

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780276

研究課題名(和文) ベクター唾液成分による病原体の感染増強作用機序の解明

研究課題名(英文) The role of vector saliva in transmission of vector-borne diseases

研究代表者

加藤 大智(KATO HIROTOMO)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：00346579

研究成果の概要(和文)：

アフリカで広くリーシュマニア原虫を媒介するサシチョウバエ *Phlebotomus duboscqi* の主要唾液成分をコードする DNA ワクチンを作成し、マウスを免疫することにより、効率よく液性免疫応答を誘導する 3 種の唾液成分を同定することができた。これらのタンパクは自然感染時にリーシュマニア原虫とともに注入され宿主に液性免疫応答を誘導することから、宿主の免疫応答を介して原虫感染を増強する因子であることが示唆された。

In order to disclose the mechanism of enhancement of *Leishmania* infection by sand fly saliva, DNA vaccines encoding dominant salivary proteins from *Phlebotomus duboscqi* were prepared and immune responses induced by these antigens were assessed. As the result, three salivary proteins were found to effectively induce humoral responses in mice. Since humoral immune responses were shown to exacerbate *Leishmania* infection, these salivary proteins were suggested to associate with the enhancement of the infection via host immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：サシチョウバエ、唾液、リーシュマニア、生理活性物質、免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) リーシュマニア症

リーシュマニア症は、吸血昆虫サシチョウバエに媒介される人獣共通原虫感染症で、世界 88 カ国で 1,200 万人以上の患者がおり、マラリアなどとともに世界保健機構(WHO)の 8 つの重要感染症に指定されている。また、地

球温暖化に伴いわが国への侵入が危惧されている感染症の一つである。リーシュマニア原虫は、哺乳類の体内では免疫担当細胞であるマクロファージに感染する。

(2) ベクター唾液に関する研究

最近の研究で、ベクターは病原体を媒介す

るだけではなく、吸血する際に宿主に注入する唾液が、病原体の感染や宿主の免疫応答、生理機能に様々な影響を及ぼしているという知見が蓄積されつつある。リーシュマニア原虫感染実験では、マウスに病変を形成させるためには、自然感染で伝播されると考えられる原虫数（100 匹程度）の 1,000 倍（10 万匹）以上もの培養原虫を接種する必要がある。しかしながら、100 匹程度の原虫をサンショウバエ唾液とともにマウスに接種すると病変が形成されることから、サンショウバエの唾液には原虫感染を直接増強する作用があることが示されている。同様の作用は、蚊やマダニなどにおいても報告されている。一方、サンショウバエ唾液成分に対する宿主免疫応答を検討した研究の一つに、宿主に唾液成分に対する強い液性免疫応答が誘導された場合、リーシュマニア感染が増強されることを示唆するデータが含まれている。この興味深い現象については詳細に検討されおらず、それに関与する分子の特定やメカニズムについても明らかにされていない。しかしながら、この結果は、A) サンショウバエの唾液には、直接作用に加えて、宿主免疫応答を介して原虫感染を増強する作用があることを示唆するものと考えられる。

(3) 我々がこれまでに行ってきた研究背景

我々はこれまで、ベクター唾液成分を用いたリーシュマニア感染防御ワクチンの開発を目的とし、アフリカで広くリーシュマニア原虫を媒介するサンショウバエの唾液タンパクのプロテオーム解析（タンパクの網羅的解析）および唾液腺のトランスクリプトーム解析（遺伝子転写産物の網羅的解析）を行い、唾液成分の抗原性を明らかにしてきた（Kato et al., BMC Genomics, 2006）。また、主要唾液成分をコードする DNA ワクチンを作成し、マウスに細胞性免疫を誘導する唾液タンパク、すなわちワクチン候補抗原（PduMSP15, PduMSP42）を同定した。さらには、唾液成分中に、血小板凝集を阻害する物質（salivary apyrase）や吸血中の痛みを抑制する物質（ADA-like protein）を見出し、タンパクレベルでの機能解析を行ってきており、このうち後者には原虫感染を直接増強する作用があることを示唆してきた。

2. 研究の目的

吸血性節足動物の唾液には、吸血に伴う組織損傷に対する宿主の生理機能を阻害して吸血を効率よく行う機構を備えていると同時に、媒介する病原体の感染を増強する作用があることが報告されている。しかしながらそれらの作用機構は不明な点が多く、また活性物質のほとんどは同定されていない。本研究では、世界保健機構(WHO)が指定する重要

熱帯感染症の1つであるリーシュマニア症を媒介するサンショウバエの唾液タンパクの網羅的解析を行い、宿主の生理機能を阻害する活性物質および宿主の免疫機構やリーシュマニア感染に影響を及ぼす唾液成分の同定を行い、その作用メカニズムを探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 唾液腺遺伝子転写産物の網羅的解析

リーシュマニア症媒介サンショウバエおよびシャーガス病媒介サシガメから唾液腺を採取し、mRNA を精製した。それらを鋳型に用いて cDNA ライブラリーを作製し、無作為に各々約 1,000 クロンの塩基配列を決定した。得られた塩基配列を、クラスター解析、データベース解析、シグナルシーケンス予測などのバイオインフォマティクス解析を行い、唾液腺遺伝子転写産物のプロフィールを明らかにした。

(2) 液性免疫応答誘導抗原の探索

主要唾液成分をコードする遺伝子断片をタンパク発現ベクターに組み込み、DNA ワクチンを作製した。DNA ワクチンでマウスを 3 回免疫し、抗体産生能を指標に液性免疫応答誘導抗原を同定した。

(3) 組換えタンパクの作製と機能解析

大腸菌および昆虫細胞タンパク発現系を用いて、組換えタンパクを作製した。作製した組換えタンパクは、予測される酵素活性をはじめとし、血小板凝集や血液凝固系に対する阻害活性を検討した。

(4) サンショウバエの原虫感染調査と原虫種の同定

パキスタンおよびペルーのリーシュマニア症流行地でサンショウバエを捕獲、顕微鏡下で解剖し、形態学的に種を同定するとともに原虫感染の有無を調べた。検出した原虫はアルコール固定した後 DNA を抽出し、cytochrome *b*、*gGAPDH*、rRNA などの遺伝子配列を解析、種の同定を行った。

(5) リーシュマニア症疫学調査への FTA カードの応用

リーシュマニア症患者の病変部組織を FTA カードに塗布し、それを用いて直接原虫の cytochrome *b* 遺伝子および mannose phosphate isomerase 遺伝子の増幅を行い、塩基配列により原虫種の同定を行った。

4. 研究成果

(1) サンショウバエ唾液に存在する液性免疫誘導抗原の同定

アフリカで広くリーシュマニア原虫を媒

介するサシチョウバエ *Phlebotomus (P.) duboscqi* の主要唾液成分をコードする DNA ワクチンを作成し、マウスを免疫することにより、効率よく液性免疫応答を誘導する唾液成分の同定を行った。その結果、32 kDa, 42 kDa, 44 kDa の唾液タンパクが液性免疫誘導抗原である事が明らかになった。これらのタンパクはサシチョウバエがリーシュマニア原虫を媒介する際に原虫とともに宿主に注入され、液性免疫応答が誘導された環境下ではリーシュマニア原虫の感染が増強されることから、上記の3種の唾液成分は原虫感染を増強する因子である可能性が示唆された。この結果は、唾液ワクチンの開発に有用な知見をもたらすものと考えられた。

(2) 南米アンデス地域に分布するサシチョウバエの唾液腺遺伝子転写産物の解析

Lutzomyia (Lu.) ayacuchensis 唾液腺遺伝子転写産物の網羅的解析を行った結果、主要唾液成分として、*Lutzomyia* 属で唯一解析が行われている *Lu. longipalpis* の機能不明な 9 kDa, 29.2 kDa salivary protein, SL1 protein, antigen5-related protein, yellow-related protein などとの相同分子、C-type lectin family に属する 16.6 kDa protein、血液凝固阻害に働くと推測される apyrase-like, RGD-containing peptide などを同定することができた。一方、*Lutzomyia* 属サシチョウバエ唾液の血管拡張物質と考えられていた maxadilan はみとめられず、同種は異なる血管拡張物質を持つ可能性が示唆された。本研究で得られた結果は、唾液ワクチン開発のための基礎知見になるとともに、吸血昆虫のユニークな吸血戦略を理解する上で有用な知見をもたらすものと考えられた。

(3) サシチョウバエ唾液タンパクの機能解析

P. duboscqi の唾液腺から同定した唾液アピラーゼの組換えタンパクを作製し(rPduApy 2)、機能解析を行った。その結果、rPduApy 2 はカルシウム依存性に ADP および ATP を分解したが、CDP, GDP および UDP は分解しないことが分かった。また、rPduApy 2 は ADP およびコラーゲン誘発性の血小板凝集を濃度依存的に阻害した。このことから、*P. duboscqi* の唾液アピラーゼは、吸血の際に宿主に誘発される血小板凝集を阻害する役割を果たしていることが明らかになった。

また、*Lu. ayacuchensis* の主要唾液成分の組換えタンパクを作製し機能解析を行ったところ、このタンパクがインテグリンとフィブリノーゲンの結合を特異的に阻害し血小板凝集を抑制するとともに、血液凝固系を阻害する活性も併せ持つことが明らかになった。このことは、この唾液タンパクが吸血の際に重要な役割を果たしていることを示してい

るとともに、そのユニークな生理活性から、研究・検査試薬および新薬の素材分子として応用できると考えられた。

(4) シャーガス病媒介サシガメの唾液腺遺伝子転写産物の解析

Triatoma (T.) dimidiata の唾液腺遺伝子転写産物の網羅的解析を行った結果、77.5 %が分泌タンパクをコードしており、そのうち 89.9 %が低分子輸送タンパクであるリポカリンのファミリーに属するタンパクをコードしていた。特徴的なことに、分泌タンパクの 53.5 %が *T. protracta* 唾液の主要なアレルゲンとして同定されている procalin に相同性を示しており、この物質が吸血の際に重要な役割を果たしていることが示唆された。その他、*T. dimidiata* の主要唾液成分として、コラーゲンおよび ADP 誘発性の血小板凝集阻害物質、トロンビン活性阻害物質、カリクレイン・キニン系の阻害物質、セリンプロテアーゼ阻害物質などと相同性を持つ分子を同定することができた。本研究で得られた結果は、吸血性節足動物のユニークな吸血戦略を理解する上で有用な知見をもたらすものと考えられた。また、得られた遺伝子クローンから作製することができる組換えタンパクは、研究・検査試薬および新薬の素材分子として活用できるものと考えられた。

(5) リーシュマニア症流行地に分布するサシチョウバエの原虫保有調査

パキスタンおよびペルーのリーシュマニア症流行地でサシチョウバエを捕獲し、原虫を伝播するサシチョウバエの特定を試みた。その結果、パキスタンでは、サシチョウバエ *P. kazeruni* から原虫が検出され、それは *Trypanosoma sp.* であることが明らかになった。一方ペルーのアンデス地域では、2種の主分布サシチョウバエ種から原虫が検出され、*Lu. peruensis* からは疾患原因種である *Leishmania peruviana* が、*Lu. caballeroi* からは *Trypanosoma avium* が同定された。このように、ペルーの疾患流行地域での病原体媒介サシチョウバエ種を明らかにすることができた。また、サシチョウバエが *Leishmania* 属と近縁の *Trypanosoma* 属も媒介できることを示しており、サシチョウバエの自然感染調査を行う際には慎重な病原体種の同定が必要であることを示している。

(6) リーシュマニア症の分子疫学調査

ペルーのリーシュマニア症流行地における疾患原虫種を FTA カードを用いて調査し、疫学調査への FTA カードの有用性を検討するとともに、ペルーの流行原虫種の分布マップの作製を試みた。FTA カードに塗布した感染者の病変部組織を用いて、原虫の

cytochrome *b* 遺伝子および mannose phosphate isomerase 遺伝子の解析を行ったところ、15 州から 81 人の感染種を同定することができた。その結果、主にアンデス地域には *Leishmania (Viannia) peruviana* が、熱帯雨林地域には *L. (V.) braziliensis* が、北中部の森林地域には *L. (V.) guyanensis* が分布していることが分かった。その他、ペルーには *L. (V.) shawi* や *L. (V.) lainsoni* によるリーシュマニア症が流行しており、このうち *L. (V.) shawi* の感染は、ブラジル以外では初めての報告であった。これらの結果は、感染症の疫学調査における FTA カードの有用性を示したものである。

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 10 件)

- ① Kato H, Gomez EA, Cáceres AG, Vargas F, Mimori T, Yamamoto K, Iwata H, Korenaga M, Velez L, Hashiguchi Y. Natural infections of man-biting sand flies by *Leishmania* and *Trypanosoma* species in the northern Peruvian Andes. Vector Borne Zoonotic Dis in press. 査読有
- ② Kato H, Cáceres AG, Mimori T, Ishimaru Y, Sayed ASM, Fujita M, Iwata H, Uezato H, Velez LN, Gomez EAL, Hashiguchi Y. Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 48: 3661-3665, 2010. 査読有
- ③ Kato H, Jochim RC, Gomez EA, Sakoda R, Iwata H, Valenzuela JG, Hashiguchi Y. A repertoire of the dominant transcripts from the salivary glands of the blood-sucking bug, *Triatoma dimidiata*, a vector of Chagas disease. Infect Genet Evol. 10: 184-191, 2010. 査読有
- ④ Kato H, Uezato H, Sato H, Bhutto AM, Soomro FR, Baloch JH, Iwata H, Hashiguchi Y. Natural infection of the sand fly *Phlebotomus kazeruni* by *Trypanosoma* species in Pakistan. Parasit Vectors 3: 10, 2010. 査読有
- ⑤ Kato H, Gomez EA, Cáceres AG, Uezato H, Mimori T, Hashiguchi Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. Int J Environ Res Public Health 7: 814-826, 2010. 査読有
- ⑥ Kuwahara K, Kato H, Gomez EA, Uezato H, Mimori T, Yamamoto YI, Calvopiña M, Cáceres AG, Iwata H, Hashiguchi Y. Genetic diversity of ribosomal RNA internal transcribed spacer sequences in *Lutzomyia* species from areas endemic for New World cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 112: 131-136, 2009. 査読有
- ⑦ Hamasaki R, Kato H, Terayama Y, Iwata H, Valenzuela JG. Functional characterization of a

salivary apyrase from the sand fly, *Phlebotomus duboscqi*, a vector of *Leishmania major*. J Insect Physiol. 55: 1044-1049, 2009. 査読有

- ⑧ Takatsuka N, Hasegawa A, Takamori A, Shimizu Y, Kato H, Ohashi T, Amagasa T, Masuda T, Kannagi M. Induction of IL-10- and IFN- γ -producing T-cell responses by autoreactive T-cells expressing human T-cell leukemia virus type I Tax. Int Immunol. 21: 1089-1100, 2009. 査読有
- ⑨ Nakagawa-Okamoto R, Arita-Nishida T, Toda S, Kato H, Iwata H, Akiyama M, Nishio O, Kimura H, Noda M, Takeda N, Oka T. Detection of multiple sapovirus genotypes and genogroups in oyster-associated outbreaks. Jpn J Infect Dis. 62: 63-66, 2009. 査読有
- ⑩ Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD, Mimori T, Gomez EAL, Hashiguchi Y, Uezato H. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome *b* gene sequencing. Exp Parasitol. 121: 352-361, 2009. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 加藤大智, E. ゴメス, R. ヨキム, 上里博, J. ヴァレンズエラ, 橋口義久 リーシュマニア原虫媒介サシチョウバエ *Lutzomyia ayacuchensis* の唾液腺トランスクリプトーム解析 日本獣医学会 2010年9月18日 北海道・帯広畜産大
- ② 石丸由佳, 加藤大智, 藤田恵, 岩田祐之, E. ゴメス, 橋口義久 シャーガス病媒介サシガメ *Triatoma dimidiata* の唾液中にみとめられた triabin 様タンパクの機能解析 日本獣医学会 2010年3月28日 東京・日獣大
- ③ 藤田恵, 加藤大智, A. カセレス, 岩田祐之, E. ゴメス, 橋口義久 ペルーにおけるサシチョウバエの遺伝子タイピング法の確立 日本獣医学会 2010年3月28日 東京・日獣大
- ④ 加藤大智, 濱崎亮一, 寺山好美, 岩田祐之, J. ヴァレンズエラ リーシュマニア原虫媒介サシチョウバエ *Phlebotomus duboscqi* の唾液アピラーゼの機能解析 日本獣医学会 2010年3月28日 東京・日獣大
- ⑤ 加藤大智, Establishment of a mass screening method of sand fly vectors for *Leishmania* infection by molecular biological methods 日本熱帯医学会 2009年10月22日 沖縄・沖縄コンベンションセンター
- ⑥ 加藤大智, Ryan C. Jochim, 佐古田 良, 岩田 祐之, Eduardo A. Gomez, Jesus G. Valenzuela, 橋口義久 シャーガス病媒介サシガメ *Triatoma dimidiata* の唾液腺遺伝子転写産物の網羅的解析 日本熱帯医学会 2009年10月22日 沖縄・沖縄コンベンションセ

ンター

⑦加藤大智、R. ヨキム、佐古田良、岩田祐之、E. ゴメス、J. ヴァレンズエラ、橋口義久 サシガメ *Triatoma (T.) dimidiata* の唾液腺トランスクリプトーム解析 日本獣医学会 2009年9月26日 鳥取・とりぎん文化会館

⑧桑原慶、加藤大智、E. ゴメス、上里博、三森龍之、山本雄一、M. カルボピーニャ、A. カセレス、岩田祐之、橋口義久 *Lutzomyia* 属サシチョウバエ rRNA 遺伝子 ITS 領域の遺伝子多様性 日本獣医学会 2009年9月26日 鳥取・とりぎん文化会館

⑨加藤大智、Ryan C. Jochim、佐古田 良、岩田 祐之、Eduardo A. Gomez、Jesus G. Valenzuela、橋口義久 サシガメ *Triatoma dimidiata* の唾液腺トランスクリプトーム解析 日本衛生動物学会 2009年4月3日 高松・サンポートホール高松

〔図書〕(計0件)

〔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

http://www.vet.agr.yamaguchi-u.ac.jp/member/hkato/kato_p.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 大智 (KATO HIROTOMO)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：00346579

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし