

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08445

研究課題名(和文) マイクロRNA発現動態を指標とした住血吸虫生肝線維化症病態の解明

研究課題名(英文) Analysis for expression of miRNA in the patients with Schistosomiasis liver 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：日本住血吸虫、メコン住血吸虫、マンソン住血吸虫はヒトの門脈、腸間膜静脈系寄生性の住血吸虫である。3種類の住血吸虫感染による肝線維化の病態には、大きな違いが認められるがその本態は明らかとなっていない。現況では感染を防御する以外の肝線維化症に対する有効な治療法はない。肝線維化症を早期に診断し、プラジカンテル処方を行うなどの対策が必要と考えられるが、診断法は未だ確立されていない。そこで、マウスモデルによる3種類の住血吸虫の感染時に起こる病態解析を、血清中の小胞体のmiRNAの発現動態に着目して比較解析を行い、異なる病態の解明を試みると共に、病態変化を検出するバイオマーカーとしての可能性を検討した。

研究成果の概要(英文)：Schistosomiasis is a parasitic disease caused by blood flukes (trematodes), including species of Schistosomiasis japonicum, mekongi and mansoni were parasited in portal vein and mesentery vein system. The big difference is admitted that the clinical condition of liver fibrosis by 3 kinds of this schistosome infection, but the true condition doesn't become clear. There are no effective treatments to liver fibrosis except to inhibit to infection in the present state. It is necessary for early diagnosis of liver fibrosis and need to perform Praziquantel treatment immediately, although tool of diagnose is established yet. So the clinical condition analysis using infection of 3 kinds of schistosome by a mouse model, I aimed at manifested profiling of microRNA of an endoplasmic reticulum in the serum, did a comparative analysis and tried explication of the different clinical condition as well as considered a possibility as the biomarker that a clinical condition change is detected.

研究分野：寄生虫学、感染症学、免疫遺伝学

キーワード：住血吸虫症 肝線維化症 マウスモデル バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は 20-25 塩基からなる 1 本鎖の短鎖 RNA である。mRNA の 3' 末端非翻訳領域に配列相補的に結合し、主に mRNA の切断 (分解) と翻訳阻害によって、標的となる複数の遺伝子発現を制御している。ヒトでは 1000 個程度の miRNA が同定され、ヒト遺伝子のうちの半数近くがその制御下にあると考えられている。従来、血漿中には RNase が存在することから、血漿中には miRNA は存在しえない、と考えられていたが、細胞から放出される血漿中の小胞体内 (エキソソーム) に安定して存在することが報告された (Mitchell PS et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2008)。また、生物種間での相同性が比較的高く、動物実験での結果がヒトに外挿しやすいなどの特徴もあり、病態解析、疾患同定のバイオマーカーとして注目されている。明確な指標やマーカーが存在しない疾患の同定、疾患の予防薬、治療薬としての活用等への期待は大きい。

寄生虫学分野でも、リーシュマニア症において血中コレステロール産生が miR-122 によって制御を受け、結果的に肝臓への感染が促される事が報告された (Ghosh J. et al., 2013., Cell Host & Microbe) また、住血吸虫のゲノムデータを用いて、住血吸虫の有する miRNA 配列を解析した報告 (de Souta Gomes M., et al., 2011 Genomics, Cat P., et al., 2011 Plos. Negl. Trop.) や、住血吸虫感染時にマウス肝臓に発現する miRNA を解析した報告 (Cai P., et al., 2011 Plos one, Hoy AM., et al. 2014 Plos NTD.) など注目されているが、その機能やバイオマーカーとして有用性は未解明である。門脈系寄生性の住血吸虫症では、肝臓にトラップされた虫卵周囲に炎症反応が起こり、肝臓全体に線維化が進行し、ついには肝硬変をきたす。肝線維化症を引き起こす住血吸虫症は、主に中国揚子江流域、フィリピンなどに分布する日本住血吸虫、メコン川流域に分布するメコン住血吸虫とアフリカ、中南米に分布するマンソン住血吸虫によるものである。日本住血吸虫では重症化することが知られており、肝硬変が進行した結果、門脈圧亢進、全身衰弱、静脈瘤破裂による大量出血により死亡する例もある。マウスにメコン住血吸虫と日本住血吸虫を感染させ、肝病変の変化を比較した結果では、日本住血吸虫感染では小葉内の虫卵結節、門脈線維化症が認められたが、メコン住血吸虫では虫卵結節と、肝細胞の空胞変化、泡沫上変化が起きていたが、門脈線維化症は認められなかった (Shimada, M,

et al., 2010 Parasitology)。

このことは、ヒトの日本住血吸虫感染による肝線維化症では超音波診断でネットワークパターンを示すが、メコン住血吸虫感染では典型的なネットワークを示さず、まだら状脂肪肝様の像が観察された報告 (Omae, 2011) とも一致する。一方、マンソン住血吸虫感染時の超音波診断では、門脈縁辺の繊維化と門脈系静脈壁の肥厚や、表面の異常が描出される。超音波診断の所見としては、メコン住血吸虫症は、日本住血吸虫症よりはマンソン住血吸虫症に近いと言える。このような病態の違いには、住血吸虫に対する異なる免疫応答性の結果と考えられている。肝線維化症増悪に関係する miRNA に起因する特定の免疫応答を解析することにより、病態の解明、有効な治療法につながる知見を得ることにより、住血吸虫症感染後に発症する肝線維化症対策への貢献が期待できる。

## 2. 研究の目的

マンソン住血吸虫、メコン住血吸虫、日本住血吸虫感染マウスに起こる主に肝臓を主体とした病態及び肝細胞の虫卵に対する防御応答性を解析する目的で、miRNA 発現プロファイルを作成する。解析の結果、肝線維化症増悪に寄与するような免疫応答に関わる 3 種の住血吸虫に共通して発現の増加あるいは減少が認められる miRNA の同定を試みる。この miRNA の機能解析によって病態の指標となるバイオマーカーを探索する。種特異的に異なる発現プロファイルを示した miRNA については、その機能解析により病態形成に関わる免疫応答性の解析を試みる。また、得られた結果をヒト患者血清中の miRNA 発現プロファイルと比較して、実用性に向けての可能性を検討する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

BALB/c マウスにマンソン住血吸虫、メコン住血吸虫、日本住血吸虫の感染実験を行い、感染マウスの急性期及び慢性期の血漿中エキソソームの miRNA を抽出し、リアルタイム定量解析しプロファイルを作成する。マウスとヒトで機能的に相動性の高い miRNA 群、急性期、慢性期に特異的に発現する群、3 種で共通、種特異的発現する群に分け、データベース (The miRBase, The human microRNA disease database) などによって in silico 機能解析を行い、肝細胞障害性、肝線維化症に関連すると考えられた miRNA の機能と直接に関わる生理活性物質の同定、あるいは免疫応答

性へフィードバックし病態形成の解明を試みる。また、マウスモデルで同定された miRNA は日本住血吸虫性肝線維化症の患者血漿を用いて、その発現動態と病態形成との関連を解析する。また、住血吸虫肝線維化症患者血清サンプルで発現動態と病態形成との関連が示唆された miRNA についてその肝線維化症を検出するバイオマーカーとしての実用性について検討する。

#### 4. 研究成果

マウス (BALB/c) に日本住血吸虫を感染させ、2 か月後 (急性期) と 4 か月後 (慢性期) に血清を採取した。この血清から miRNA を抽出し、血清 miRNA パネルを用いて発現プロファイルを作成した。この結果、日本住血吸虫感染マウスでは、miR-122, miR-21 などの miRNA が急性期より慢性期に上昇することがわかった。これらの miRNA はサイトカインの 1 種である IL-13 の発現に関わるとされており、これまでも報告のある肝線維化症の重症化因子として IL-13 が関与する事が改めて示された結果となった。miRNA-21 に関しては、コリラジン (エラジタンニンの 1 つで、ザクロの葉にも含有される) によって、その活性化が阻害され、肝線維化が抑制される事が報告されている (Yang F. et. al, parasitology International, 2016)。

結果 1. 日本住血吸虫感染によって、発現量の増加が認められた miRNA (機能、参考文献)

- ① *mmu-miRNA-122*: (Expression of the spliced form of the transcription factor grainyhead like transcription factor 2 (GRHL2) in liver tissues from mice. Satishchandran A. et. al. Gastroenterology. 2018)
- ② *mmu-miRNA-21*: (*Up-regulated in activated rat primary hepatic stellate cells (HSCs)*). Zhu J. et.al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018)
- ③ *mmu-miRNA-130a*: (*Up-regulated in mouse liver by iron deficiency and targets the bone morphogenetic protein (BMP) receptor ALK2*). Zumbrennen-Bullough KB et.al., *J Biol Chem*. 2014)
- ④ *mmu-miRNA-146b*: (*Targets IRF5, resulting in the regulation of macrophage activation*). Peng L et.al. *EBioMedicine*. 2016)
- ⑤ *mmu-miRNA-223*: (*Diagnostic marker in a panel of serum markers of the pathophysiology of acute liver failure (ALF) and liver cirrhosis. Function was unknown,*

Schueller F et/al. *Clin Sci (Lond)*. 2017)

- ⑥ *mmu-miRNA-34C*: (*Decreased kidney fibrosis area and the expression of connective tissue growth factor,  $\alpha$ -SMA, collagen type 1, collagen type 3 and fibronectin*. Morizane R., *Sci Rep*. 2014)
- ⑦ *mmu-miRNA-155*: (*Regulated NF- $\kappa$ B-and *mmu-miR-146a* form a complex network of to control gene transcription in macrophages for modulating inflammatory responses*. Nat Commun. Mann M.et.al., 2017)
- ⑧ *mmu-miRNA-134*: (*Novel potential inhibitor of human ovarian cancer stem cells by targeting RAB27A*. Chang C. et.al., *Gene*. 2017)

結果 2. 発現量低下が認められた miRNA (機能、参考文献)

- ① *mmu-miRNA-351*: (*Regulates Two-Types of Cell Death, Necrosis and Apoptosis, Induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine*. Sato A., *PLoS One*. 2016)

*mmu-miRNA-155*, *mmu-miRNA-146b* は 2 か月後、4 か月後で共通に発現量の増加が認められた。*mmu-miRNA-155* は、NF- $\kappa$ B と *mmu-miR-146a* の complex のアップレギュレーションに関連し、免疫反応を増強して炎症を喚起させるキーモレキュールである事が報告されている。住血吸虫感染によって、肝臓での炎症が喚起される場面で発現量が増加すると考えられた。

マンソン住血吸虫感染マウスでは、肝線維化の症状が弱かったのが原因で、増減の変化を示すような miRNA が観察できなかったのではないかと推察されたため、感染強度 (セルカリア感染数 20 隻、40 隻、60 隻) や、(感染期間 2 か月、4 か月、6 か月) などの条件検討を行い、肝線維化症状の異なるマウスモデルを作成した。軽度、中等度、重篤な症状を示すマウスモデルを作成し、血清中 miRNA のプロファイルを比較したが、日本住血吸虫と同じ動態を示したのは *mmu-miRNA-21* のみで、すでに、日本住血吸虫症で、肝線維化症と関連がある事が報告されている。日本住血吸虫では、肝臓への損傷が高いが、マンソン住血吸虫では、損傷が起こらないか、日本住血吸虫症とは全く異なるメカニズムによる免疫応答性が存在するのではないかと、考えられた。

メコン住血吸虫は、マウスへの感染実験を行う為のセルカリア数を確保することが難

しかつた為、計画変更し除外することにした。

ヒトにおいても、マンソン住血吸虫の小学児童への感染率が80%を超えるような高度浸淫地で、超音波検査を行っても、住血吸虫感染によると考えられる肝臓へのダメージは観察されなかった。これは、日本住血吸虫の高度浸淫地(フィリピン、感染率50%程度)では、低学年でも肝線維化症が散見されるのに比較しても大きな違いがある。同様にマウスモデルでも、マンソン住血吸虫感染と、日本住血吸虫感染では、肝臓の病態に大きな差がある事が明らかとなった。

また、肝線維化症の日本住血吸虫性肝線維化症患者から得た血清中miRNAの解析では、個人差が大きい事がわかった。(研究継続中)

本研究の結果、バイオマーカーとして、*mmu-miRNA-21*、*mmu-miRNA-122*、*mmu-miRNA-155*が肝線維化症のバイオマーカーとして有用である事が示唆されたが、ヒトでの研究をさらに推進する必要があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計8件)

- ① Moriyasu T, Nakamura R, Deloer S, Senba M, Kubo M, Inoue M, Culleton R, Hamano S. *Schistosoma mansoni* infection suppresses the growth of Plasmodium yoelii parasites in the liver and reduces gametocyte infectivity to mosquitoes. PLoS Negl Trop Dis. 2018, 12(1): e0006197. 査読有
- ② Chadeka EA, Nagi S, Sunahara T, Cheruiyot NB, Bahati F, Ozeki Y, Inoue M, Osada-Oka M, Okabe M, Hirayama Y, Changoma M, Adachi K, Mwendu F, Kikuchi M, Nakamura R, Kalenda YDJ, Kaneko S, Hirayama K, Shimada M, Ichinose Y, Njenga SM, Matsumoto S, Hamano S. Spatial distribution and risk factors of *Schistosoma haematobium* and hookworm infections among schoolchildren in Kwale, Kenya. PLoS Negl Trop Dis. 2017, 11(9):e0005872. 査読有
- ③ Ke XD, Shen S, Song LJ, Yu CX, Kikuchi M, Hirayama K, Gao H, Wang J, Yin X, Yao Y, Liu Q, Zhou W. Characterization of *Schistosoma japonicum* CP1412 protein as a novel member of the ribonuclease T2 molecule family with immune regulatory function. Parasites & Vectors. 2017, 10(1):89. 査読有
- ④ L Leonardo, Y Chigusa, M Kikuchi, N Kato-Hayashi, S Kawazu, JM Angeles, IK Fontanilla, IK Tabios, K Moendeg, Y Goto, RJ Fornillos, PG Tamayo, JC Chua. Review. Schistosomiasis in the Philippines: challenges and some successes in control. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2016, 47(4): 651-666 査読有
- ⑤ L Leonardo, Y Chigusa, M Kikuchi, N Kato-Hayashi, S Kawazu, JM Angeles, IK Fontanilla, IK Tabios, K Moendeg, Y Goto, RJ Fornillos, PG Tamayo, JC Chua. Review. Schistosomiasis in the Philippines: challenges and some successes in control. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2015, 47(4): 651-666. 査読有
- ⑥ 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. 2015, 141(Pt B):178-83. 査読有
- ⑦ 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. 2015, 64(4):24-31. 査読有

### 〔学会発表〕(計0件)

### 〔図書〕(計4件)

- ① 濱野真二郎: 吸虫症、内科学 第11版、朝倉書店、2017、354-360
- ② Hamano S. and William A Petri Jr.: Chapter 209:2118-2123 Amoebiasis in “Feigin, Cherry, Demmler, Kaplan: Textbook of Pediatric Infectious Disease, 8th edition” Elsevier, London, 2017.
- ③ 濱野真二郎: 住血吸虫症、今日の治療指針 2015、医学書院、2015、278.
- ④ 濱野真二郎: 「第42章 蠕虫学」標準微生物学 第12版、医学書院、2015、551-564.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 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：40336188

(2)研究分担者

濱野 真二郎 (HAMANO, Shinjiro)  
長崎大学・熱帯医学研究所・教授  
研究者番号：70294915