

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590489

研究課題名(和文) 日本住血吸虫性肝線維化症重症化に寄与する虫卵由来分泌抗原の機能解析

研究課題名(英文) Characterization for secreted egg proteins associate with development of post schistosomal fibrosis.

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) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスあるいはミニブタ住血吸虫感染動物モデルを用いて、シグナル配列トラップ法によりクローン化した約7種類の組み換え分泌虫卵抗原の機能について解析した。この結果、日本住血吸虫特有の蛋白が同定され、セルカリア、ソミュラ、成虫、虫卵に発現し、レトロトランスポゾン領域を含み遺伝子重複によって、タンパク質として発現したものであることがわかった。この新規遺伝子ファミリーは、糖蛋白と結合するSEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin) ドメインを含む蛋白で、ヘムとの結合能が確認された。ヘムを解毒する為の住血吸虫にとって必須の蛋白と考えられる。

研究成果の概要(英文)：While isolating membrane-bound and secreted proteins as targets for *Schistosoma japonicum* vaccine, we identified a novel potentially functional gene family which had originated by a gene duplication mechanism. Here, we integrated structural homology modeling and biochemical methods to show that this gene family encodes proteins with sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin (SEA) domain, with heme-binding properties. Typical of SEA-structural domains, the characterized proteins specifically interacted with glycosaminoglycans, with implication in ligand gathering and immune-evasion. Consistent with modeled heme-binding pocket, we observed high affinity heme-binding and spectroscopic attributes of hexa-coordinated heme iron. Localization of the native gene-products on adult worm tegument and gastrodermis, host interfaces for heme-sequestration and acquisition, suggests potential roles for this gene family in heme-detoxification and heme-iron uptake.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：日本住血吸虫 肝線維化症 虫卵由来組み換え蛋白 新規蛋白機能解析 SEA-domain

1. 研究開始当初の背景

住血吸虫症では感染後、虫卵抗原により強力に Th2 タイプの免疫応答性に誘導されることが知られている。最近、この Th2 タイプ応答への誘導能はマンソン住血吸虫の主要虫卵抗原でもある、糖蛋白の 1 種 T2 ribo-nuclease OMEGA-1 の機能によって誘導されることが報告された (S. Steinfelder, 2009., B. Everts, 2009.)。

日本住血吸虫では、同様の報告はないが、同様の機能をもつ虫卵抗原が存在するものと考えられる。肝線維化症は、T 細胞応答性に依存し Th2 タイプのサイトカイン (IL-4, IL-13) 産生により線維化が誘導される。虫卵周囲に形成される結節は肝細胞の壊死を防ぐための生体防御反応であり、これを完全に抑制することは逆に重症化を招くことになりかねない。この他にも、虫卵分泌抗原には免疫応答を抑制する機能をもつ蛋白の存在も示唆されているが、分子としての本態は明らかになっていない。虫卵由来の抗原に関する分子レベルでの解析は未だ不十分である。これまでの住血吸虫症研究はマンソン住血吸虫症が主流となっており、この 2 種は近縁ではあるが、染色体解析の結果によれば 80% 程度の相同性と低い値を示す。マンソン住血吸虫で報告されていることが、必ずしも日本住血吸虫にあてはまるとは言えない。代表者らは、肝線維化症に関わると考えられる日本住血吸虫虫卵由来の分泌蛋白をシグナル配列トラップ法という方法を用いてクローニングした (Yu C. et al., Acta parasitologica, 2008)。これらの分泌蛋白には、特徴的な共通するシグナル配列が存在するが、このようなシグナル配列はマンソン住血吸虫には存在しなかった。また、他の部分の塩基配列でも相同と思われる分子は存在しなかった。マンソン住血吸虫に比較して、日本住血吸虫感染のほうが、より重症の肝線維化症になることはよく知られた事実であるが、その原因は 1 ペアあたりの産卵数の違いや、組織への粘着性の違いなどが指摘されているが明らかではない。虫卵分泌蛋白そのものの病害性が異なる可能性は高いと考えられる。虫卵抗原の機能解析は、肝線維化症の病態形成を理解する上において重要なポイントである。

2. 研究の目的

日本住血吸虫感染後、数年を経て発症する日本住血吸虫性肝線維化症に対する有効な治療法、治療薬はない。しかしながら、フィリピンの浸淫地においては、未だ多数の患者が存在する。本研究においては、感染動物モデルを用いて肝線維化症の原因となる住血吸虫虫卵由来の抗原の機能を解析することにより重症化阻止ワクチン、あるいは有効な治療法の開発を目指して研究を推進する。

3. 研究の方法

シグナル配列トラップ法によりクローニングした約 10 種類の分泌虫卵抗原のコーディング領域遺伝子の *in silico* 解析での機能解析を行う。また、発現ステージ、発現局在を特定する為に、大腸菌発現系を用いて組み替え蛋白を作成する。同時に、日本住血吸虫感染実験モデルとして、ミニブタと、マウスを用いて感染実験を行う。ミニブタは感染実験を数度繰り返し行い、肝線維化症を発症する経過を腹部超音波診断装置を用いて観察を行い、定期的に抹消血リンパ球を採取し各種抗原に対する免疫応答性についてモニタリングし、肝臓の組織学的検査を行う。マウスは同様に日本住血吸虫を感染させ各種組み換え抗原に対する免疫応答性について検討する。これらの結果を基に、分泌虫卵抗原が肝線維化症に寄与する機能について検討する。

4. 研究成果

マウスあるいはミニブタ住血吸虫感染動物モデルを用いて、シグナル配列トラップ法によりクローニングした約 7 種類の組み換え分泌虫卵抗原の機能について解析した。

(1) 20 のクローニングされた遺伝子には共通のシグナル配列モチーフが存在した。このシグナル配列は *S. japonicum* のゲノム中にさらに、27 の個別の mRNA 配列が存在することがわかった。これらの特徴的な遺伝子は、他の生物種のゲノムには認められず、日本住血吸虫特有な遺伝子であった。ゲノム上で散在的な複製に結びつく DNA レベル組換えに関わるレトロトランスポゾンについて解析を行った結果、レトロトランスポゾン領域がシグナル配列の近隣に存在し、これによって、遺伝

子重複がおり新規遺伝子ファミリーとして機能したものであることがわかった(図1)。

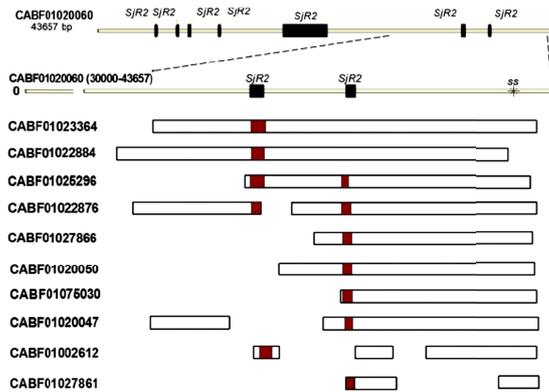


図1 赤字部分がシグナル配列トランスポゾン領域近隣に存在し、複製されて異なる染色体上に存在することが示唆された。

(2) 新規蛋白ファミリーの mRNA レベルでの虫卵、セルカリア、スポロシスト、ソミュラ、成虫での発現を確認したところ、各抗原によって、パターンが異なることがわかった(図2)

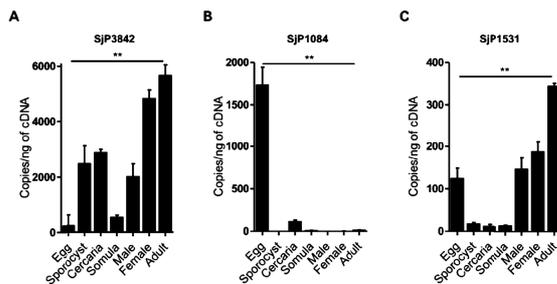


図2 虫卵、セルカリア、スポロシスト、ソミュラ、成虫の各ステージにおける mRNA の発現動態

また mAb を用いた発現局在は腸管城壁と体表に発現していた(図3)。

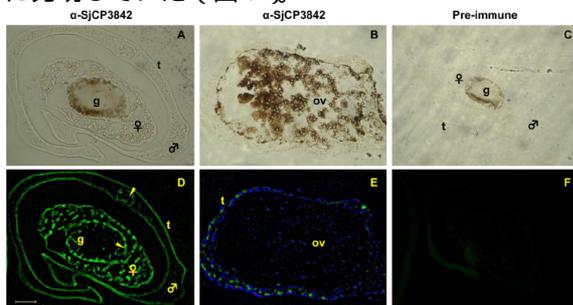
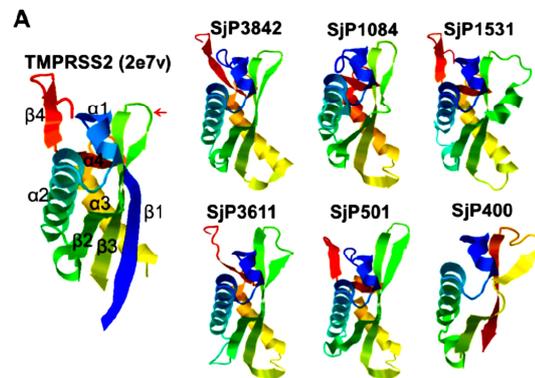


図3 A-C Bright field image (成虫) D: IFA FITC conjugate with mAb (anti -SjCP3842) E: DAPI staining F: Negative

(3) 新規蛋白ファミリーの機能を解析する目的で、機能と相関するモデル構造と比較することによって機能解析を試みた。この結果 SEA (sea-urchin sperm protein, enterokinase and agrin) 領域との打つ類似点を備えた細胞外の領域のモデル化された分子構造を持つことが示唆された。



SEA ドメインは GAG と称される糖蛋白と結合することが知られている。糖蛋白との結合能を組み換え蛋白を用いてテストしたところ、GAGとの結合能が強い事が示唆される結果を得た。また、ヘムとの結合能が確認された。ヘムを解毒する為の住血吸虫にとって必須の蛋白と考えられる。免疫動物血清を用いた結果では、強い抗原反応が観察された。肝線維化症に関わる検討は今後も継続して行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5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

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)

Mbanefo EC, Kikuchi M, Huy NT, Shuaibu MN, Cherif MS, Chuanxin Y, Suda Y, Hirayama K Characterization of a novel SEA-domain protein family with lectin-like and heme-binding properties from *Schistosoma japonicum* The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2013年09月10日～13日 Awaji

Yumebutai International Conference Center, Awaji City, Hyogo, Japan

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、Surveyllance on Schistosomal Fibrosis in Sorsogon Province, the Phillippins. 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

平山 謙二 (HIRAYAMA, Kenji)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：6018986