

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08756

研究課題名(和文) miRNAノックダウン住血吸虫を用いた細胞外小胞における性成熟への機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis for sexual maturation in extracellular vesicles using miRNA knockdown schistosomes

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

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)：住血吸虫は熱帯・亜熱帯地域で流行する寄生虫であり、雌雄同体の吸虫とは異なり、雄と雌の虫体がそれぞれ分かれた進化的には初期の生物である。血管内で雌雄ペアとなり抱合しながら寄生する住血吸虫は、赤血球を摂取することで、成長・性成熟・産卵が誘導される。我々は、これまでに細胞外小胞という細胞、ないし、個体間での情報伝達に関わる因子が、雌雄のペアリングや赤血球の摂取により放出が増加することがわかった。特に、その小胞内のmiRNAという遺伝子発現調節分子の量も増大することがわかった。本研究課題では、このmiRNAの発現を抑えるmiRNAデコイという阻害分子を同時に発現させることでmiRNAの機能を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

住血吸虫症は年間2億人以上の感染者と、30万人近くの死亡者を引き起こし、顧みられない熱帯病の一つとしても注目されている寄生虫疾患である。効果的な治療薬はあるものの、ワクチンは存在せず、なかなか根絶に至っていない。この病気の主な原因は成虫の産み出す虫卵が、肝臓や腸管組織に詰まり周辺組織を壊死させることで引き起こされる。住血吸虫は雌雄異体の寄生虫としては、進化的にも初期の生物であり、産卵誘導に必要な雌雄コミュニケーションはシンプルかつ、基本的であると考えられる。細胞外小胞を用いた雌雄コミュニケーションへの理解は、生物学だけでなく、医学上の住血吸虫対策においても意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Schistosomiasis is an endemic parasite in the tropics and subtropics, and, unlike hermaphrodite flukes, it is an evolutionarily early organism in which male and female worms are separated. The schistosomes which become pairing between male and female in the blood vessel, ingest the red blood cells to induce growth, sexual maturation and oviposition. We have found that release of cells called extracellular vesicles which are involved in signal transduction between individuals, were increased by pairing of males and females and ingestion of red blood cells. In particular, it has been found that the amount of gene expression regulatory molecule called miRNA in the vesicle also increases. In this research project, we observed the function of miRNA by simultaneously expressing an inhibitory molecule called miRNA decoy that suppresses the expression of this miRNA.

研究分野：寄生虫学

キーワード：住血吸虫 細胞外小胞 miR-Bantam miRNA Tough Decoy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本住血吸虫は、血管寄生する雌雄異体の寄生虫であり、雌雄間でのコミュニケーションは成熟・産卵に必須であると考え、情報伝達に関係すると考えられる細胞外小胞に着目した。実際に、成虫における細胞外小胞を集めたところ、多くの miRNA が含まれていた。特に、雌特異的な miR-Bantam がこの細胞外小胞の中に多く含まれていた。miR-Bantam は雌雄のペアリング時に多く発現される miRNA であり、雌雄成熟に関与していると考えられている。すでに我々は、赤血球の摂取時とペアリングによって細胞外小胞における miR-Bantam の発現量が上昇する事を見出しており、この miRNA の機能を確かめることは、性成熟のプロセスを確認する上で重要であると考えられた。

2. 研究の目的

細胞外小胞内に多く含まれている miRNA (特に、miR-Bantam) をノックダウンし、その機能を明らかにすることで、性成熟のプロセスを解明する。

3. 研究の方法

(1) miRNA ノックダウンシステムとして、miRNA Tough Decoy システムを採用した。miR-Bantam の配列情報を基に、分解を避けるためのバルジ配列を含んだデコイ配列を設計し、プライマー伸長法を使って PCR ベースで合成を行なった。出来上がった DNA 配列をシークエンスで確認し、発現用のレンチウイルスベクターに挿入した。このベクターを 293T 細胞に導入することで、レンチウイルスを作成し、miR-Bantam のデコイ発現ウイルスを作成した。

(2) 日本住血吸虫は実験室内でマウスとミヤイリガイを使って維持されているものを使用した。成虫は、感染幼虫であるセルカリアを感染させたマウスから 7 週後に回収したものを用いた。幼虫であるシストソミュラはセルカリアから強制的に尾部を切り離し、培養液にて飼育したものをを用いた。これらの虫体は、10%FCS/RPMI1640 中で維持し実験に用いた。

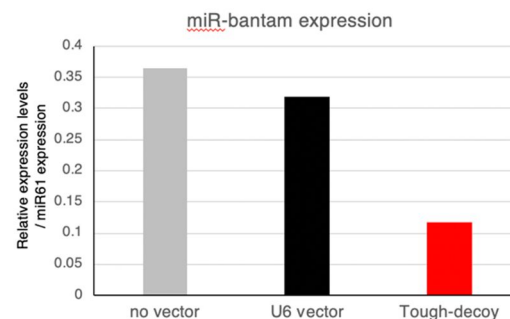
(3) レンチウイルスベクターを導入して形質転換を行なった 293T 細胞の培養上澄みからレンチウイルスを回収し、リアルタイム PCR や、p24ELISA を用いて、タイターチェックを行なった。その結果、 4×10^7 TU/ml のレンチウイルスを回収した。このレンチウイルスを最終濃度 1×10^6 TU/ml にて、虫体に感染実験を行なった。

(4) レンチウイルス感染後の虫体は 24 時間後に一旦洗浄を行い、その 48 時間後に赤血球を加えて、細胞外小胞を誘導した。最終的には赤血球を加えた 72 時間後に虫体を回収し RNA を回収した。回収した RNA から simple miRNA detection kit を用いて miRNA の検出と、通常のリアルタイム RT-PCR 法により、標的遺伝子の発現について解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 成虫に miR-Bantam Tough Decoy を発現させ、72 時間後に RNA を回収し、miR-Bantam 発現を確認した結果、図 1 のようにデコイ miRNA を導入された成虫では、標的である miR-Bantam の発現抑制が見られた。このことから、今回作成したデコイ miRNA が機能している事が確認された。

図 1 miR-Bantam Tough Decoy を導入した成虫における miR-Bantam の発現抑制



(2) すでに miR-Bantam の標的候補遺伝子と知られている複数の遺伝子 (serine-arginine repressor, FUS serine-arginine-rich protein 1, Smad1, ATP synthase) の mRNA 発現について調べた。赤血球で誘導をかけた成虫における miR-Bantam Tough Decoy 発現レンチウイルスの導入は、これらの遺伝子の発現に全く影響を与えなかった (図 2)。一方で、幼虫であるシストソミュラ (赤血球誘導なし) に、このレンチウイルスを感染させたところ、serine-arginine repressor, FUS serine-arginine-rich protein 1, ATP synthase の 3 つの遺伝子発現の増加が見られた (図 3、図 4)。

図 2 miR-Bantam Tough Decoy を導入した成虫における標的遺伝子の mRNA 発現

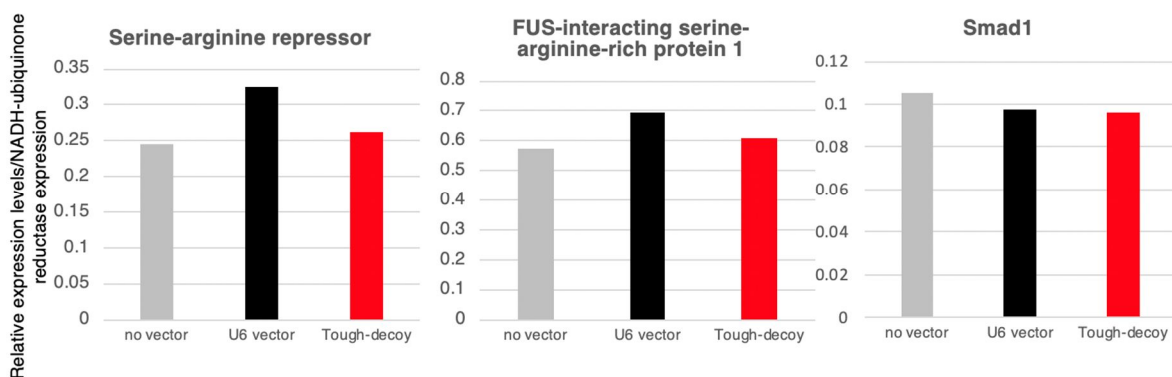


図 3 miR-Bantam Tough Decoy を導入したシストソミュラにおける標的遺伝子の mRNA 発現

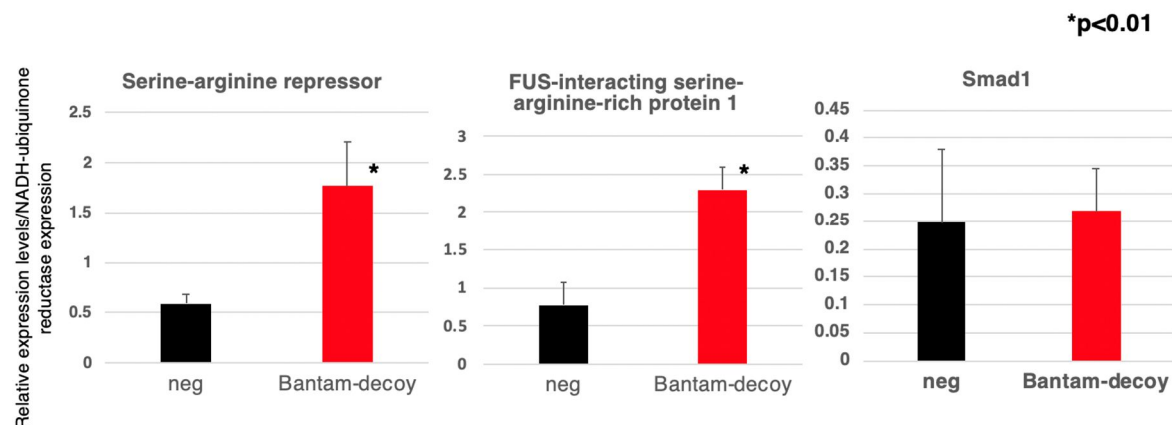
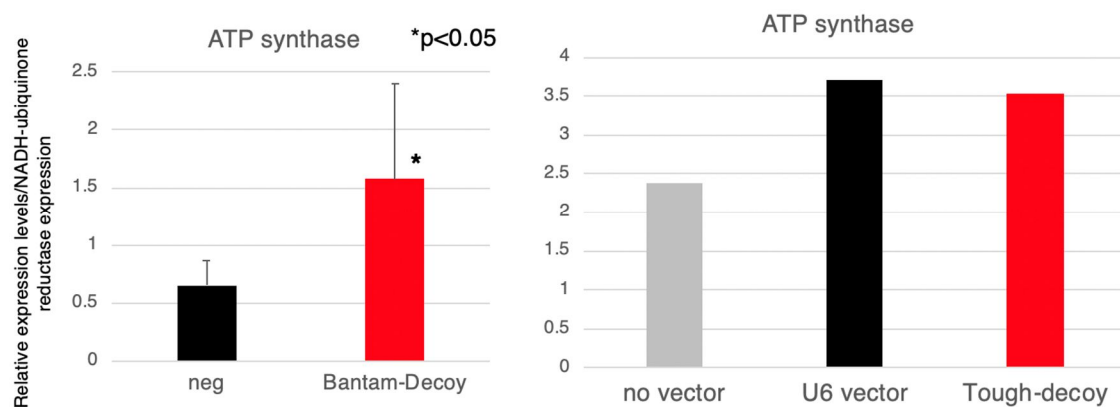


図 4 miR-Bantam Tough Decoy を導入した虫体における ATP synthase の mRNA 発現



(3) 以上の結果から、今回の研究において、住血吸虫を標的とした miRNA ノックダウンシステムが、この miRNA Tough Decoy 法を使用する事で実現可能である事が国内外で初めて確認された。一般に、多細胞動物である住血吸虫においては、遺伝子ノックアウト動物の作成や、ゲノム編集は、実現が難しいが、このノックダウンシステムを使用する事で、一過性の miRNA ノックダウンが可能であると考えられる。また、今回の研究により miRNA ノックダウンしたシストソミュラにおける miR-Bantam の機能は、すでに報告のあった一部の標的遺伝子の発現抑制に関与していると考えられた。特に、セリン/アルギニン・リッチタンパク質の制御に関わることから、miR-Bantam は全体での転写調節を行っていると考えられる。特に mRNA のスプライシングに関わる因子の発現を抑える事で、発育途中の幼虫での形態変化や成熟を抑えている可能性が考えられた。しかし、成虫においては、miR-Bantam の機能は全く異なっており、これらの遺伝子の発現調節には関与していないと考えられた。特に、miR-Bantam は、雌雄のペアリング以降に急激な発現上昇が見られ、細胞外小胞にも多く含まれるようになる。このことから、miR-Bantam の機能はまだ謎な面が多く今後も研究していく必要があると思われる。最近の報告で、細胞外小胞内の miR-Bantam が宿主のマクロファージの増殖を誘導し、TNF-a 等のサイトカインを誘導する事が示された (Lin J et al, 2019, *PLoS Pathog.*)。このことから、寄生虫間だけではなく、宿主寄生虫間関係においても、miR-Bantam の役割は非常に広く、寄生虫蠕虫に共通した役割を持つ miRNA であると考えられ、様々な寄生虫疾患の生物学を考える上でも重要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Blay EA, Kumagai T, Yamabe M, Hino A, Shimogawara R, Kim HS, Sato A, Ichimura K, Ayi I, Iwanaga S, Ohta N. Insights into the mode of action of 1,2,6,7-tetraoxaspiro [7.11] nonadecane (N-89) against adult *Schistosoma mansoni* worms. *Parasitol Int.* 2018 Aug;67(4):403-412. doi: 10.1016/j.parint.2018.03.006.
2. Yamabe M, Kumagai T, Shimogawara R, Blay EA, Hino A, Ichimura K, Sato A, Kim HS, Ohta N. Novel synthetic compounds with endoperoxide structure damage juvenile stage of *Schistosoma mansoni* by targeting lysosome-like organelles. *Parasitol Int.* 2017 Feb;66(1):917-924. doi: 10.1016/j.parint.2016.10.013.

〔学会発表〕(計2件)

国際学会

1. Takashi Kumagai et al. The functional analysis of female-biased mirnas, mir-Bantam, in the extracellular vesicles of *Schistosoma japonicum* using the Tough-decoy miRNA blocking system., 14th International Congress of Parasitology. Aug 2018.
2. Takashi Kumagai et al. Female-biased miRNAs productions through the extracellular vesicles induced by the erythrocyte uptake in the adult worms of *Schistosoma japonicum*. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) Parasitic Disease Panel. Jan 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：下河原理江子

ローマ字氏名：SHIMOGAWARA,Rieko

研究協力者氏名：太田伸生

ローマ字氏名：OHTA,Nobuo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。