

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07467

研究課題名(和文) ライフサイクル遮断によるアフリカトリパノソーマ症制御法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel control measure for African trypanosomiasis based on the blocking of lifecycle progression

研究代表者

櫻井 達也 (Sakurai, Tatsuya)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60547777

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)：Trypanosoma congolenseのメタサイクリック型が血流型へと分化する分子メカニズムの解明を目的に、主にプロテオーム解析によるアプローチを行った。in vitroでメタサイクリック型を調製し、分化誘導下で発現するタンパク質の経時的な変化、及び異なる組成の培地を用いて分化誘導した際に発現するタンパク質の変化等を解析した。発現量に変化がみとめられたタンパク質について、予想される生物機能等に関する情報を収集した。また、T. congolenseのタンパク質の生物機能解析を実施する基盤の整備を進め、近年報告された安定的にRNA干渉を実施するためのプラスミドベクターを導入した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アフリカトリパノソーマ原虫の生活環におけるメタサイクリック型から血流型への細胞分化は、原虫感染にとって必須の生物現象であり、新規疾病制御法を開発する上で有望な標的となりうると考えられる。しかし、その分子メカニズムは未解明である。本研究及びその成果は、上記の原虫の細胞分化に関係するタンパク質の同定と、これを標的とした新規疾病制御法の開発に向けた研究の基盤となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed at elucidation of the molecular mechanisms underlying differentiation from the metacyclic form (MCF) to the bloodstream form (BSF) in Trypanosoma congolense. Proteomic analyses were performed using in vitro derived MCFs. We analyzed time-course changes in protein expression of the MCFs under induction of differentiation, as well as changes in protein expression when differentiation was induced using culture media of different compositions. Based on the results yielded, we searched for information on the predicted biological functions of the proteins with altered expression levels. In addition, we have introduced a plasmid vector for sufficient RNA interference in T. congolense which has been reported recently.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：アフリカトリパノソーマ 細胞分化 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) アフリカトリパノソーマ症とは

アフリカトリパノソーマ症は、アフリカトリパノソーマ原虫の感染によって引き起こされるヒトと動物の致死性の原虫感染症である。アフリカトリパノソーマ症は、ツェツェバエによって媒介され、サハラ砂漠以南のアフリカ諸国に蔓延する。ヒトアフリカトリパノソーマ症はアフリカ睡眠病、動物アフリカトリパノソーマ症はナガナ病とも呼ばれる。アフリカ睡眠病では、約6,000万人が感染の危機に曝されており、死者は毎年5万人にのぼるとされる。一方、ナガナ病では、年間300万頭のウシが死亡しており、その被害額は年間1,000億円以上と推定され、アフリカ諸国の蛋白資源生産と経済に甚大な被害を及ぼしている。アフリカ諸国の経済発展とヒトの健康のためには、アフリカトリパノソーマ症の制圧が急務である。WHOは、アフリカ睡眠病を、制御・制圧を目指す20の「顧みられない熱帯病 (Neglected Tropical Diseases, NTDs)」の一つとしている。しかし、現在、アフリカトリパノソーマ症に対して、最も効果的な疾病制御法であるワクチンは存在しない。

(2) アフリカトリパノソーマ症制御法開発の現状

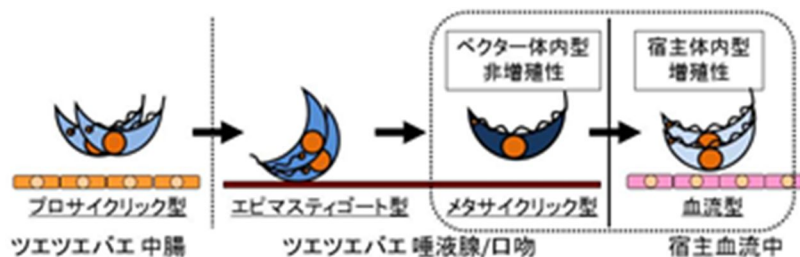
アフリカトリパノソーマ症に対するワクチン開発が困窮を極める背景には、原虫の巧みな寄生戦略がある。宿主の血流中に寄生したアフリカトリパノソーマ原虫の虫体細胞表面は、VSG (variant surface glycoprotein) という発育ステージ特異的糖タンパク質によって非常に密に覆われている。VSGは物理的なバリアとして機能し、宿主の補体等から虫体を保護する。また、アフリカトリパノソーマ原虫のゲノム中には、約1,000のVSG遺伝子が存在するとされ、原虫はVSGの抗原変異により宿主免疫機構を回避する。このため、ヒト・動物に感染する病原体の抗原を免疫するという従来型のワクチンでは、アフリカトリパノソーマ症の制御は事実上不可能であるといえる。現在、アフリカトリパノソーマ症の対策は、サーベイランスの強化による患者の早期発見・治療や、ベクターであるツェツェバエに対する対策等によって実施されているが、効率等の面で限界がある。このような理由から、新しいコンセプトに基づくアフリカトリパノソーマ症制御法の開発が喫緊の課題となっている。

(3) 新規アフリカトリパノソーマ症制御法の開発に向けて

アフリカトリパノソーマ原虫は、宿主(哺乳類)とベクター(昆虫)という、大きく異なる寄生環境に適応するために、細胞分化を伴う複雑な生活環を有している。アフリカトリパノソーマ原虫の生活環は、主に4つの発育ステージで構成される。宿主の血流中に寄生した血流型が、吸血によってツェツェバエに取り込まれると、その中腸内でプロサイクリック型へと分化し、宿主への感染性を失う。プロサイクリック型は、ツェツェバエの口吻・唾液腺内へと移行し、エピマスティゴート型へと分化する。エピマスティゴート型は、ツェツェバエ組織に強く接着して増殖し、その後、宿主への感染能力を有するメタサイクリック型へと発育する。そして、メタサイクリック型が、ツェツェバエの吸血時に、唾液とともに新たな宿主へと伝播され、その体内で再び血流型へと分化する。一般に、寄生虫病のコントロールには、その生活環を遮断することが有効であり、これはアフリカトリパノソーマ症についても例外ではないと考えられる。このため、一連の発育・細胞分化は、新規のアフリカトリパノソーマ症制御法を開発する上で、有望な標的になりうると考えられている。近年、世界中で、アフリカトリパノソーマ原虫の発育の誘導因子の同定や、細胞分化の分子メカニズムの解明に向けた研究が、活発に展開されている。

2. 研究の目的

研究代表者は、アフリカトリパノソーマ原虫が宿主に感染する時点では非増殖性のメタサイクリック型ステージであり、その後、増殖性の血流型ステージに分化する点に着目した(下図)。原虫が宿主に感染しても、血流型として増殖しなければアフリカトリパノソーマ症を発症することはないと考えられ、このメタサイクリック型ステージから血流型ステージへの細胞分化は、アフリカトリパノソーマ症予防法を開発する上で有望な標的になりうると考えた。本研究の目的は、アフリカトリパノソーマ原虫のメタサイクリック型ステージから血流型ステージへの細胞分化の分子メカニズムを解明することである。



アフリカトリパノソーマ原虫の生活環

### 3. 研究の方法

#### (1) 試験管内での発育・細胞分化の再現

本研究課題は、試験管内において、生活環における全発育ステージの培養と、各発育ステージ間の細胞分化を再現可能な *Trypanosoma congolense* を用いて実施した。解析には、ゲノムプロジェクトにも用いられた標準株である *T. congolense* IL3000 株を用いた。解析に用いる虫体を、以下の方法に従って *in vitro* で調製した。*T. congolense* のベクター体内ステージの培養は、Hirumi らの開発した培養法を踏襲して行った (Hirumi et al., 1992)。イーグル MEM を基礎培地に Hirumi らが開発した TVM-1 培地を用いてプロサイクリック型虫体を 27℃、大気条件下で培養し、エピマスティゴート型ステージへの細胞分化を誘導した。培養フラスコのプラスチック底面に強力に接着して増殖し、コロニー状の細胞集塊を形成したエピマスティゴート型虫体を、TVM-1 培地を用いて維持することで、培養上清中に非接着性のメタサイクリック型虫体を得た。陰イオン交換カラム (DE52) を用いることで、メタサイクリック型虫体のみを培養上清中から分離、回収し、次項の細胞分化誘導実験に供した。

#### (2) 細胞分化誘導

メタサイクリック型虫体を、IMDM を基礎培地としてヤギ血清 (goat serum, GS) 等を添加して調製した HMI-9 培地に懸濁し、33℃、5% CO<sub>2</sub> で培養することで、血流型ステージへの分化を誘導した (Hirumi and Hirumi, 1991)。誘導開始後、経時的に光学顕微鏡下で原虫の表現型 (細胞接着性および増殖性の有無) 等を観察することで、血流型ステージへの発育を確認した。研究代表者が過去に行った研究の結果等を基にして、分化誘導開始後、0 時間、6 時間後、12 時間後に虫体細胞を回収した。また、分化誘導に用いる血清の由来となる動物種差がタンパク質発現等に与える影響を検証した。GS またはウシ胎仔血清 (fetal bovine serum, FBS) を添加して調製した HMI-9 培地を用いて、上記と同様の分化誘導条件下においた。メタサイクリック型虫体を、FBS 添加 HMI-9 と GS 添加 HMI-9 中で、それぞれ 12 時間培養し、虫体細胞を回収した。各細胞試料を次項のプロテオーム解析に供した。

#### (3) プロテオーム解析

プロテオーム解析は、一般財団法人化学物質評価研究機構に委託して実施した。原虫細胞試料を送付し、同機構で還元アルキル化およびトリプシン処理を行い、MS 解析用試料を調製した。各解析試料の nanoLC-MS/MS 分析 (ショットガン解析) は、液体クロマトグラフに UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific) を、質量分析装置に Q Exactive Plus 四重極/Orbitrap ハイブリッド質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、測定を実施した。データベース検索には、Mascot および Proteome Discover を用いた。各試料間の MS/MS データの比較解析には、プロテオミクス統計解析ソフトウェアである Scaffold を用いた。発現に有意な変動がみられるなどしたタンパク質に関しては、トリパノソーマ原虫のゲノム情報等に関するデータベース等を用いて、予想される局在や生物機能等に関する情報等を検索した。

#### (4) 生物機能解析実験系の整備

近年、英国の研究グループが報告した *T. congolense* において安定的に RNA 干渉を行うためのプラスミドベクターを導入した (Awuah-Mensah et al., 2021)。

### 4. 研究成果

#### (1) 試験管内細胞分化

本研究で実施した試験管内での *T. congolense* 細胞発育・分化は、過去の研究や、研究代表者が行った予備実験をよく再現し、高効率に各生活環ステージ発育を再現することができた。特に GS 添加 HMI-9 を用いて誘導したメタサイクリック型ステージから血流型ステージへの発育・細胞分化では、血流型の表現型の特徴である接着性と増殖性を示す原虫細胞の経時的な増加が、再確認された。

#### (2) プロテオーム解析

プロテオーム解析は、受託解析で実績と定評のある一般財団法人化学物質評価研究機構において実施した。同機構が独自に開発した 500 mm の超ロング nanoLC カラムを用いた液体クロマトグラムにより、高分解能な LC-MS/MS (ショットガン解析) を実施することができた。研究代表者は、これまでに実施したプロテオーム解析 (n=1 で実施、定量値としてスペクトルカウントを使用) から、約 2,700 の原虫タンパク質について、細胞分化誘導下での発現の経時的な変動に関する情報を得ていた。本研究では、各試料において n=2 で測定を実施したこと、および定量値として iBAQ 値 (intensity based absolute quantification) を用いたこと等により、再現性の評価と定量性を重視した。得られたデータと、これまでのプロテオーム解析によって得られていた結果等を併せて活用するなどして、発現量に変化が認められたタンパク質の選抜等を行った。得られた結果について、個別のタンパク質の名称等に関しては、数が多いこと等から、本報告書では記載を差し控えるが、宿主やベクターとの相互作用において重要な役割を果たすと考えられる細胞表面分子等に関する興味深い解析結果が得られたと考えている。

### (3) RNA 干渉実験系の導入

アフリカトリパノソーマ原虫は、組換え原虫の作成が比較的容易なことが知られている。特にアフリカ睡眠病の原因となる *T. brucei* では、組換え原虫作成技術を用いて、テトラサイクリン誘導性に任意のレポーター遺伝子や二本鎖 RNA を強制発現させる実験系が確立している。これらは、同属原虫において逸早く公開されたゲノム情報等と併せて、*T. brucei* のタンパク質の生物機能解析を実施する上で、強力なツールとなっている。一方、*T. congolense* においては、同様の手法を用いた RNA 干渉による発現ノックダウンが可能であるとする報告はあったものの、組換え原虫の安定性等にやや難があるとされてきた (Inoue et al., 2002)。研究開始当初は、この Inoue らが報告した RNA 干渉実験系を用いる計画であったが、研究期間中に、英国の研究グループから、*T. congolense* において、安定的に組換え原虫を作成・維持可能で、信頼性が高い RNA 干渉実験が実施可能とするプラスミドベクターについての報告がなされた (Awuah-Mensah et al., 2021)。そこで、研究計画をより効果的に遂行するために、研究グループの代表者と交渉することで、このプラスミドベクターを得ることができた。また、*T. congolense* を用いた研究を展開する上での、様々な情報交換を行うことができた。

あらゆるアフリカトリパノソーマ症ワクチンの開発研究が結実しない中で、現在、アフリカトリパノソーマ症の新規感染制御法開発に向け、治療薬の標的となるような原虫特異的な代謝経路の探索等、様々な研究が精力的に行われている。その中であって本研究は、細胞分化という、原虫にとって極めて重要な生物現象を標的とした新規疾病制御法開発に向けた基礎研究と位置付けられる。過去には、アフリカトリパノソーマ原虫の各発育ステージのプロテオーム解析を行った研究は存在するが、本研究のように、細胞分化過程での経時的なタンパク質発現の変化等を網羅的に解析した例はほとんどない。本研究の成果は、メタサイクリック型(ベクター体内ステージ)から血流型(宿主体内ステージ)への発育という、アフリカトリパノソーマ原虫の感染・伝播にとって、必須の細胞分化の分子メカニズムの解明に資するものと考えている。今後は、本研究で得られたプロテオーム解析の結果や、原虫タンパク質の生物機能解析法を駆使することで、原虫の細胞分化に関係するタンパク質の同定と、これを標的とした新規疾病制御法の開発に向けた研究を展開する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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
---------	---------