

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850179

研究課題名(和文)タイレリア原虫のゲノム情報に立脚したワクチン開発

研究課題名(英文)Vaccine development for Theileria orientalis based on genomic information

研究代表者

林田 京子 (Hayashida, Kyoko)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員

研究者番号：40615514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：牛小型ピロプラズマ症は牛に貧血を引き起こし、我が国における主たる放牧病として大きな問題となっている。しかし、効果的なワクチン及び治療薬は未開発でありその候補となる原虫抗原もほとんど明らかでない。このような状況を打破すべく、本研究では比較ゲノム解析による *in silico*での抗原探索、およびウシ血液置換免疫不全マウスとマダニを用いたラボ内でのタイレリア感染実験系の確立を行った。原虫各発育期における転写発現解析を行い、ワクチン候補抗原リストの作成を行った。本実験系及び得られた遺伝子発現情報は今後、*T. orientalis*の生物学特性を解明していく上で必要不可欠なツールとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Inability for *in vitro* culturing and the lack of animal models are the major obstacles to understand the biology of *Theileria orientalis*. Especially, research on tick stages of *T. orientalis* has rarely been undertaken, although such investigations are of paramount importance for the vaccine development targeting sporozoites. In this study, we employed immunodeficient mouse transfused with bovine erythrocyte to infect *T. orientalis*, and *Haemaphysals longicornis* larval tick were fed on the infected mice to produce *T. orientalis* sporozoites in a tick vector. The piroplasm and sporozoites stages were demonstrated in the mouse blood and tick salivary gland, and these data have identified a stage specific expression pattern, which has implication for understanding the biology and breakthrough for selection of vaccine candidate against *T. orientalis*.

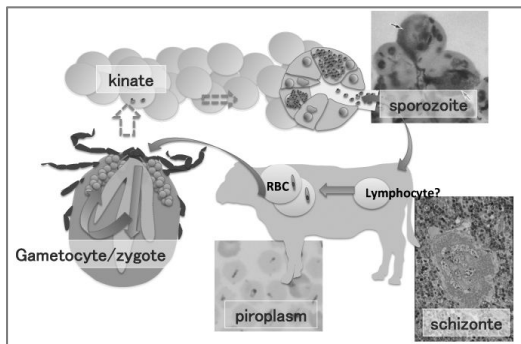
研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：タイレリア 小型ピロプラズマ マダニ 発現解析 比較ゲノム

1. 研究開始当初の背景

牛のタイレリア症は獣医畜産分野においては再重要疾病として世界中で問題視されている。日本においては *Theileria orientalis* (タイレリア・オリエンタリス) が放牧牛を中心に蔓延しており、その感染率は高い牧野では90%を越える。海外の悪性種と比べるとその病原性は比較的軽度であるものの、本原虫は牛の赤血球内に寄生して時に重度の貧血を引き起こし、感染牛は命を落とす事もある。そのような重篤なケースの他にも、慢性的な感染による乳量の低下や体重減少など畜主の気づかないところでの経済的被害も大きい。日本における主要ベクターはフタトゲチマダニで、感染マダニの唾液腺で増殖したスポロゾイトが牛の体内に注入され感染する。その後リンパ球系有核細胞で一過性にシizontを形成した後、赤血球に侵入してピロプラズムとなる。このとき、牛血液の塗抹標本からピロプラズム期の小型ピロプラズマを顕微鏡下で観察できる。フタトゲチマダニは3宿主性のマダニで、すなわち、幼ダニ、若ダニが吸血した後、それぞれ若ダニ、成ダニへと脱皮・変態し、新たな吸血宿主に寄生した際に原虫を伝播していく、経発育期伝播感染様式を取る(図1)

本原虫は *in vitro* での培養方法が確立されておらず、実験小動物にも感染しないという特性から哺乳類ステージにおける研究も、その媒介節足動物であるマダニ内における生態もほとんど解明されていない。



2. 研究の目的

そこで本研究では、本原虫のこのような状況を打破すべく、小型動物実験の感染モデルの構築を試みた。過去に、SCID マウスに牛赤血球を投与した牛血液置換マウスモデルにおいてタイレリアの増殖が認められた報告がある。そこで、本研究ではこれら報告の実験系を利用し、さらにこれらマウ

スからマダニへの原虫感染が成立するか否かについても検討を行った。そうして得た実験モデルにおけるタイレリア原虫材料を用いて、ポストゲノム研究としての原虫発育期毎の発現解析および牛タイレリアのスポロゾイトワクチン抗原の探索を行った。

3. 研究の方法

異種抗原の導入を許容しうる免疫不全マウスとして SCID C.B17/Icr SCID/SCID の8週齢を用い、これらの脾臓を外科的に摘出し、1週間以上の回復期間を置いてから後感染実験に用いた。

タイレリア感染血液は北海道十勝地方にある牧場の感染牛より血液を採取した。これらは白血球除去フィルターを用いて処理を行い、一部は感染 SCID マウスへの感染用赤血球として使用した。残りの赤血球画分については赤血球内の牛ピロプラズマ原虫のみ精製を行い RNA 抽出に用いた。脾摘 SCID マウスに導入する牛赤血球として、非感染牛より採取した脱繊維血液より遠心法にて赤血球を用意した。

感染スケジュールは以下の通りである。脾摘 SCID マウスにタイレリア感染牛血液(寄生率1%以下)を腹腔内投与した後、3-4日毎に上記で調整した正常牛赤血球1mlを腹腔内投与により移入し続ける。本マウスの赤血球内には、約1ヶ月後にはピロプラズマ原虫が出現してきた(図2)。このピロプラズマ原虫は、牛ピロプラズマ原虫と同様に RNA 精製を行った。

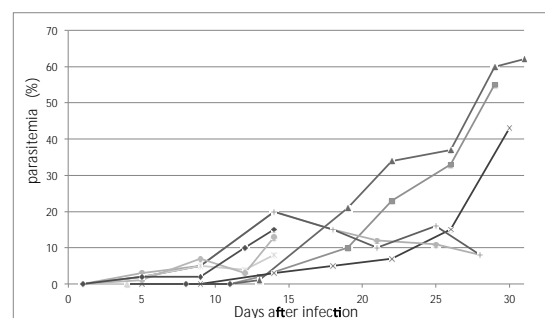


図2 タイレリア感染 Bo-RBC-SCID における原虫赤血球寄生率の推移 (n=8)

ピロプラズマ原虫の出現が認められた Bo-RBC-SCID (n=8) について、フタトゲチマダニのラボストレイン(岡山株)幼ダニ約100匹ずつ吸血させた。幼ダニは4-8日の吸血時間を得て飽血落下し、その後約1ヶ月後に若ダニへと脱皮・変態した。タイレリア原虫の生活環では、図1に示し

た様に、まず原虫はマダニの中腸を通過してヘモリンフへと移行、その後唾液腺へ移行する。そうしている間にマダニは脱皮・変態を終え、次なる吸血活動を行う。この吸血時の吸血刺激によって唾液腺内のスポロゾイトは成熟・増殖する事がすでに近縁種の研究により知られている。そこで今回、本マウスを用いた実験システムにおいて、脱皮・変態を終えた感染マダニを、非感染 balb/c マウスに2-3日ほど吸血させることでスポロゾイトの成熟を促し、これらマダニを解析に用いた。

このように吸血刺激を行った感染マダニは実体顕微鏡下で解剖を行い唾液腺のみを取り出し、PCR およびタイレリア MPSP 抗原に対する特異モノクローナル抗体を用いた免疫染色法によって原虫の感染を確認した。結果、マダニの唾液腺細胞内において成熟したスポロゾイトの存在が確認された(図3)。マダニステージにおける原虫は RNA 精製に用いた。

4. 研究成果

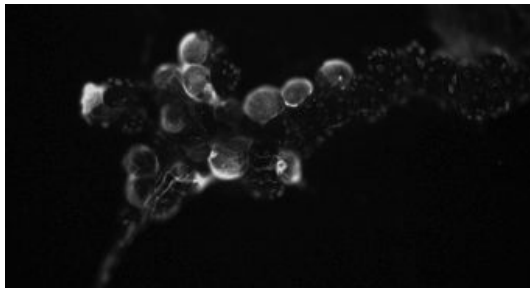


図3 マダニ唾液腺内に確認されたスポロゾイト原虫(免疫染色による反応が認められる)

これら一連の実験により、牛血液置換免疫不全マウスとマダニを用いて、実験室内においてマダニ/ウシの双方の発育期の原虫が確認された。これら各発育期の原虫 RNA を次世代シーケンス解析、すなわち RNA-seq に供した。タイレリアゲノムには 3980 遺伝子がコードされているが、どの遺伝子がどの発育期で発現しているかについての情報は皆無である。これら発現情報によって原虫研究の基礎研究、特に牛タイレリア症ワクチン開発研究に展望が開けるのは明らかである。

牛赤血球内のピロプラズム原虫については精製方法が十分に確立していたため、精

製原虫を用いて RNA-seq を行った。機種は illumina 社 Hiseq2500 を用い、36bp の片読みを行った。結果、90%以上が原虫由来のリードであり、十分な発現データを得ることが可能であった。今まで機械的に予測していたイントロン-エキソンや発現開始点も、実際の発現リードでは異なるものが存在していた。また、赤血球内ステージにおいて発現量の多かった遺伝子の多くは、可溶性蛋白質または膜表面蛋白質であることが予想される分泌シグナル配列を有していたことは特筆すべき事項であった。原虫にとって、宿主の免疫とせめぎ合いの中で共生していく為には、様々な宿主-寄生体の相互作用が存在し、今回発現解析により明らかとなった発現遺伝子が、その分子機序の一端を担っていることが予想される。

マダニ唾液腺内におけるスポロゾイトは過去の感染牛を用いた報告にあったように、特定の種類のマダニ唾液腺細胞内に充満していた(図3)。ここから原虫のみを精製する方法は確立されていなかったため、感染唾液腺を、宿主細胞ごと RNA 抽出に用いて RNA-seq に供した。今回、全く精製を行わずに解析に用いた感染マダニ唾液腺であるが、その 13-19% の情報は原虫遺伝子由来であり、マダニ内におけるタイレリア原虫スポロゾイトの発現データを得ることが可能であった。特に興味深いことに、今回タイレリアオリエンタリス原虫ではじめて、悪性タイレリアですすでにスポロゾイトワクチン候補として実証されている、p67/SPAG 遺伝子の相同分子が同定された。本分子の抗血清を作製し、スポロゾイト期において蛋白発現が確認された。今後、牛タイレリア症のワクチン候補としての可能性を追うべく実験を進める必要がある。

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 2 件)

1. I. D. Goeyse, F. Jansen, M. Madder, K. Hayashida, D. Berkvens, D. Dobbelaere, D. Geysen. (2015) Transfection of live, tick derived sporozoites of the protozoan Apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Veterinary Parasitology* 15;208(3-4):238-41. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.01.013. 査読あり
2. T. Sivakumar, K. Hayashida, C. Sugimoto, N. Yokoyama. (2014) Evolution and genetic diversity of *Theileria*. *Infection, Genetics, and Evolution* 27:250-263. (Review) 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 林田京子、白藤梨可、Thillaiampalam Sivakumar、山岸潤也、鈴木穰、杉本千尋、横山直明 *Theileria orientalis* のマウスとマダニを用いた感染実験系の確立と遺伝子発現解析(ポスター)、第 86 回日本寄生虫学会、2017 年 5 月 28 日-29 日、北海道札幌市 北海道大学学術交流会館
2. 林田京子 全ゲノム解析から見えるマダニ媒介性タイレリア原虫の動物血球細胞への卓越した寄生様式 日本微生物生態学会第 31 回大会(シンポジウム招待講演)、2016 年 10 月 23 日-25 日、神奈川県横須賀市 横須賀市文化会館
3. Kyoko Hayashida, Rika Umemiya-Shirahuji, Kazuhiro Okubo, Thillaiampalam Sivakumar, Chihiro Sugimoto, Naoaki Yokoyama Establishment of mouse/tick infection model for understanding *Theileria orientalis* biology. *Apicomplexa in farm animals (ApiCOWplexa2015)*, 3rd international meeting, 2015 年 6 月 30 日-7 月 3 日(口頭発表) John McIntyre Conference Centre in Edinburgh, Scotland, United Kingdom
4. 林田京子 タイレリア原虫の比較ゲノム解析と病原性進化に関する研究(獣医学奨励賞受賞講演口頭発表)、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014 年 9 月 9 日-9 月 12 日、北

海道札幌市 北海道大学高等教育推進機構

〔図書〕(計 1 件)

1. 横山直明、林田京子 小型ピロプラズマの生態と疫学 「臨床獣医」第 32 巻第 3 号 p21-p24 2014 年 3 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

林田 京子 (Kyoko Hayashida)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員
研究者番号：40615514

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()