

研究種目：基盤研究 B(一般)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380165
 研究課題名(和文) フィラリアーヤブカ媒介系を用いた病原体と媒介節足動物の相互作用に関する研究
 研究課題名(英文) Molecular dissection of the vector-parasite relationship using Aedes-Filaria transmission system
 研究代表者
 福本 晋也 (FUKUMOTO SHINYA)
 帯広畜産大学・原虫病研究センター・講師
 研究者番号：50376422

研究成果の概要 (和文)：

ヤブカ・イヌを用いたフィラリアライフサイクル実験系を用いてフィラリアと宿主の相互作用の解析により、フィラリア感染において重要な因子の解析を行った。その結果、蚊の自然免疫経路などはフィラリア感染に対して有意な機能を持たないことが明らかとなった。ベクター蚊において、他の病原微生物と比較して著しく巨大な多細胞生物であるフィラリアに対しては、既知の概念とは異なるベクター病原体相互作用が存在することが示唆された。宿主転換に際し、フィラリア側因子として脱皮関連遺伝子群が重要な働きを担うことが明らかとなった。特に cut1 遺伝子は宿主転換依存的に発現していることが明らかとなり、フィラリア症制御のための新たな薬剤開発シーズとなることが期待された。

研究成果の概要 (英文)：

The host-parasite relationship in vector mosquito, Aedes, and Filaria parasite was analyzed. Our data indicated that the mosquito innate immune systems were not significantly affect filarial infection to mosquito vector. This result suggested the presence of completely different anti-pathogen system against filarial parasite compare to small pathogens such as protozoa, bacteria or virus. The molting related genes of filarial parasite were considered as have a key role for host transition. Especially, cut1 gene transcripts were specifically detected in host transition stage. This result indicated that cut1 could be a useful drug target for establishing novel filarial parasite infection controlling strategy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：イヌ・フィラリア・ヤブカ・寄生虫

1. 研究開始当初の背景

イヌフィラリア症は予防薬の発達により、

もはや驚異では無くなったようにも見受けられる。しかしながら、フィラリアは依然と

して日本全土に蔓延し続けており、予防薬の投与無しにはイヌの安全を確保することはできず、抜本的な対策の確立が獣医療上、至上命題となっている。科学技術が発達した現代の日本でさえも、フィラリア症が根絶されること無く猛威を奮い続けている要因の一つとして、本症が蚊媒介性疾患であることが挙げられる。フィラリア症の撲滅には薬剤による治療はもちろんのこと、媒介蚊による伝播の制御が極めて重要な鍵となることが容易に推察される。つまり、フィラリア症の全体像の解明には、ヤブカ体内における、ヤブカとフィラリアの関係を解明することが必須である。しかしながらこのような観点からの研究は立ち遅れているのが現状である。第一の理由として、実験室レベルでのフィラリアの維持が極めて困難であることが挙げられる。第二の理由として、蚊とフィラリアの間に働く因子の遺伝学的解析は技術的な理由から困難であることが挙げられる。

蚊の体内に寄生虫であるフィラリアが侵入すると、蚊は何らかの応答を働かせてフィラリア排除を試みると推測されている。蚊から寄生虫に対する認識は、同じ真核生物である寄生虫を認識するという点で、細菌やウイルスなどに対する認識と異なり、正確な認識機構が必要となる。侵入してきた寄生虫に対する、蚊の真核細胞による認識メカニズムは、寄生虫感染の解明において重要であるにも関わらず、不明な点が多い。また、認識の結果、蚊は何らかの防御反応を示すと推測される。昆虫に代表される節足動物種の免疫反応は、人間などの脊椎動物と同様に「体液性免疫」と「細胞性免疫」から構成されているが、脊椎動物とはその様相が大きく異なる。脊椎動物が持つ獲得免疫機構を持たない節足動物は、自然免疫のみにより外来異物に対する防御を行う。節足動物では、体液性の

免疫として体液凝固、メラニン化反応、オプソニン化、さらには抗菌ペプチドの分泌などが含まれ、その一方で貪食やカプセル化が細胞性免疫の主な反応となる。昆虫の自然免疫システムでは、昆虫体内に病原体が侵入すると、これらを異物として Toll 経路もしくは Imd 経路が活性化され、体液性免疫および細胞性免疫が大幅に亢進されることが知られている。しかしながら、真核細胞である寄生虫に対する免疫システムがどのように制御され、どのような防御反応を示すのかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者らはフィラリアと媒介節足動物であるヤブカの相互作用を解明することにより、イヌフィラリア症媒介成立の分子基盤の理解を目指す。研究では前述の事象を詳細に明らかにするため、フィラリアとヤブカの相互作用を網羅的に解析することにした。媒介蚊は免疫反応を介して積極的にフィラリアを排除すると推測される。一方で、フィラリア側からの視点に立つと、蚊は細胞接着因子の提供や成長補助因子の供給により、フィラリアの成長のサポートも行おうと考えられている。現在は、これら二つのメカニズムのバランスが保たれることにより、蚊とフィラリアの寄生関係が成立しているとされている。しかし、これまでに明らかにされている関与因子は極めて少なく、媒介節足動物である蚊とフィラリアの間で相互作用する因子群の更なる同定が求められている。申請者らの現在までの研究によって、新規寄生虫認識因子 Furrowed タンパクの同定に成功している。Furrowed タンパクは、蚊体内において、フィラリアと同様の真核生物寄生体であるマラリア原虫の認識に関与していることを明らかにした。Furrowed タンパクは哺乳類 Pセレクトインのホ

モログであり、哺乳動物宿主においてマラリア原虫の認識に関与することが明らかになっている。つまり、媒介節足動物である蚊と、宿主である哺乳類は病原体である寄生虫にたいして似通った認識メカニズムを持つことが予想される。従って、本研究によって明らかになるであろう病原体と媒介節足動物の相互作用は、哺乳動物宿主における感染という現象を理解する上でも新たな視点をもたらすものと期待される。

3. 研究の方法

本研究は、フィラリア-ヤブカ媒介系を用いて病原体と媒介節足動物の相互作用を解析することにより、フィラリア症伝播の全体像を明らかにし、フィラリア症制御手段の確立を目指すものである。媒介ヤブカとしてヤブカ属の蚊 *Aedes aegypti*、フィラリアとしてイヌフィラリア症の原因寄生虫である *Dirofilaria immitis* を実験材料として研究を行った。

フィラリアは哺乳動物宿と媒介昆虫の2宿主の中で分化・発達を行うことでその複雑なライフサイクルを完結している。そこでどのような因子がフィラリア症の成立において重要な働きを持つのかを明らかにするため、ベクター側因子・フィラリア側因子の双方の観点から解析を行った。

哺乳動物宿主血液中に存在するマイクロフィラリアは蚊の吸血によって、蚊の体内に侵入することにより、媒介節足動物であるヤブカへの感染が成立する。申請者らはまず、フィラリア感染ヤブカと非感染ヤブカから、各組織を分離し、メッセンジャーRNAを精製、このメッセンジャーRNAを鋳型としてcDNAを合成した。次に、フィラリア感染によって特異的に発現が上昇または減少する遺伝子cDNAを濃縮するため、感染蚊および

非感染蚊から得られたcDNAによるサブトラクション法を行った。得られたフィラリア感染特異的な発現変動cDNAのプールを材料として、フィラリア感染特異的・発現変動遺伝子ライブラリーの構築を行った。フィラリア感染によって発現変化を示す遺伝子を同定するため得られたフィラリア感染特異的・発現変動遺伝子ライブラリーのEST解析を行った。

ベクター側因子の解析は主としてRNA干渉法を用いた。ヤブカにおける抗病原体応答関連遺伝子を候補として塩基配列情報から、遺伝子特異性の高い500-1,000塩基の領域を選定しRNA干渉法に供した。RNA干渉法では、ジーンターゲッティング法のような煩雑な操作は必要なく、塩基配列さえ知ることができれば合成したRNAを導入するなどの簡便な手法で遺伝子の機能を調べることができる。よって、ゲノムプロジェクトによって全塩基配列を知ることのできるヤブカのような生物種では、逆遺伝学的解析が容易になっている。具体的な方法は以下の通りである。ヤブカ遺伝子特異的な二本鎖RNAを、ヤブカの腹腔内に直接注入する。この注入にはガラスニードルを装着したマイクロインジェクターを用いる。この方法は、節足動物の血管系は開放血管系であることに依存しており、特に中腸、脂肪体、表皮、血球細胞系において遺伝子の機能を効率よく阻害することが示されている。申請者らは、蚊（ハマダラカ）の抗菌ペプチド遺伝子の発現を効果的に抑制することを示し、このRNA干渉法が蚊などの節足動物において有効であることを過去の研究により確認しており、本法をヤブカに適用した。RNA干渉法によって特定遺伝子をノックダウンした後に、それらのヤブカにフィラリアを感染させる。感染後経時的に、各組織でのフィラリアの成熟率・フィラリア死亡

率・フィラリア到達数を、顕微鏡観察またはリアルタイム PCR 法を用いて解析した。これらの解析の結果、ヤブカとフィラリア間で相互作用を示す遺伝子を、特にフィラリアの成長阻害もしくは成長促進効果を示す表現型に着目し、同定を試みた。また、フィラリアと同様に蚊によって媒介される病原体であるマラリア原虫をもちいて、フィラリアとマラリアにおけるベクター媒介システムにおける比較解析を行い、ベクター宿主因子の同定を試みた。

フィラリア側因子として、蚊ステージ・哺乳動物宿主ステージのフィラリア RNA を材料として、サブトラクション法により各宿主特異的変動遺伝子ライブラリーを構築し、その解析を行った。フィラリア感染によって発現変化を示す遺伝子を同定するため、得られたフィラリア感染特異的・発現変動遺伝子ライブラリーの EST 解析を行った。プラスミドライブラリーを宿主大腸菌に導入し、得られたコロニーからプラスミド DNA を精製し、5'末端側の塩基配列の解析を行った。EST 解析によって得られた情報をデータベースと照合することによりどのような因子がフィラリアの宿主適応に重要な働きをしているのかを解析した。

上記の EST 解析によって得られた情報をもとに、フィラリアにおいてソーキング法による RNA 干渉実験を行い、フィラリア宿主適応に主要な働きを持つ遺伝子の同定をこころみた。

以上に記した方法により、どのような因子がフィラリアのライフサイクルの成立に関わっているのか、その分子基盤の解明を行った。

4. 研究成果

ベクター側因子の解析にあたり、EST データベースの解析により得られた抗寄生虫応

答関連候補遺伝子のフィラリア応答に関する関与を RNA 干渉法により解析した。主として蚊において最も重要な免疫応答システムである自然免疫機構に着目して解析を行った。自然免疫機構をになう中枢である Toll 経路および Imd 経路をターゲットとして RNA 干渉法によりターゲティングを行ったヤブカに対してフィラリアを感染させその感染表現型を観察した。その結果いずれの遺伝子群においても有意な感染表現系の変化を確認することは出来なかった。この結果は、本研究課題実施中に Johns Hopkins University の研究グループによって発表されたヒトフィラリア症を惹起するマレー糸状虫とヤブカにおける結果と同様のものではなかった。ことから、蚊における免疫システムのフィラリアに対する関与は極めて小さな物であり、有意にフィラリア感染を制御する因子では無いことが明らかとなった。また、ハマダラカによって媒介されるマラリア原虫とヤブカによって媒介されるフィラリアにおいても共通する、汎ベクター蚊病原体応答機構が存在するのでは無いかと推測して、マラリア感染に対して抑制的に機能する因子のフィラリア感染表現型に対する影響を解析した。我々の研究グループによって現在までに同定された、Pセレクチン様タンパクのカホモログである Furrowed のノックダウン実験をヤブカにおいて行い、フィラリア感染表現型の解析を行った。しかしながら、ヤブカにおけるフィラリア感染率はコントロール群と比較して有意な差は認められなかった。

以上の研究によって得られた結果から、ヤブカにおける多細胞生物であるフィラリアに対する応答は、他の細菌・原虫・ウイルスなどの単細胞生物および未満の微少の病原体に対する応答とは本質的に異なる事が示唆された。フィラリアは多細胞生物であり、

ベクターステージでの最大全長は1mmにも達する。本研究に供しているヤブカの全長は8mm程度であり、フィラリアは全長の20%程度と極めて巨大であり、微少な病原体応答による概念のみでは説明が不可能な新たな抗病原体応答システムが存在することが示唆され、今後の研究の展開が期待される。

フィラリア側因子の解析にあたり、ESTデータベースより、脱皮に関連する遺伝子が主要な因子であることが明らかとなった。全生活環において、フィラリアは5回の脱皮を行う。ベクターステージと哺乳動物宿主との転換の際にも脱皮を行い、あらたな宿主への第一段階適応機構であると考えられている。ソーキング法によってフィラリアに対してRNA干渉実験を行い得られた脱皮関連遺伝子のうち、*cpl* 遺伝子と *cut1* 遺伝子が実際にフィラリアの脱皮制御に機能していることが明らかとなった。これらの遺伝子の発現レベルは宿主転換時において発現が急激に上昇することが mRNA レベルの解析で明らかとなった。この中でも *cut1* は宿主転換時の脱皮時期にのみ特異的に発現が上昇することが確認され、フィラリアが昆虫宿主と哺乳動物宿主との転換に際して重要な働きを有していることが明らかとなった。以上の結果より、脱皮関連遺伝子はフィラリアの宿主転換において重要な働きをしており、*cut1* は哺乳動物宿主への再感染に必須の因子であることが明らかとなった。今後 *cut1* を標的にすることにより、フィラリアの感染を制御する新たな創薬シーズになることが期待され、フィラリア感染予防薬の恒常的投与が推奨される現状の改善に際し、本研究の成果が応用されることが期待される。

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. Doi, Y., Shinzawa, N., Fukumoto, S., Okano, H., and Kanuka, H.: Calcium signal regulates temperature-dependent transformation of sporozoites in malaria parasite development. *Exp. Parasitol.* 128, 176-180, 2011. (査読有)
2. Aonuma, H., Yoshimura, A., Perera, N., Shinzawa, N., Bando, H., Oshiro, S., Nelson, B., Fukumoto, S., and Kanuka, H.: Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasit. Vectors* 2, 15, 2009. (査読有)
3. Perera, N., Aonuma, H., Yoshimura, A., Teramoto, T., Iseki, H., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., Fukumoto, S., and Kanuka, H.: Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 156, 32-36, 2009. (査読有)
4. Shinzawa, N., Nelson, B., Aonuma, H., Okado, K., Fukumoto, S., Miura, M., and Kanuka, H.: p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*. *Cell Host Microbe.* 6, 244-252, 2009. (査読有)
5. Aonuma, H., Suzuki, M., Iseki, H., Perera, N., Nelson, B., Igarashi, I., Yagi, T., Kanuka, H., and Fukumoto, S.: Rapid identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 671-676, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 22 件)

1. 吉村文、岡戸清、波田一誠、丹羽隆介、福本晋也、嘉糠洋陸: Filarial parasites: Developmental transition mechanism mediated by environmental stimuli

- during a bridge between vector and host:
第 32 回日本分子生物学会年会:
2009.12.12 (神奈川県)
2. 吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸: フィラリアの環境応答性トランジション機構の解明: 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会: 2009.10.3 (北海道)
3. 吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸: フィラリアの生活環における環境応答性トランジション機構: 第 78 回日本寄生虫学会: 2009.3.28 (東京都)
4. 吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸: フィラリアはどのようにして宿主体内への移行を理解するのか?: 第 77 回日本寄生虫学会: 2008.4.2 (長崎県)
5. 吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸: Interaction between vectors and parasites: Filaria behavior at blood-feeding of mosquito: 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity: 2007.9.2 (兵庫県)
6. 福本晋也、青沼宏佳、嘉糠洋陸: Pattern recognition of Plasmodium parasite in mosquito: 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity: 2007.9.2 (兵庫県)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福本 晋也 (FUKUMOTO SHINYA)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・講師
研究者番号: 50376422

(2) 研究分担者

嘉糠洋陸 (KANUKA HIROTAKA)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号: 50342770

(3) 連携研究者

()

研究者番号: