

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22406009

研究課題名(和文) フィリピンにおける若年性住血吸虫性肝線維化症発症機序の免疫遺伝学的検討

研究課題名(英文) Immunogenetic analysis of early onset schistosomal fibrosis in the Philippines

研究代表者

菊池 三穂子 (KIKUCHI, Mihoko)

長崎大学・熱帯医学研究所・講師

研究者番号：40336186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：フィリピン・ソルソゴン州において、35才以下で発症する若年性肝線維化症発症機序の解明のために、ハイリスク集団約200人を対象に感染状況観察と肝線維化症感受性をコントロールする免疫応答性を明らかにすることを目的とした。若年性住血吸虫性肝線維化症を発症した対象群で、遺伝解析及び免疫応答についての解析を行ったところ、HLA-DRB1*1501遺伝子、IL-13 Promoter領域、IL12B遺伝子の変異が相関することが明らかとなった。また、mRNAの網羅的発現解析の結果から、HLA-DRB1*1501に拘束される免疫応答は、HLA分子の発現量に依存することなどの新知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Post-schistosomal hepatic fibrosis and cirrhosis are the major sequelae resulting from excessive immune response to deposited eggs in the portal area. In humans little is known about immunoregulatory mechanisms controlling the development of hepatosplenic disease. The objective of the study is to determine the prevalence of the early onset schistosomal fibrosis and the different host genetic factors and mechanism behind the immune responses in patients with early onset schistosomal liver fibrosis in the Sorsogon Province, Philippines. The subjects were subjected to Kato-katz stool examination, ultrasonographic examination, and detection of anti-SEA antibody, located in the schistosomiasis endemic barangays of the municipality of Irosin, in the province of Sorsogon. Results of immunogenetical analysis showed measure immune-responses in early onset post schistosomal fibrosis was restricted HLA-DRB1*15:01 and progression was related on expression level of HLA-DRB1 gene.

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：日本住血吸虫 フィリピン 肝線維化症 免疫応答性 遺伝解析 HLA-DRB1*1501 mRNA

1. 研究開始当初の背景

フィリピンにおける日本住血吸虫症は全国土の10%で流行しており浸淫地では死亡原因の第9位にランクされている。フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州は高度浸淫地で、連携研究者である千種、海外共同研究者の Leonardo らが2005~6年に行った延べ1500名に及び疫学調査の結果では、虫卵陽性率 (Kato-Katz) は6.3%、虫卵に対する抗体陽性率は61.4%を示す。また、同時に行った超音波検査10歳代においてネットワークパターンを示す肝線維化症患者が12.3%、20歳以上では55.3%が存在する浸淫地であることが報告されている。これまでに研究代表者らは、中国の日本住血吸虫浸淫地において、HLA クラス II の特定のアレルが肝線維化症抵抗性あるいは感受性に相関することを報告している (Hirayama et al. 1999) が、地域も民族も異なる浸淫地で独立に行われた研究で、肝線維化症に相関していた HLA アレルは、驚いたことに中国とフィリピンで感受性アレルが同じであった。住血吸虫性肝線維化症は感染を繰り返した結果、肝臓に蓄積された虫卵周囲に形成された結節の線維化が進行することによって発症し、この免疫応答は T 細胞に制御されていることが報告されている。従って、DRB1*1501 により、提示された虫卵由来の抗原に刺激された T 細胞の免疫応答が肝線維化症の重症化を促進させたものと考えられた。活性化 T 細胞がいかなる機序を持って肝線維化症に関わるのかについては、IL-13 による虫卵結節周囲の線維化誘導などが報告されているが、ヒト集団における報告は限られている。

2. 研究の目的

日本住血吸虫症浸淫地においては、職業上の理由から感染型セルカリアに汚染された水に接触する機会が多いハイリスク集団が存在する。この集団中には同様に暴露されながらほとんど感染しない感染抵抗性の者から頻回に感染を繰り返し、重症の肝線維化症を発症する感受性の者までが集団中には存在すると考えられている。発症には、免疫応答が最も強く関与していると考えられることから、この集団中の感受性の個体が示す何らかの特異な免疫応答性を解明することは、有効な治療法の開発へと繋がる。フィリピン・ソルソゴン州及びカガヤン州において、

特に35才以下に多くの肝線維化症患者が存在することから、この若年性肝線維化症発症機序の解明のために、各地域でそれぞれハイリスク集団約200~500人を対象にコホートを設定し2年間の感染状況観察とその際の免疫応答性のモニタリングを行うことにより、ヒト集団の住血吸虫感染の際の免疫応答性の多様性と肝線維化症感受性あるいは、感染抵抗性の関連について解析する。肝線維化症感受性をコントロールする免疫応答性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

長崎大学(研究代表者)とフィリピン大学・寄生虫学(レオナルド教授)との共同研究として行われ、フィリピン・ソルソゴン地区保健センター、カガヤン地区保健センターの協力のもとに、日本:住血吸虫浸淫地に居住するハイリスク集団を対象とした、2年間の前向きコホート研究を行う。住民のうち感染率の特に高く、肝線維化症発症リスクも高い35才以下候補者の集団からランダムに500~1000人を選別し、インフォームドコンセントを取得したのち、調査を開始する。対象者に対し、虫卵検査、超音波検査、採血を実施する。全血のRNA抽出、血清の抗体測定や循環抗原の測定を行い、検便や血液検査により感染が判明すればプラジカンテルによる治療を行う。2年間の結果を解析したのち、特に特徴的な個体について、さらに詳細な免疫応答性の解析を行う。

4. 研究成果

(1) フィリピンにおける若年性での住血吸虫性肝線維化症の実態調査(科研基盤 B 海外学術;平成22~24年)のため、高度浸淫地であるフィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州の浸淫地に点在する16小学校の小学5、6年生1200名を対象として、血中抗体価検査、糞便虫卵検査、腹部超音波検査を施行した結果では、血中抗体価陽性率が学童の20%以上を示す小学校が7校、10%以上が5校存在していた。特に Tulay 小学校は90%の抗体価陽性率を示した。これは、校庭裏に感染貝の生息地があった事が原因であった。また、4校で各1例、計4例の肝線維化症が確認された。Tulay 地域の住民を対象に調査を行い年齢群別に解析したところ、10~30歳での肝線維化症発症率は8.4%、50歳以上になると60%以上が肝線維化症を発症していた。ソル

ソゴンでは 2011 年から、ブラジカンテルによる集団治療が開始されているが、便中虫卵検査の結果では、虫卵陽性者が散見する。特に Tulay 小学校児童の血中抗体価陽性率は 90%にも上ったため、同学区域の住民を対象に調査をおこなった。〔 〕は調査実数 15~19 歳群以外の全ての年代層で便中虫卵陽性者を認め、この地域での再感染率が高い。(図 1)(論文準備中)。この結果、Tulay 地域のような高度浸淫地では、住血吸虫性肝線維化症に対するハイリスク集団が存在することが明らかとなった。

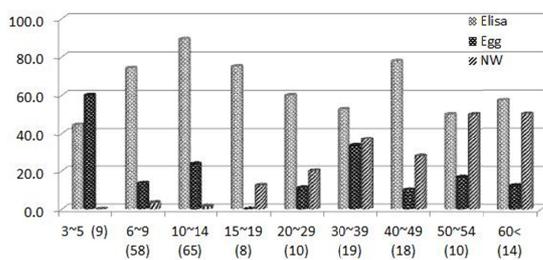


図 1 Tulay の地域住民の年齢別血中抗体価陽性率、虫卵陽性率、肝線維化症陽性率 (2012)

(2) 肝線維化症を憎悪させる要因に関わる免疫関連遺伝子を探索する目的で、免疫応答に関わる遺伝子等の近傍に設定したマイクロサテライトマーカー多型を用いて相関解析を行った。対象群は 15~35 才の肝線維化症群と 36 才以上の非肝線維化症群で、50 の免疫応答関連遺伝子近傍に設置したマイクロサテライトマーカーのうち、7 マーカーに、有意差を認めるアレルを検出した。このうち、特に有意差及び発現頻度が高く、住血吸虫性肝線維化症の感受性と強い相関を示したマーカーは D3S3561 MS*214 (OR=3.21)、IL12B MS*241(OR=2.48)と IL-2 MS*383 (OR=10.3)であった。IL12B マーカーには抵抗性に相関する MS*245(OR=0.45)が観察された。これらの感受性・抵抗性アレルのホモ接合体を持つ患者が、線維化症群では MS*241 (31.5%)、MS*245 (23.1%)、正常群では MS*241 (61.5%)、MS*245 (27.8%)で MS*241 ホモ接合体は正常群で有意に増加していたことから、抵抗性に相関したと考えられた($p < 0.002$, OR = 0.24)。これらのマイクロサテライトマーカーと HLA-DRB1*1501 との相互作用は認められず、独立に肝線維化症の感受性に関与したと考えられた。抵抗性アレルを 2 個以上持つ場合あるいは、感受性アレルを 2 個以上持つ場合で

それぞれ、線維化症群と正常群と比較したところ、感受性アレルを持つ場合に有意差が認められたことから、感受性アレルの存在が肝線維化症に対して優性に働いた事が示唆された。有意差が検出されたマイクロサテライトマーカーのうち、IL12 は IFN- γ 産生を誘導するとともに、NK 細胞の細胞傷害活性を亢進させる活性を示し、いわゆる Th1/Th2 バランスの上で重要なサイトカインである。IL12B-MS*241 の連鎖する多型が IL12 発現量に関連するとすれば、このことが、直接的に線維化症発症に影響するかもしれない。相関を示すようなマーカーの多くはサイトカインや T 細胞応答に関わる遺伝子であった。

(3) DRB1*1501 陽性、30 才以下の若年で肝線維化が見られる患者 2 名 (A 群)、DRB1*1501 陰性、35 歳以上で肝線維化が見られなかった患者 2 名 (B 群)、DRB1*1501 陽性、健康人 1 名 (C 群)とし群間での発現量の増減の比較を行った。C 群と A, B 群で比較した結果、A, B 群で 423 遺伝子の高発現を認め、A 群と B, C 群の比較では、A 群で 16 遺伝子の高発現が認められた (表 1, 2)。また A 群で 9 遺伝子の発現量の低下が認められた。5 サンプルの遺伝子発現量に殆ど差がなかったものが 3426 遺伝子、住血吸虫感染者で高発現のものは 1124 遺伝子であった。

表 1. 住血吸虫症患者で高発現が認められた遺伝子 (423 遺伝子) 抜粋

8155849	annexin A1
7983360	beta-2-microglobulin
8006602	chemokine (C-C motif) ligand 4
8055465	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
8099471	fibroblast growth factor binding protein 2
7936734	fibroblast growth factor receptor 2
8105340	granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase)
7978366	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase)
7976443	interferon, alpha-inducible protein 27
8044021	interleukin 1 receptor-like 1
8026292	interleukin 27 receptor, alpha
8095680	interleukin 8

8031328	killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2
7961187	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1
8038809	natural killer cell group 7 sequence

住血吸虫症患者群では炎症に関わる遺伝子群の高発現が認められた。Granzyme A, B, CCL, CXCL1, IL-8 など、T 細胞、DC、Mφ、NK 細胞、好中球を動員させるサイトカイン遺伝子の発現量上昇が認められた。

表 2. 若年性肝線維症患者で高発現を認めた遺伝子 (16 遺伝子)

8071642	immunoglobulin lambda variable 6-57
8071658	immunoglobulin lambda variable 7-46
8044049	interleukin 18 receptor accessory protein
8125436	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
7958860	rabphilin 3A homolog (mouse)
8043431	similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor
8043476	similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor
8043433	similar to Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 precursor
8043474	similar to hCG26659 similar to Ig kappa chain V-I region HK102 precursor
7961295	taste receptor, type 2, member 43

MHC class II, IL-18 receptor accessory protein などの発現が高かった。IL-18 は T 細胞による IFN- γ の誘導、NKT 細胞の害活性化や、および Th1 細胞への分化誘導の補助などに関わる重要なサイトカインである。このサイトカインに対するレセプターの発現上昇が認められたということは、肝線維化症発症に関して、MHC class II 依存性の T 細胞応答が関わっていることが強く示唆していると考えられた。

住血吸虫症患者群で、ケモカイン、サイトカイン、NKT 細胞などの特に炎症に関わる免疫応答細胞関連遺伝子の発現量の上昇が認められた。住血吸虫感染後に発症する肝線維化が T 細胞依存性の免疫応答により形成されることが確認された結果であるとともに、さらに DRB1*1501

陽性住血吸虫性肝線維化症患者で、MHC class II 遺伝子の発現量の上昇が認められたことから、DRB1*1501 遺伝子そのものの発現量によって、直接的に免疫応答が増進している可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Kato-Hayashi N, Leonardo LR, Arevalo NL, Tagum MN, Apin J, Agsolid LM, Chua JC, Villacorte EA, Kirinoki M, Kikuchi M, Ohmae H, Haruki K, Chigusa Y. Detection of active schistosome infection by cell-free circulating DNA of *Schistosoma japonicum* in highly endemic areas in Sorsogon Province, the Philippines. *Acta Trop*. 2014 pii: S0001-706X(14)00168-5. 査読あり doi: 10.1016/j.actatropica.2014.

Mbanefo EC, Kikuchi M, Huy NT, Shuaibu MN, Cherif MS, Yu C, Wakao M, Suda Y, Hirayama K. Characterization of a gene family encoding SEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin)-domain proteins with lectin-like and heme-binding properties from *Schistosoma japonicum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014, 8(1):e2644. 査読あり doi: 10.1371/journal.pntd.0002644.

Weerachai Saijuntha, Blanca Jarilla, Alvin K. Leonardo, Louie S. Sunico, Lydia R. Leonardo, Ross H. Andrews, Paiboon Sithithaworn, Trevor N. Petney, Masashi Kirinoki, Naoko Kato-Hayashi, Mihoko Kikuchi, Yuichi Chigusa, and Takeshi Agatsuma. Genetic Structure Inferred from Mitochondrial 12S Ribosomal RNA Sequence of *Oncomelania quadrasi*, the Intermediate Snail Host of *Schistosoma japonicum* in the Philippines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014, Epub ahead of print, 査読あり doi: 10.4269/ajtmh.13-0260

Kato-Hayashi N, Yasuda M, Yuasa J, Isaka S, Haruki K, Ohmae H, Osada Y, Kanazawa T, Chigusa Y. Use of cell-free circulating schistosome DNA in serum, urine, semen, and saliva to monitor a case of refractory imported schistosomiasis hematobia. *J Clin Microbiol*.

2013, 51(10):3435-8. 査読あり
doi: 10.1128/JCM.01219-13.

林 尚子、菊池三穂子、千種雄一 フィリピンにおける日本住血吸虫症有病地の現状
日本獣医寄生虫学雑誌 JPN.J. Vet. Parasitol.
Vol. 12 (2) 79-86, 2013 査読なし
<http://jsvp.umin.jp/index.html>

Mbanefo EC, Chuanxin Y, Kikuchi M, Shuaibu MN, Boamah D, Kirinoki M, Hayashi N, Chigusa Y, Osada Y, Hamano S, Hirayama K. Origin of a novel protein-coding gene family with similar signal sequence in *Schistosoma japonicum*. BMC Genomics. 2012;13:260. 査読あり doi:10.1186/1471-2164-13-260.

Huy NT, Hamada M, Kikuchi M, Lan NT, Yasunami M, Zamora J, Hirayama K. Association of HLA and post-schistosomal hepatic disorder: A systematic review and meta-analysis. Parasitol Int 60(4): 347-356, 2011, 査読あり doi:10.1016.

[学会発表] (計 6 件)

菊池三穂子 他、Surveillance on Schistosomal Fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. 日本寄生虫学会 2013年03月30日～31日 東京 東京医科歯科大学 御茶ノ水キャンパス

Kikuchi M. et al. Immunogenetic analysis of the patients with early-onset of schistosomal liver fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. 5th The ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology (ACTMP) 2012年05月15日～17日 Manila, Philippine, University of Philippine

Kikuchi M. et al. Immunogenetic analysis of the patients with early-onset of schistosomal liver fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. Forum Cheju 15, 2012年05月23日～25日 宮崎 宮崎パームビーチホテル

Evaristus CM, Kikuchi M, et al. Origin of novel protein-coding genes with similar signal sequence in *Schistosoma japonicum*. 日本熱帯

医学会 2012年09月05日～06日 北海道
とかちプラザ

菊池三穂子 他、Surveillance on Schistosomal Fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. 日本熱帯医学会 2012年09月05日～06日 北海道 とかちプラザ

Kikuchi M, et al. Immunogenetic analysis of the patients with early onset schistosomal fibrosis in Sorsogon Province, the Philippines. 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases, Japan-US Parasitic Diseases Panel Meeting, Japan-US Cooperative Medical Science Program. 2011年1月10～11日、東京、東京大学

[図書] (計 1 件)

感染症事典編集委員会 編 共著 菊池三穂子 オーム社感染症事典 (総ページ数 617頁) 住血吸虫 pp527-532, 2012

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 三穂子 (KIKUCHI, Mihoko)
長崎大学・熱帯医学研究所・講師
研究者番号 : 40336186

(2) 研究分担者

千種 雄一 (CHIGUSA, Yuichi)
獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20171936

平山 謙二 (HIRAYAMA, Kenji)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号 : 60189868