー検索によりその遺伝子を決定した。図 1 にその機能から分類された遺伝子の分布について示す。

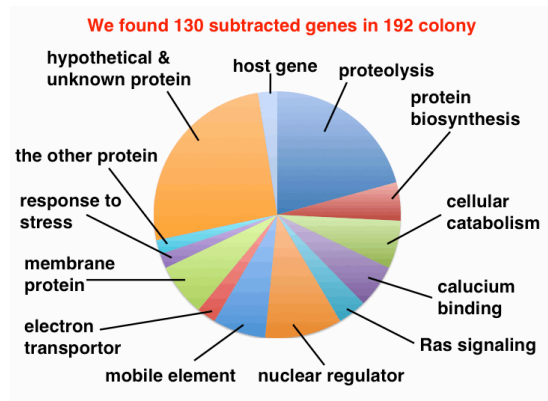


図 1. サブトラクションにより検索されたシストソミュラ特異遺伝子

最もヒット数の多かった遺伝子としては、proteolysis に属するカテプシン B が検出された。カテプシン B は、主に赤血球を代謝す

ることで必要とされる酵素であり、哺乳類宿主への感染を契機に上昇することが知られている。このことから、今回のサブトラクションがシストソミユラ特異遺伝子を選別していることが確認された。

また、カルシウムイオンの移動や、細胞内シグナルに関わる遺伝子についても、同様に検出され、宿主感染の情報が新たなシグナルとなり、様々な情報を伝える必要があることがわかる。それに伴い、膜形成に関わる遺伝子も多数見つかっている。住血吸虫の場合、セルカリアの宿主への侵入後、シストソミユラになる際、急激な膜構造の変化を伴うことは知られている。このような分子の上昇が宿主への適応に関連していると考えられ、ワクチン候補や、宿主免疫回避等に関与している可能性が考えられる。

興味深いことに、レトロトランスポゾン遺伝子の発現の上昇も確認された。住血吸虫は宿主の遺伝子を取り込むことが報告されており、それにより宿主環境への適応や、好適宿主の認識を行っていると考えられる。このようなモバイルエレメントがその役割を担い、遺伝子の移動を行っていると思われ、今後の研究の足がかりになると思われる。また、実際に宿主自体の遺伝子も少数見つけた。これがコンタミネーションによるものかは、議論のあるところであるが、もしかすると宿主の遺伝情報がそのまま、住血吸虫に入っている可能性も考える必要がある。

一方で、未だに機能未知の遺伝子が全体の25%以上を占めた。このことから、住血吸虫のシストソミユラには、未知な部分が多く、その宿主適応や、免疫回避に関わる薬剤・ワクチンの標的となりそうな遺伝子が多く眠っていると考えられた。

(2). これらのサブトラクションで見つかった遺伝子を用いて、RNAi スクリーニングを行った。すべての遺伝子を行うことはできなかったが、50 の遺伝子を用いて RNAi スクリーニングを行い、虫体の生存に必要な遺伝子、及び、NO 耐性に関係する遺伝子を探索した。図2に示すように、虫体の生存率が50%以下となる効果をもたらした遺伝子が、8/50 見つかった。見つかった遺伝子は主に、核内の転写因子に働くものや、核タンパク質、カルモジュリン等のカルシウム結合タンパク質等も見つかった。それ以外にも機能のわからないタンパク質も見つかった。これらの遺伝子をさらに2次スクリーニング等することで、標的を絞り、薬剤ターゲットとなるか検証することが必要であると考えられた。

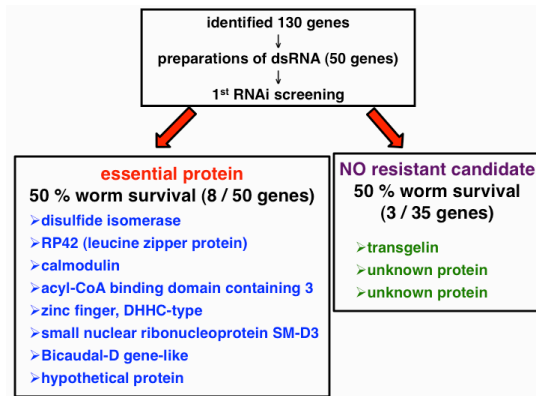


図 2 RNAi スクリーニングにより検出された遺伝子

次に、NO 耐性に関わる遺伝子についても RNAi スクリーニングしたところ、DETA/NO 処理に対し 50%以下の生存率を示した遺伝子は、3/35 であった。検出された遺伝子はトランスジェリンと機能未知のタンパク質であった。トランスジェリンは筋タンパク質の一つであり、この分子がなぜ NO の耐性に関与するかわからないが、この分子は非常に多くの役割を持つタンパク質であることも知られており、住血吸虫における NO 耐性に関わり、免疫回避に繋がる機能を持つ可能性はあると考えられる。他の機能未知の分子とともに、更なる解析を進めるべきであると考えられた。

今回、部分的なスクリーニングしか行えなかったが、全ての遺伝子に対してスクリーニングを行うことで、多くの候補遺伝子を検出し、解析を重ねることで、薬剤・ワクチンの標的となる遺伝子を見つけることができると確信している。

(3). 今後の遺伝子解析のために、宿主内に寄生している住血吸虫での遺伝子機能解析は必要になってくると考えられる。そのためにも、*in vivo* RNAi の手法も役立つと考え、その可能性についても検証を行った。

すでに我々の実験で RNAi を行い実績のある抗酸化タンパク質の2つのペルオキシレドキシシン (Prx-1, Prx-2) 遺伝子を標的とした。日本住血吸虫感染4週目のマウスの尾静脈に dsRNA を投与し、その RNAi の効果を調べた。結果、mRNA の発現レベルは投与後3日目には、40%ほどの減少が見られた。さらに、虫体への効果を観察したところ、虫体数の減少は確認されなかったが、どちらの Prx を投与した場合でも産卵数が有意に減少していた (図3)

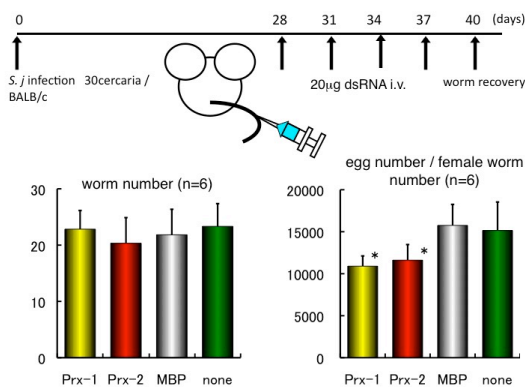


図3 *in vivo* RNAi の投与スケジュールと虫体数、産卵数への効果

これらのことより、*in vivo* RNAi は *in vitro* RNAi と比べて、その遺伝子ノックダウンの効果は低いが (*in vitro* RNAi では 90%近く遺伝子発現減少)、その表現型となる影響を部分的に観察できると考えられた。しかし、遺伝子の発現を抑制する更なる工夫が必要であると考えられ、コレステロール結合や、その導入剤等を検証していく必要があると考えられる。

(4). 本研究では、サブトラクション法により、日本住血吸虫シストソミュラで発現が上昇する特異遺伝子の検索を行った。この実験についての従来の報告はなく、新規の知見であると言える。この情報から、シストソミュラでの新たな遺伝子を調べるための基礎情報となると思われる。また、これらの遺伝子を用いた大規模な RNAi スクリーニングについても新たな試みであり、住血吸虫での報告は未だ無い。今回、いくつかの遺伝子がスクリーニングにより検出され、新規薬剤開発や、ワクチン候補分子を検索する上での、新しい方法であり、その遺伝子を直接評価するための手法となった。発見された遺伝子については、今後さらに研究を進めていく予定である。また、従来住血吸虫研究での報告が無い新しい遺伝子機能解析のための *in vivo* RNAi 法についても評価を行った。今回の結果では、部分的な遺伝子の発現抑制は見られたものの、まだその効果は低く、今後は、更なる工夫が必要であると考えられる。しかし、その方法としてのポテンシャルと有用性は高く、今回の結果が、今後の研究の足がかりになると考えられた。

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 4 件)

- ①. Kumagai T,

Furushima-Shimogawara Rieko, Ohmae H, Wang TP, Lu S, Chen R, Wen L, Ohta N, Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate snails, *Oncomelania hupensis* by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 査読有, 2010, *in press*.

- ②. Anyan KW, Kumagai T, Shimogawara FR, Seki T, Akao N, Obata K, Bentum KB, Bosompen MK, Boakye AD, Wilson DM, Karasuyama H, Ohta N, Schistosome eggs have a direct role in the induction of basophils capable of a high level of IL-4 production: Comparative study of single- and bisexual infection of *Schistosoma mansoni* in vivo. Tropical Medicine and Health, 査読無, Vol. 38, 2010, pp.13-22.
- ③. Kumagai T, Osada Y, Ohta N, Kanazawa T. Peroxiredoxin-1 from *Schistosoma japonicum* functions as a scavenger against hydrogen peroxide but not nitric oxide. Mol Biochem Parasitol. 査読有, Vol.164, 2009, pp.26-31.
- ④. Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. Int J Parasitol. 査読有, Vol. 39, 2009, pp. 457-64.

[学会発表] (計 11 件)

- ①. 熊谷 貴、他、Molecular characterizations and functions of systemic RNAi deficiency-1 from *Schistosoma japonicum* 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜
- ②. 熊谷 貴、他、RNA 干渉の日本住血吸虫にとっての意義とは何か? ~環境 dsRNA の取り込みという視点から~、第 20 回日本生体防御学会学術総会、2009 年 7 月、東京
- ③. 熊谷 貴、他、日本住血吸虫シストソミュラ特異遺伝子を標的とした RNAi スクリーニング、第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月、東京
- ④. Takahi Kumagai et al, Characterization of systemic

RNAi deficiency-1 from *S. japonicum*, The Japan-US cooperative medical science program; 43th Joint conference on parasitic disease, Tokyo, Japan, 7th January, 2009

- ⑤. 熊谷 貴、他、In vivo RNAi による Prx ノックダウン日本住血吸虫での産卵抑制、第 31 回日本分子生物学会合同大会、2008 年 12 月、神戸
- ⑥. Takahi Kumagai et al, Gene suppressions in *Schistosoma japonicum* by RNA interference, and the incorporation of dsRNA into the bodies, The 14th Korea-Japan-China Parasitologist's Seminar-Forum Cheju-14. October, 2008. Korea
- ⑦. Takahi Kumagai et al, Direct gene suppression of peroxiredoxins from *Schistosoma japonicum* in the portal vein by in vivo RNA interference, 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria. September, 2008. Korea
- ⑧. 熊谷 貴、他、In vivo RNAi 法を用いた日本住血吸虫ペルオキシレドキシンの解析、第 19 回日本生体防御学会合同大会、2008 年 7 月、札幌
- ⑨. 熊谷 貴、他、感染宿主内の日本住血吸虫 peroxiredoxin を標的とした in vivo RNAi 法、第 77 回日本寄生虫学会大会 2008 年 4 月、長崎
- ⑩. 熊谷 貴、他、ペルオキシレドキシンを標的とした日本住血吸虫への *in vitro/in vivo* RNAi の検討、第 30 回日本分子生物学会年会合同大会、2007 年 12 月、横浜
- ⑪. 熊谷 貴、他、日本住血吸虫ペルオキシレドキシンの抗酸化機構の解析、第 18 回日本生体防御学会学術総会、2007 年 7 月、福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：新規抗住血吸虫剤

発明者：綿谷有佑、金恵淑、平本晃子、佐藤聡、太田伸生、熊谷 貴、下河原理江子、谷口斎恵

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：特願 2008-172663

出願年月日：2008 年 7 月 1 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 貴 (KUMAGAI TAKASHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40369054

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし