

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590503

研究課題名(和文) 住血吸虫由来の分泌型細胞外小胞による免疫抑制機構の解析

研究課題名(英文) Immunosuppressions by extracellular vesicles secreted from *Schistosoma japonicum*

研究代表者

熊谷 貴 (Kumagai, Takashi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40369054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アジアで流行する日本住血吸虫は、その宿主である哺乳類の門脈系の血管内に寄生し、赤血球を摂取することで生殖活動を行っている。今回、住血吸虫の免疫回避と性成熟における寄生システムについて、細胞外小胞に着目した。細胞外小胞とは、生物に広く見られる生体モバイル粒子である。今回、この細胞外小胞が日本住血吸虫より分泌していることを明らかにした。さらに、この小胞は、雌雄がペアになった時、赤血球を摂取した時に分泌が増加することも分かった。また小胞内には多量のmiRNAが含まれており、雌雄での相互遺伝子調整を行っていると考えられた。また、この小胞は宿主のTh1サイトカインを抑制する働きを持つことも見出した。

研究成果の概要(英文)：Schistosoma japonicum, which is endemic in Asia, parasitizes in the blood vessels of mammalian hosts. They take erythrocytes for their reproductive activities. In present study, we focused the extracellular vesicles, which is widely observed in the organisms as vital mobile particles. As the results, the extracellular vesicles secrete from adult worms, after male and female worms became to be paired, and after they took in the erythrocytes. Furthermore, we found abundant miRNAs, which regulate the targeting genes at the mRNA levels, in their vesicles. This means that the extracellular vesicles have roles on the male-female communications using gene-regulations by miRNAs. Finally, this vesicles also have roles on the suppression to Th1 cytokine productions. Taken together with our results, the extracellular vesicles secreted from *S. japonicum*, may be required in reproductive activities and immune evasions.

研究分野：寄生虫学

キーワード：細胞外小胞 住血吸虫 miRNA 赤血球 エクソソーム マイクロベシクル 免疫抑制 性成熟

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本住血吸虫は、その宿主であるヒトの体内で寄生生活を行う際に、血管内で雌雄成虫は抱合し、産卵を行う。このような血管内という環境下は、豊富な栄養源を摂取できるという反面、強い宿主防御免疫に暴露されることにもなる。そのため住血吸虫(特に成虫)はその免疫を抑える様々なメカニズムを有している。

(2) 近年、一般の生物の持つ細胞等が、二重膜に囲まれた小胞を多数分泌することが、知られてきた。特に、分泌される細胞外小胞(Extracellular Vesicles; EVs)は、様々な種類のもので報告されており、細胞内のオルガネラの一つ多胞体由来のエクソソーム(exosome; Ex)と細胞膜由来のマイクロベシクル(microvesicle; MVs)に大別される。特に Ex は研究が進んでおり、細胞と細胞の間での情報伝達を行うという報告が多数なされている。その内在している分子も特徴的であり、セラミド等を多く含んだ脂質や、ヒートショックタンパク質や、免疫関連タンパク質を運ぶと同時に、遺伝子発現を負に制御する miRNA を大量に含んでいることも分かってきた。このような miRNA が他の細胞で発言している mRNA を直接調整していると考えられ、細胞間のモバイル調節因子として機能していると報告されている。特に、腫瘍細胞等においては、Ex は特異的な miRNA を発現することが知られ、その内在する miRNA の種類を把握することは、様々な疾病のマーカーになると考えられている。

(3) すでに、日本住血吸虫の成虫より EVs が培養上清から回収できることを当研究者は見つけている。特に、大きさや形態から Ex 様の小胞が雌雄成虫から分泌していることを確認してきた。

2. 研究の目的

(1) 日本住血吸虫から分泌される EVs を詳細に観察することで、その性状を確かめる。またその回収法を確立することで、様々なアッセイを効率的に行う方法を整備する。

(2) 大量に回収した EVs を用いて、宿主免疫細胞への影響を観察する。特に住血吸虫感染において、宿主の Th2 細胞が誘導してくることが知られているので、この影響について詳細に観察する。

(3) 日本住血吸虫が血管内に寄生する段階で、どのようなメカニズムで MVs が分泌されてくるかについても同時に検討を行い、MVs の寄生生活での意義について検討を行う。特に、成虫では赤血球を摂取し始めてから、性的な成熟が行われることから、赤血球と EVs の関係について詳細に検討する。

(4) 日本住血吸虫の分泌する EVs の中に含まれている miRNA を網羅的に解析することで、どのような miRNA が関わっているかについて、検討を行い標的遺伝子の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 日本住血吸虫山梨株はマウスとミヤイリガイを用いて実験室内で維持しているものを用いた。ICR マウスへの感染後 7 週後に、成虫を門脈・腸間静脈より回収した。同時に肝臓・腸管を消化することで虫卵を回収し、継代維持に用いた。回収した虫体は抗生物質を添加した RPMI1640 内で培養を行い、1 週間後に上清を回収した。回収した上清は超遠心機を用いて、10,000g で 2 時間の遠心を行った。また、RNA 抽出用に市販の分離試薬を用いて、沈殿後遠心を行い回収した。回収した Ex 等の MVs は、電子顕微鏡にて観察を行い、その存在を確認した。また、EVs より RNA を抽出し、日本住血吸虫特異的な miRNA を検出した。また RNA-seq を行うことで、網羅的な miRNA の解析を行った。一方で、虫体からの EVs の分泌を直接観察するために透過型電子顕微鏡を用いた虫体表面の撮影を同時に行った。

(2) マウスの免疫細胞への影響を見るために、回収した MVs は培養液にて再懸濁し、マウスの脾臓より回収した脾細胞と共培養を行った。脾細胞は抗 CD3 で刺激することでサイトカインの測定を行った。また、細胞から RNA を抽出し、各種転写因子の発現の測定を行った。

(3) 日本住血吸虫の EVs と赤血球摂取との関係を観察するために、回収した虫体を雌雄ペアのものとし、それぞれ雄・雌に分けたサンプルを用いて、マウスの赤血球との共培養を行った。培養後上清から EVs を回収し、miRNA を解析した。この時、すでに報告のある EVs 分泌阻害剤を同時に入れることで、分泌メカニズムについての機能解析も行った。

4. 研究成果

(1) **日本住血吸虫より分泌された細胞外小胞** 雌雄ペアの成虫を培養し、回収した上清から EVs を回収した結果、図 1 左のような 100nm 以下のサイズを持ったエクソソーム様の小胞を確認した。また、RNA を抽出して、バイオアナライザーによって、どのような大きさの RNA が梱包されているかを確認したところ、図 1 右のような小分子 RNA が多数見られた。これらは miRNA であると考えられた。

The extracellular vesicles (exosome-like) secreted from paired worms

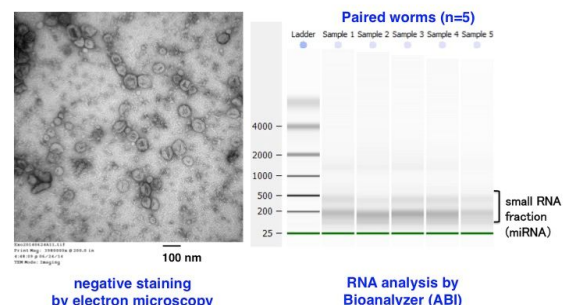


図 1 日本住血吸虫より回収された EVs

(2) **日本住血吸虫が分泌する EVs による宿主 Th1 細胞のサイトカイン産生抑制** 回収した EVs を用いて、抗 CD3 抗体で処理したマウス脾細胞に添加した結果、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生を有意に低下させた (図 2)。しかし意外なことに、抑制性サイトカインである IL-10 の産生も同時に低下させた。このことから、IFN- γ の産生抑制は IL-10 の誘導によるものではなく、直接的な応答であると考えられた。実際に Th1 細胞の誘導に関わる転写因子である t-bet の発現も抑制されていたことから、Th1 細胞への移行自体を抑制している可能性が考えられた。また IL-4 産生については、全く影響を与えなかった。また、CD4 細胞分離して、同様の実験を行った結果、CD4 非発現細胞でも同様の結果が観察された。これらのことから、IFN- γ の産生細胞は TH 細胞ではなく、その他の細胞群がメインであると考えられた。

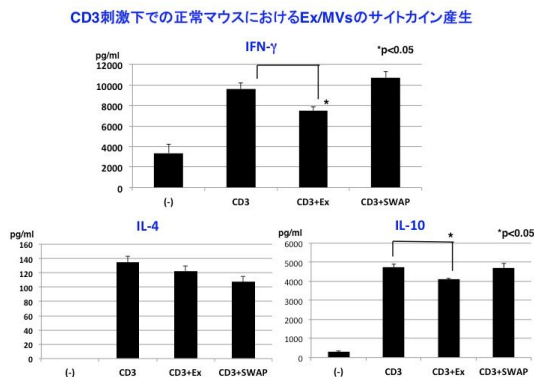


図 2 住血吸虫 EVs による各種サイトカイン産生への影響

(3) **日本住血吸虫成虫からの EVs におけるペアリング・赤血球の影響** 日本住血吸虫の EVs の分泌メカニズムと発育段階の関係を調べるために、性成熟に必要な赤血球の必要性について実験を行った。回収した雌雄成虫を培養する際に、マウス赤血球を添加した群と無添加の群で回収できた EVs を比較した。特に、日本住血吸虫特異的な miRNA (miR-Bantam, miR-3479) を指標として、その含有量を比較した。まず、図 3 にあるように、それぞれの単性での培養で回収される EVs よりも雌雄ペアの成虫の方多くの miRNA を分泌していることがわかった。次に、赤血球を添加した実験において、ペア成虫においては、有意に EVs の産生が上昇していた (図 4)。また、単性での実験の場合、雌でのみ分泌する EVs の上昇が見られた。このことから、赤血球の摂取は雌虫体に EVs の産生を誘導していると考えられる。このことは、赤血球の摂取により開始する性成熟は特に、雌虫体から分泌される EVs が雄に作用することで引き起こされるのではないかと考察された。実際に、雌虫体の表面を透過型電子顕微鏡で観察した結果、赤血球を添加した場合のみ、外被内に小胞が多

数観察された (図 5)。これらのことから、雌が雄に EVs を介した生殖シグナルを送っているのではと推測された。

雌雄ペア成虫と単性成虫から分泌される細胞外分泌小胞の miRNA

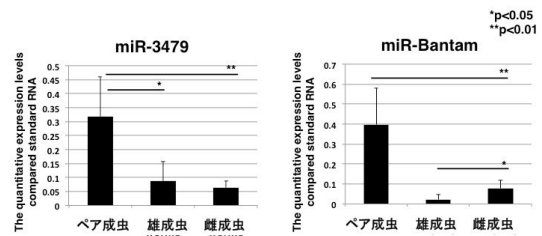


図 3 雌雄ペア成虫で分泌する EVs 中の miRNA

赤血球添加における細胞外分泌小胞への影響

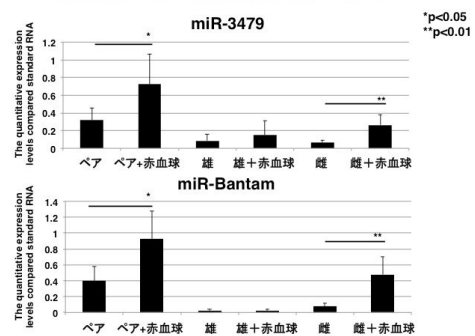


図 4 赤血球添加による EVs の分泌誘導

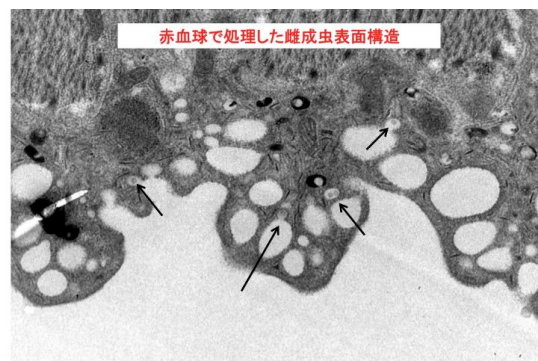


図 5 赤血球添加した雌虫体表面の微細構造 (矢印; 分泌型小胞と考えられる)

(4) **阻害剤を用いた EVs 分泌メカニズムについての検討** 成虫より分泌される EVs の詳細なメカニズムを検証するために、これまでに報告のあった EVs 分泌阻害剤を用いて、検討を行った。中性スフィンゴミエリナーゼ阻害剤である GW4869 は主に、Ex 形成に必要なセラミド合成を阻害することで、小胞の分泌を抑制する。培養下での住血吸虫成虫にこの阻害剤を加えたところ、その分泌に全く影響を与えなかった。また、カルシウムイオンは膜分泌の様々な局面で必要であることが知られているが、このカルシウムイオンのキレート剤である BAPTA-AM も Ex の分泌を抑制することが知られている。このキレート剤の添

加も住血吸虫からの EVs の分泌を抑制することは無かった。これらのことから、日本住血吸虫における EVs の分泌メカニズムは、他の生物とかなり異なっていると考えられた。実際、先の透過型電子顕微鏡による解析でも、他の生物で分泌に関わる多胞体は観察され無かったことから、住血吸虫は独自のシステムで EVs を分泌していると推測された。

(5) **miRNA-seq による日本住血吸虫由来 EVs 内の網羅的な miRNA 解析** ペア成虫の培養上清から回収した EVs を大量に集めて、miRNA-seq の受託解析を行った。その結果、すでに測定していた miR-Bantam、及び、miR-3479 以外にも多くの miRNA が検出された。今回新しく見つかった miRNA として、miR-125b、miR-10、miR-277、miR-61 などが見つかった。また同時に宿主由来の miRNA も見つかかり、これらが虫体に影響を与えているのか、または、宿主に影響を与えているのかは不明だが、寄生環境への適応に関係すると考えられた。一方で、この miRNA の分泌が生存虫体から出ているかを確認するために、複数のサンプルを用いて、リアルタイム PCR を行った。その結果、miR-125b は死亡虫体でも多く含まれており、厳密な生存虫体からの分泌は、やはり miR-3479 や miR-Bantam が多い事が確認された。今後は、これらの miRNA の標的となる遺伝子を調べるとともに、その miRNA の発現を抑制する事で、どのような表現型を示すかについて研究を進める必要があると考えられた。

(6) **総括** 本研究の結果、日本住血吸虫は細胞外小胞 (EVs) を分泌する事が明らかになった。特に、この分泌には赤血球の摂取が関係しており、住血吸虫自体の性成熟や、宿主への免疫抑制に影響を与えていると考えられた。また、日本住血吸虫由来の EVs には、miRNA が大量に含まれており、その内在 miRNA についても網羅的な解析を行った。実際に miR-Bantam や miR-3479 等の miRNA が多く含まれていたため、このような miRNA がどのような機能を果たすかを解析する事で、日本住血吸虫の性成熟や宿主免疫抑制のメカニズムを明らかにすることができると考えられた。これらの発見は、新規薬剤開発や、ワクチン開発での新知見として貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Mbanefo EC, Kumagai T, Kodama Y, Kurosaki T, Furushima-Shimogawara R, Cherif MS, Mizukami S, Kikuchi M, Huy NT, Ohta N, Sasaki H, Hirayama K. Immunogenicity and anti-fecundity effect of nanoparticle coated glutathione S-transferase (SjGST) DNA vaccine against

murine *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Int.* 査読有り、64、2015、24-31
doi: 10.1016/j.parint.2015.01.005.

Tong QB, Chen R, Zhang Y, Yang GJ, Kumagai T, Furushima-Shimogawara R, Lou D, Yang K, Wen LY, Lu SH, Ohta N, Zhou XN. A new surveillance and response tool: risk map of infected *Oncomelania hupensis* detected by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from pooled samples. *Acta Trop.* 査読有り、141、2015、170-7
doi: 10.1016/j.actatropica.2014.01.006.

Arai T, Akao N, Seki T, Kumagai T, Ishikawa H, Ohta N, Hirata N, Nakaji S, Yamauchi K, Hirai M, Shiratori T, Kobayashi M, Fujii H, Ishii E, Naito M, Saitoh S, Yamaguchi T, Shibata N, Shimo M, Tokiwa T. Molecular genotyping of anisakis larvae in Middle Eastern Japan and endoscopic evidence for preferential penetration of normal over atrophic mucosa. *PLoS One.* 査読有り、9、2014、e89188
doi: 10.1371/journal.pone.0089188.

Anyan WK, Seki T, Kumagai T, Obata-Ninomiya K, Furushima-Shimogawara R, Kwansa-Bentum B, Akao N, Bosompem KM, Boakye DA, Wilson MD, Karasuyama H, Ohta N. Basophil depletion downregulates *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation. *Parasitol Int.* 査読有り、62、2013、508-13
doi: 10.1016/j.parint.2013.07.003.

Macuhova K, Akao N, Fujinami Y, Kumagai T, Ohta N. Contamination, distribution and pathogenicity of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs from sandpits in Tokyo, Japan. *J Helminthol.* 査読有り、87、2013、271-6
doi: 10.1017/S0022149X12000314.

Tokiwa T, Harunari T, Tanikawa T, Komatsu N, Koizumi N, Tung KC, Suzuki J, Kadosaka T, Takada N, Kumagai T, Akao N, Ohta N. Phylogenetic relationships of rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, isolated from different geographical regions revealed widespread multiple lineages. *Parasitol Int.* 査読有り、61、2012、431-6
doi: 10.1016/j.parint.2012.02.005.

〔学会発表〕(計 13 件)

熊谷貴、市村浩一郎、山邊将史、下河原理江子、太田伸生 日本住血吸虫により分泌される細胞外小胞における mRNA を介した雌雄コミュニケーションについて 第 84 回日本寄生虫学会大会、2015 年 3 月 21 日-22 日、

東京

熊谷貴、市村浩一郎、沖野望、山邊将史、下河原理江子、関丈典、太田伸生 寄生扁形動物である日本住血吸虫における細胞外小胞の分泌を通じたmiRNAコミュニケーション機構 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日-27日、横浜

Kumagai T, Ichimura K, Yamabe M, Shimogawara R, Ohta N. Male-female interaction through miRNA contained in the extracellular vesicles secreted from *Schistosoma japonicum* (parasitic platelminth). Australasia Extracellular Vesicles Conference 2014, 2014年11月20日-21日、ケアンズ

Kumagai T, Ichimura K, Okino N, Yamabe M, Shimogawara R, Seki T, Ohta N. The analysis of exosome-like vesicles from *Schistosoma japonicum* treated with erythrocytes. 13th International Congress of Parasitology 2014年8月10日-15日、メキシコシティ

熊谷貴、市村浩一郎、沖野望、山邊将史、下河原理江子、関丈典、太田伸生 赤血球膜により刺激される日本住血吸虫のエクソソーム様小胞分泌に関する解析 第83回日本寄生虫学会大会、2014年3月27日-28日、愛媛

Kumagai T, Yamabe M, Shimogawara R, Kim HS, Wataya Y, Ohta N Efficacy analysis of newly synthesized compounds with endoperoxide activity, N-89/N-251, on larval stage *Schistosoma mansoni* 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, 2014年2月9日-11日、ダッカ

熊谷貴、山邊将史、下河原理江子、関丈典、太田伸生 寄生扁形動物である日本住血吸虫より分泌されるエクソソーム様小胞の免疫学的・生物学的機能の解析 第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日-6日、神戸

熊谷貴、山邊将史、下河原理江子、関丈典、太田伸生 日本住血吸虫スポロシスト期を標的としたRNAiによる遺伝子ノックダウン 第54回日本熱帯医学会大会、2013年10月4日-5日、長崎

Kumagai T, Seki T, Yamabe M, Shimogawara R, Ohta N Gene-knockdown by RNAi at the sporocyst stage of *Schistosoma japonicum*. Forum Cheju-16, 2013年8月30日-31日、ソウル

Kumagai T, Seki T, Yamabe M, Shimogawara R, Ohta N Gene-knockdown against Sporocysts from *Schistosoma japonicum* by RNAi 第82回日本寄生虫学会大会、2013年3月29日-31日、東京

熊谷貴、関丈典、谷口斎恵、下河原理江子、太田伸生 日本住血吸虫から分泌されるエクソソーム様小胞による宿主免疫調節 第72回日本寄生虫学会東日本支部会 2012年12日-13日、前橋

熊谷貴、関丈典、谷口斎恵、下河原理江子、太田伸生 日本住血吸虫成虫より分泌されるExosomes/MicrovesiclesによるIFN- γ 産生の抑制 第23回日本生体防御学会学術総会、2012年7月9日-11日、東京

Kumagai T, Seki T, Taniguchi T, Shimogawara R, Ohta N The immunosuppressions by exosomes / microvesicles secreted from the adult worms of *Schistosoma japonicum*. Forum Cheju-15, 2012年5月23日-25日、宮崎

〔図書〕(計1件)

熊谷貴、下河原理江子、山邊将史、太田伸生 寄生虫学研究 材料と方法 2014年版、三恵社、2014、179ページ(117p-120p)

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) 連携研究者

大田 伸生 (Ohta Nobuo)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：10143611