

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390102

研究課題名(和文) 自然宿主を用いたシャーガス病の宿主・臓器“非”特異性の解明

研究課題名(英文) Host and tissue specificity of *Trypanosoma cruzi* in the wild reservoirs

研究代表者

奈良 武司 (Nara, Takeshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40276473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は研究開始当初の予定を変更し、シャーガス病の多様な病態の根幹となる「慢性化」の原因として病原原虫 *Trypanosoma cruzi* の“休眠”を仮定し、その分子基盤を目指した。*T. cruzi* の休眠現象については、Iraluらが尿素分解酵素ウレアーゼによってシスト様の形態が誘導されたと報告しているのみである(Nature, 204:486, 1964)。本研究によって、ウレアーゼに混入していたレクチンの一種コンカナバリンA (ConA) がシスト形成を誘導する本体であること、ConAによって原虫内部に空胞が生じ、細胞実質でオルガネラの分裂と娘細胞の形成が進むことを発見した。

研究成果の概要(英文)：Chagas disease is caused by infection of the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. *T. cruzi* can persist for decades and 10-30% of the patients enter into the chronic stage, which is characterized by heart failure and/or megadisease. The long-term persistence of pathogens like *Toxoplasma* is generally associated with a cyst or “a dormant form”. Iralu has reported induction of a cyst-like form of *T. cruzi* by treatment with urease (Nature 204:486 1964), whereas no further report has described *T. cruzi* cysts. In the present study, we reanalyzed cyst formation in *T. cruzi* and found that a lectin, concanavalin A (ConA), can successfully induce the cyst formation. *T. cruzi* epimastigotes treated with ConA developed a large vacuole inside the cell and the organelles began to divide in the cytoplasm. Our findings provide important insights into the mechanism of transmission and persistence of the parasite.

研究分野：寄生虫学

キーワード：シャーガス病 *Trypanosoma cruzi* 臓器特異性 自然宿主 休眠

1. 研究開始当初の背景

シャーガス病は慢性化が特徴であり、数年～数十年にわたる無症状期間を経て、感染者のおよそ10~30%で心筋症、巨大結腸・巨大食道を発症し、突然死やQOLの重大な低下を引き起こす。一方で、抗体陽性者および原虫血症を認める者のなかには生涯にわたり無症状で経過する例がある。このような病態の多様性の理解に関して、多くの研究者が宿主-寄生体双方の遺伝的多様性との関連に注目して研究を進めているが、これまでに得られた治験は極めて少ない。

本研究では、シャーガス病人類との歴史の浅い、未だに未適応の段階にある新興感染症であるがために多様な病態が出現すると仮定し、自然宿主モデルとしてコウモリに着目してシャーガス病の病態・症状の多様性および人獣共通感染症としての特徴を理解することを目的として研究を開始したが、野外調査の実施場所として選定したベネズエラでは2013年3月5日のチャベス元大統領の死後、政治・経済・治安情勢が急速に悪化し、極めて遺憾ながら渡航および調査の自粛を余儀なくされた。

一方、シャーガス病においては病態多様性の背景にある慢性化の機序を理解することが重要である。本研究は宿主の生体防御戦略の視点に立って立案されたが、一方で原虫サイドに立って慢性化の機序を考えることも必要である。無症状感染者や慢性期患者は血清学的検査では陽性であり、これは *T. cruzi* の持続感染を意味する。しかし、なぜ原虫が感染し続けるのかを説明することは容易ではない。なぜなら、原虫が増殖(活動)し続けるということは免疫系に捕捉されて完全に排除されるか、宿主を死に至らしめるかの、どちらかになるからである。事実、長期感染を起こす他の組織寄生性の原虫体は必ず休眠ステージを持つ。例えば、三日熱マalaria原虫ではhypnozoiteが、トキソプラズマではシストがそれに該当する。*T. cruzi*の休眠現象については1964年にIraluらが尿素分解酵素ウレアーゼを培養液に添加することによって *T. cruzi* の上鞭毛期型(昆虫型)からシスト様原虫を誘導できると報告しているが(*Nature* 204:486, 1964) *T. cruzi* の休眠に関する研究はその後途絶えていた。そこで本研究では、当初の予定を一部変更して、慢性化の要因として *T. cruzi* の「休眠」を仮定し、その再現と機序の解明に合わせて取り組むこととした。

2. 研究の目的

本研究は、シャーガス病の多様な病態の根幹となる「慢性化」のメカニズムを理解することを目的として、「休眠」を *T. cruzi* の重要な生存戦略と仮定し、その再現とその分子基盤を目指す。*T. cruzi* で休眠体の存在が明らかになれば、シャーガス病の病態の理解が大きく進むとともに、休眠体を分化させ活性化

した原虫を標的とする分化誘導治療も視野に入ってくる。本研究では、シスト形成を再現するとともに、その内部構造、シスト誘導機序、代謝基盤等について解析する。

3. 研究の方法

3.1. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi Tulahuén株の上鞭毛期型(epimastigotes)は、LIT培地を用いて継代培養した。蛍光タンパクDsRedおよびルシフェラーゼを恒常的に発現する原虫を樹立するため、同遺伝子を *T. cruzi* 用発現ベクターpTREX(neomycin耐性)に組換え、常法に従って *T. cruzi* を形質転換した。

3.2. シスト形成の誘導

$2 \times 10^6/\text{ml}$ の *T. cruzi* 上鞭毛期型を $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ウレアーゼ(和光純薬)または $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ コンカナバリンA(ConA, 和光純薬)を添加した、1% ウシ胎児血清(FBS)を含む trypticase soy broth(TSB)培地で培養した。レクチンを介したシスト誘導については、市販されているビオチン化レクチン(J-オイルミルズ)14種をもちいて検討した。用いたレクチンは以下の通りである。DBA(GalNAc特異的、*Dolichos biflorus*由来)、LCA(Man- α 特異的、*Lens culinaris*由来)、PHA-E4(GalNAc特異的、*Phaseolus vulgaris*由来)、PNA(Gal- β 1,3-GalNAc特異的、*Arachis hypogaea*由来)、ECA(Gal- β 1,4-GalNAc特異的、*Erythrina cristagalli*由来)、UEA-I(Fuc- α 特異的、*Ulex europaeus*由来)、WGA(GlcNAcおよびSia酸特異的、wheat germ由来)、ABA(Gal- β 1,3-GalNAc特異的、*Agaricus bisporus*由来)、DSA(GlcNAcおよびGal- β 1,4-GlcNAc特異的、*Datura stramonium*由来)、Lotus(Fuc- α 特異的、*Lotus tetragonolobus*由来)、MAM(Sia- α 2,3-Gal特異的、*Maackia amurensis*由来)、PHA-L4(tri-またはtetra-GalNAc-D-Asn特異的、*Phaseolus vulgaris*由来)、SBA(GalNAc特異的、*Glycine max*由来)、SSA(Neu5Ac- α 2,6-Gal/GalNAc特異的、*Sambucus sieboldiana*由来)。

3.3. プロテオーム解析

$2 \times 10^6/\text{ml}$ の *T. cruzi* 上鞭毛期型を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ウレアーゼを含むTSB培地で0、1、および6日間培養し、細胞を回収した。細胞を破碎して粗抽出液を調製し、トリプシン消化後、LC-MSを用いた定量的プロテオーム解析を実施した。

3.4. 免疫蛍光染色

野生型またはDsRed発現 *T. cruzi* 上鞭毛期型とビオチン標識ConAを、TSB培地中で1時間反応させた。原虫を4%パラホルムアルデヒドで固定後、1%triton X-100処理を行ない、10%FBS/PBSでブロッキングを行なった。鞭毛の染色にはトリパノソーマ類の特異的鞭毛

タンパクPFR1に対するウサギ抗血清を用いた。抗PFR1抗体およびAlexaFluor488標識ストレプトアビジンを室温で2時間反応させ、PBSを用いて洗浄後、AlexaFluor568標識抗ウサギ抗体を室温で1時間反応させた。PBSを用いて洗浄後、Hoechst33342を反応させ、封入後、蛍光顕微鏡 (Axio Imager 2、カールツァイス) を用いて観察した。

3.5. メタボローム解析

ConA存在下で0、1、2、および4日間培養したシストについて、CE-MS装置を用いた比較メタボローム解析を行なった。

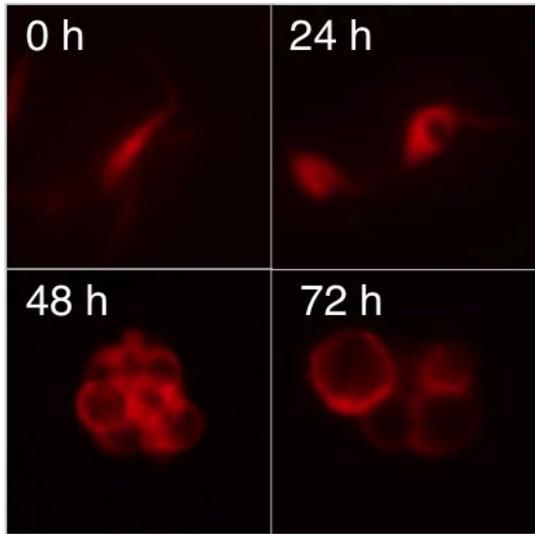


図1 .ConAによる *T. cruzi* シストの誘導。DsRed発現上鞭毛期型を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA の存在下で培養した。

4. 研究成果

4.1. ConAによるシスト形成の誘導

先行研究では、*T. cruzi* 上鞭毛期型をウレアーゼで処理することによって、原虫内部に空胞が生じ、その内部に多数の娘原虫が形成されると報告されている (Iralu V, *Nature* 204:486, 1964)。そこで、同一の条件 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ウレアーゼを含む TSB 培地) で *T. cruzi* を培養したところ、内部に空胞を持つ原虫が凝集する様子が観察された。シスト形成に伴うタンパク発現の変化を調べるため、シスト形成誘導後1日および6日後の原虫よりタンパク粗抽出液を調製し、上鞭毛期型とのプロテオーム比較を行なったところ、シスト化原虫に特異的にコンカナバリン A (ConA) が検出された。ConAはレクチンの一種で、 α -D-マンノースおよび α -D-グルコースに特異的に結合する。実験に用いたウレアーゼおよびConAはどちらもタチナタマメ (Jack bean) より精製されたタンパクであり、ウレアーゼ標品に混入していたConAがシスト形成を誘導した可能性が強く示唆された。

そこで、ウレアーゼに代えてConAを用い

てシスト形成を誘導したところ、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で3日間培養することで上鞭毛期型のほぼ100%が空胞を持つようになり、凝集することが明らかとなった (図1)。これらの結果は、*T. cruzi* の糖修飾タンパクを介した細胞内シグナリング経路の存在を強く示唆している。

シスト形成におけるレクチン特異性について、市販のピオチン化レクチン14種を用いて解析したところ、ConAのみがシスト形成を誘導した。ConAで特異的に認識され、他のレクチンで認識されない糖鎖は α -D-マンノースのみであるため、これ介したシグナリングがシスト形成に重要であることが示された。

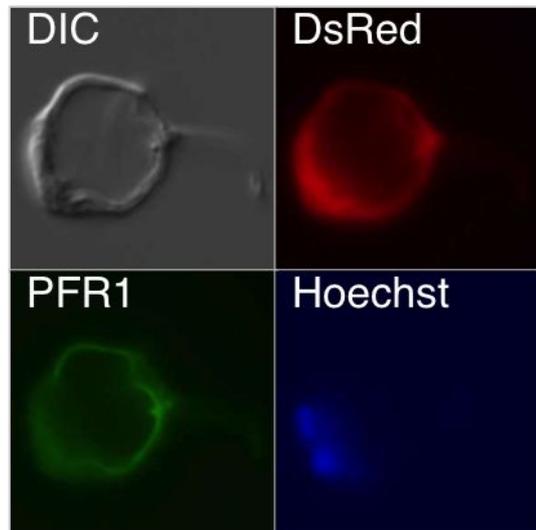


図2 . *T. cruzi* シスト内部における娘細胞の形成。DsRed発現 *T. cruzi* 上鞭毛期型を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA の存在下で48時間培養し、免疫蛍光染色を行なった。DIC、微分干渉像; DsRed、DsRed (細胞質); PFR1、抗PFR1抗体 (鞭毛); Hoechst、Hoechst33342 (核およびキネトプラスト)

4.2. 娘細胞の形成機序

トリパノソーマ類の分裂様式は基本的に2分裂であるが、Iralu (1964)らの記述は胞子虫類に見られる内生出芽に類似する。そこで、*T. cruzi* の形態変化をより詳細に調べるために、鞭毛および核を蛍光染色し、シスト形成における形態変化について観察した。ConA処理48時間後に、内部に空胞を保持するようになった原虫では、空胞内部に娘原虫は観察されず、細胞質で核、キネトプラスト、および鞭毛の分裂が細胞分裂に先立って起こることが明らかとなった (図2)。興味深いことに、細胞質 (DsRed) に沿って2組の鞭毛 (PFR1)、核およびキネトプラスト (Hoechst) がそれぞれ検出された。一般に、*T. cruzi* を含むトリパノソーマ類では鞭毛の基部にキネトプラストが位置し、发育段階が変化してもその位置関係は変わらない。*T. cruzi* シストにおいても鞭毛基部の近傍にキ

ネトプラストが位置しており、少なくともキネトプラストと鞭毛の分裂はシストにおいても同調していることが示唆された。その位置関係は変わらなかった。これは、これまで *T. cruzi* では全く知られてこなかった形態および分裂様式である。

さらに培養を続けると、7日目には多数(～10本)の鞭毛が空胞内腔に突出し、ゆらゆらと動く様子が観察された。Iralu らの観察はこれを示すものと思われる。本研究で誘導された *T. cruzi* シストは、形態的にはトキソプラズマのシストに類似し、ConA を含む TSB 培地中では細胞分裂を停止したまま2週間以上生存する。一方、LIT 培地に ConA を添加した場合には空胞形成およびシスト形成はほとんど観察されない。したがって、シスト形成には ConA を介したシグナリングに加え、栄養状態や TSB 培地に含まれる未同定成分が関与すると考えられる。予備実験では、TSB 培地を LIT 培地で置換すると数日かけて上鞭毛期型が出現し分裂増殖を開始することから、シスト形成は可逆的な反応であることが示された。

4.3. ConA 結合分子の探索

ConA に結合し、シスト形成を誘導する分子の同定は、その機能を阻害することによりシスト形成を阻止できる可能性を示唆している。予備実験として、上鞭毛期型原虫の細胞抽出液を調製し、ConA-アガロースカラムを用いて ConA 結合タンパクの同定を行なった。ConA-アガロースカラムからの溶出物をプロテオーム解析したところシステインプロテアーゼの一種 cruzipain および tubulin (α および β) が同定された。Cruzipain については、これまでに ConA との結合性が示されており ConA を用いた cruzipain の精製方法が報告されている (Labriola C *et al*, *Biol Res* 26:101, 1993)。一方で、ConA のトリパノソーマ類に対する生理活性についても報告があり、アフリカトリパノソーマ (*T. brucei*) は ConA 処理により死滅し、*T. cruzi* は細胞凝集を起こすことが知られている (Alves MJ *et al*, *J Protozool* 21:575, 1974)。これまで ConA のシスト誘導に関する報告がなかったのは、形態的観察が十分に行なわれなかったことと、長期間の培養(7日以上)を行なわないと娘原虫が観察されないことが大きな理由と考えられる。

4.4. シストの代謝

一般に、病原体のシストでは代謝が著しく低下しており、これによって薬剤抵抗性が生じることが知られている。そこで予備実験として、*T. cruzi* シストのメタボローム解析を行ない、特にエネルギー代謝の特徴について解析したところ、シストでは上鞭毛期型と比較して解糖系の中間代謝物が著しく蓄積していることが明らかとなった。また、細胞内の化学反応に用いられるエネルギーの多く

は ATP の加水分解によって得られ、その反応速度は ATP と生成物である AMP および ADP の比によって規定されることから、細胞のエネルギー状態を示す指標として adenylate energy charge (EC) が用いられる。

$$EC = ([ATP] + [ADP]/2)/([ATP] + [ADP] + [AMP])$$

EC は対数増殖期にある多くの細胞種で 0.8-0.95 に保たれている。メタボローム解析の結果、上鞭毛期型(培養0日)の EC は 0.56 と比較的低い値を示した。一方、EC はシスト誘導に伴って低下し、培養4日目には 0.14 まで低下した。さらに、アデニン量がシスト誘導に伴い著しく上昇(60倍以上)していた。これらの結果は、*T. cruzi* シストにおいて代謝活性が低下していることを強く示唆しており、アデニンの上昇は ATP の分解に伴う現象と考えられた。

4.5. 統括

本研究によって、*T. cruzi* の新たな形態が再確認され、これが生活環の中で何らかの生物学的意義を持つ可能性が示された。予備実験では、ConA 以外の市販レクチン 14 種はシスト形成を誘導できないことから、ConA のみが認識する α -D-グルコースを介してシストが誘導されることが強く示唆された。また、その標的分子として cruzipain および tubulin が示唆された。Cruzipain は細胞表面に発現される糖タンパクで、宿主細胞への侵入、増殖などに関与すると同時に、ワクチンおよび創薬標的としても注目されている。Tubulin は *T. cruzi* の多コピー遺伝子で、細胞質および鞭毛に局在する。Tubulin の糖修飾に関しては、他生物で報告はあるもののその詳細については明らかになっておらず、*T. cruzi* では全く報告されていない。今後は、ConA の結合分子をさらに詳細に解析し、結合糖およびタンパク分子を同定する必要がある。

シスト形成の生物学的意義としては、多くの昆虫寄生性トリパノソーマが生活環の中でシスト段階を持つこと、*T. cruzi* についても昆虫—昆虫伝播が知られていることから、ひとつの可能性としてサシガメ中腸内で一部の原虫がシストに分化し、昆虫間伝播に一役買っている可能性が考えられる。また、哺乳類体内での持続感染に貢献している可能性については、哺乳類においても多くの種類のレクチンが存在し、カルレティキュリンなどグルコースを認識する分子も存在する。したがって、今後の研究としては、実験動物体内で実際にシスト様の形態が出現するのかを明らかにする必要がある。具体的には、ルシフェラーゼ発現原虫および DsRed 発現原虫をともに慢性感染させ、生体イメージング装置を用いて *T. cruzi* の感染臓器を特定、さ

らに病理学的探索によってシスト壁を持つ原虫を見いだす予定である。

重要な点として、予備実験では TSB 培地を LIT 培地で置換すると数日かけて上鞭毛期型が出現し分裂増殖を開始する。これは娘細胞が空胞内に遊離し、さらにシスト外に遊出することを強く示唆している。娘細胞の正確な形態と生物活性、例えば哺乳類細胞への感染性などの解析を進め、*T. cruzi* の生活環におけるシスト形成の意義について明らかにしていきたい。

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 23 件)

(英文)

1. Nara T. Current situation of Chagas disease in non-endemic countries. *Juntendo Med J* 2015;61: 389-395(査読有)
2. Hashimoto M, Morales J., Uemura H, Mikoshiba K, Nara T. A novel method for inducing amastigote-to-trypomastigote transformation in vitro in *Trypanosoma cruzi* reveals the importance of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *PLoS One* 2015;10: e0135726 (査読有)
3. Hashimoto M, Nara T., Hirawake H, Morales J., Enomoto M, Mikoshiba K. Antisense oligonucleotides targeting parasite inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits mammalian host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep* 2014;4: 4231 (査読有)
4. Hashimoto M, Enomoto M, Morales J, Kurebayashi N, Sakurai T, Hashimoto T, Nara T., Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity and virulence of the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* 2013;87: 1133-1150 (査読有)
5. Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK, Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G, Balogun EO, Nara T., Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Saimoto H, Moore AL, Harada S, Kita K. Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110: 4580-4585 (査読有)
6. Annoura T, Makiuchi T, Sariego I, Aoki T, Nara T. SUMOylation of paraflagellar rod protein, PFR1, and

its stage-specific localization in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 2012;7:e37183 (査読有)

(和文)

7. 奈良武司 . シャーガス病：感染症最前線とグローバル・ヘルス . 医学のあゆみ 2015;253: 119-123

(学会発表)(計 7 件)

1. 奈良武司、平沢浩子、角田宗一郎、細谷英里奈、三井颯太、美田敏宏 . クルーズトリパノソーマに「休眠現象」は存在するのか? 第 85 回日本寄生虫学会大会、宮崎、2016
2. Nara T. Gluconeogenic compartmentalization in diplomonids, a sister group of kinetoplastids. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) Parasitic Disease Panel, Bethesda, 2016
3. Nara T. Chagas disease: The current status in Japan and drug development. The 13th Asian Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, Taipei, 2013

(図書)(計 5 件)

1. 奈良武司 . シャーガス病 (アメリカトリパノソーマ症). 人獣共通感染症改訂 3 版 . 木村哲、喜田宏編 . 大阪、医薬ジャーナル社、2015
2. 奈良武司 . トリパノソーマ症 . 別冊骨格筋症候群第 2 版上巻、日本臨牀 . 大阪、日本臨牀社、2015
3. 橋本宗明、奈良武司 . トリパノソーマ症 . 別冊感染症症候群第 2 版上巻、日本臨牀 . 大阪、日本臨牀社、2013
4. 奈良武司 . ヌクレオチド代謝の項 . 岩波生物学辞典第 5 版、巖佐庸、倉谷滋、斎藤成也、塚谷裕一編、東京、岩波書店、2013
5. 奈良武司 監訳 . Section 17 原虫および蠕虫感染症：概論、Part 8 感染症、ハリソン内科学第 4 版 (原著第 18 版) 上巻、福井次矢、黒川清監修、東京、メディカル・サイエンス・インターナショナル、2013

(産業財産権)

○出願状況 (計 1 件)

名称：トリパノソーマ関連疾患治療薬、トリパノソーマ原虫の感染阻止または殺虫方法、およびその利用
発明者：奈良武司、橋本宗明、御子柴克彦
権利者：独立行政法人理化学研究所および学校法人順天堂 (共同出願)

種類：特許
番号：特願 2013-211448
出願年月日：2013 年 10 月 8 日
国内外の別：国内

6．研究組織

(1)研究代表者

奈良 武司 (NARA, Takeshi)
順天堂大学医学部・准教授
研究者番号：40276473

(2)研究分担者

橋本 宗明 (HASHIMOTO, Muneaki)
順天堂大学医学部・准教授
研究者番号：30407308

(3)研究分担者

坪内 暁子 (TSUBOUCHI, Akiko)
順天堂大学医学部・助教
研究者番号：10398662

(2)研究分担者

モラレス ホルヘ (MORALES, Jorge)
順天堂大学医学部・助教
研究者番号：20596126