

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06378

研究課題名(和文) 犬バベシア症の血小板減少症における分子病態の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of thrombocytopenia in canine babesiosis

研究代表者

大塚 弥生(Otsuka, Yayoi)

岩手大学・農学部・客員准教授

研究者番号：30396303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：バベシア原虫感染症における血小板減少症発症機序の解明をめざし、「原虫由来蛋白質がトリガーとなり発生する感染防御反応がバベシア症の血小板病態にも重要な役割を担う」という予測のもと研究を行った。その結果、*B. gibsoni*原虫の熱ショック蛋白質70などが惹起する抗原抗体反応の交差反応が犬血小板にも及ぶ可能性、感染犬血清でのIL-8の上昇から貪食細胞の活性化の可能性が示唆され、一旦を担うと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本症の主症状である血小板減少症についてあまり研究されておらず、機序は不明である。本症の血小板病態の全体像を掴むことで、新たな病態や血小板感染防御の発見に加え、本症や他の血小板減少症を発生させる感染症の研究・制圧においても大きな意義を果たすと考えられる。本研究から血小板貪食機構が関与する可能性が示唆され、それを惹起する原虫由来タンパク質の同定を進めることで、ワクチン開発や創薬分野へ寄与できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of thrombocytopenia in Babesiosis, this study was conducted based on the hypothesis that the defense response triggered by *B. gibsoni*-derived proteins plays an important role in the pathogenesis of platelets in babesiosis. As a result, it was suggested that the cross-reaction of antigen-antibody reactions induced by heat shock protein 70 and other proteins of *B. gibsoni* also extends to canine platelets. In addition, the elevation of serum IL-8 were observed in *B. gibsoni* acutely infected dogs.

研究分野：獣医内科学

キーワード：Babesia gibsoni 血小板減少症 熱ショック蛋白質70 抗血小板抗体 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

孢子虫綱に属する赤血球内寄生原虫のパベシア原虫がダニの媒介で感染して発症するパベシア症は、ヒト、イヌ、ウシなどに見られ、感染すると溶血性貧血、発熱、血小板減少症を起こす。本症の主症状の溶血性貧血発症機序についてはすでに多くの研究がなされている一方、血小板減少症についてはパベシア症の共通の特徴であるにも関わらずあまり研究されていない。

我々はイヌの *Babesia gibsoni* 原虫感染症における溶血性貧血発症機序研究において、*B. gibsoni* 原虫の熱ショック蛋白質 70 (BgHSP70) の提示により、感染犬体内に抗 BgHSP70 抗体が産生され、本抗体が犬赤血球の HSP70 と交差反応し、原虫寄生赤血球と非寄生赤血球が貪食細胞に認識・捕食されることを実証し (PMID: 21454016)、血小板減少症の発症においても原虫由来蛋白質が惹起する同様の機構がその一端を担うと考えた。また *B. gibsoni* 原虫の培養上清と血小板を作用させると血小板の凝集能が亢進することから、本現象は *B. gibsoni* 原虫が BgHSP70 などの原虫由来蛋白質が含む表面蛋白質や放出蛋白質を介して (PMID: 21180255)、直接血小板の活性化を誘発している可能性が強く示唆されている。*B. gibsoni* 原虫と同じ孢子虫綱に属するマラリア原虫寄生において、血管内皮細胞から放出される Von Willebrand 因子や炎症性サイトカインが血小板凝集を引き起こし、その結果血小板大量消費と血小板減少症が起こることが実証されているが、本症においては証明されていない。

## 2. 研究の目的

パベシア原虫における血小板病態について、原虫由来蛋白質が惹起する血小板活性化と抗血小板自己抗体とその抗原タンパク質探索及び炎症性サイトカイン放出について研究した。

## 3. 研究の方法

### (1) *B. gibsoni* 原虫急性感染犬の血清の収集

初年度より民間の動物病院に協力を依頼し、来院した *B. gibsoni* 原虫急性感染犬の血液を採取し、血液データおよび血漿および血清を提供いただいた。その際、インフォームドコンセントにて飼い主への本研究への同意を得たものを使用した。以前より保存されていた症例 (PMID: 31511445) を含め、25 頭の自然発症した *B. gibsoni* 原虫急性感染犬の血液サンプルを得ることができた。

### (2) *B. gibsoni* 原虫タンパク質の分離

本学にて継代維持している *B. gibsoni* 原虫の体外培養系を用いて、原虫タンパク質の分離を行うため比重遠心液の条件調整を行った。近縁の *B. caballi* 原虫での報告に準じて、Percoll 液を希釈し、1.080 g/dl および 1.115 g/dl の 2 層による勾配により、密度勾配比重遠心法を用いて、原虫寄生赤血球と非寄生赤血球を分離した。原虫寄生赤血球画分において、80%近い寄生率を得ることに成功し、enriched 画分として実験に供した (図 1)。

### (3) *B. gibsoni* 原虫感染犬血清中における抗血小板抗体の検証

健康犬の末梢血から遠心分離にて回収した血小板から可溶性画分および不可溶性画分をそれぞれ抽出し、2次元電気泳動しウエスタンブロット後、*B. gibsoni* 原虫急性感染犬の血清とイムノブロットにより反応させ、抗血小板抗体の存在を検証した。また、血小板の HSP70 についても、抗 BgHSP70 抗体が反応するかを確認した。

*B. gibsoni* 原虫培養系より回収した原虫寄生赤血球 enriched 画分から、可溶性画分および不可溶性画分に分離し 1 次元および 2 次元電気泳動し、ウエスタンブロット後、上記と同様にイムノブロットにより反応させ、抗血小板抗体の存在を検証した。

#### (4) 抗血小板抗体の抗原となりうる血小板・原虫候補蛋白質の同定

上記と同様に電気泳動したゲルを LC/MS 分析用銀染色にて染色し、イムノブロットにより反応性を示した血小板および原虫由来蛋白質について、同位置に該当するスポットを回収し、LC/MS/MS にて解析を行い、得られた mgf ファイルを Mascot search で検索し候補蛋白質の情報を得た。なお *B. gibsoni* 原虫のタンパク質情報はデータベースに存在しないため、Mascot search では Taxonomy のリストに既存で同じ胞子虫綱に属するマラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) を選択し、データを利用した。さらに Taxonomy のリストへ *B. microti* (*B. microti* strain RI) および *B. bovis* (*B. bovis* T2Bo) の fasta データファイルを取得し組み入れて利用した。

#### (5) 原虫由来 RNA の分離と RACE 法による候補タンパク質遺伝子の同定

上記と同様に *B. gibsoni* 原虫体外培養より密度勾配遠心法により原虫寄生赤血球 enriched 画分を回収し、RNA を抽出した。Mascot search で得た候補蛋白質の情報をもとに得た、*B. gibsoni* の近縁の *B. bovis* T2Bo 株の遺伝子情報をもとにプライマーを設計し 5' - 及び 3' - RACE を行った。

#### (6) 炎症性サイトカインおよび血小板活性化因子の解析

協力動物病院より提供された *B. gibsoni* 原虫急性感染犬の血清を用いて、炎症性サイトカインおよび血小板活性化因子を解析した。インターロイキン(IL)-2、IL-6、IL-8、IL-10、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、単球走化性因子 1(MCP-1)、後期糖化反応生成物(AGE)特異的受容体(RAGE)、幹細胞因子(SCF)、Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ 、血管内皮増殖因子(VEGF：血小板より放出)について測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) *B. gibsoni* 原虫感染犬血清中における抗血小板抗体の存在の検証

健常犬血小板由来の可溶性画分および不可溶性画分におけるイムノブロットにおいて、急性 *B. gibsoni* 原虫感染犬および健常犬の血清とそれぞれ反応するシグナルが観察され、いずれの画分においても抗血小板抗体の存在が検証できた。一方で感染犬血清だけに特異的に強い反応性を示すと認められた血小板タンパク質のシグナルは可溶性画分においては 5 個、不可溶性画分においては 10 個観察された。

抗 BgHSP70 抗体を用いたイムノブロットでは、犬血小板由来の可溶性画分および不可溶性画分ともに、理論 pI = 5.41、理論分子量 = 69.9 の位置にシグナルが観察されたことから、犬血小板 HSP70 にも *B. gibsoni* 原虫と同様の分子構造を持つタンパク質が発現していることが確認された(図 2)。

#### (2) 抗血小板抗体の抗原となりうる血小板タンパク質の同定

イムノブロットの結果を受け、血小板可溶性画分から 13 個、不可溶性画分からは 17 個のスポットを選択し、LC/MS/MS 分析を行った。*Canis lupus familiaris* で検索の結果、高スコアを示

したものはTalin-1、Myosin-9、Filamin Aなど数種のアクチンネットワーク系の細胞骨格タンパク質であった。さらにThrombospondin-1、Plasminogen activator inhibitor-1などの血小板活性化因子が低スコアであるが検出された。

### (3) 抗血小板抗体の抗原となりうる *B. gibsoni* 原虫タンパク質の同定

密度勾配遠心法によって得た原虫寄生赤血球 enriched 画分を電気泳動しウエスタンブロット後、1と同様に *B. gibsoni* 原虫急性感染犬および健常犬の血清とそれぞれイムノブロットにより反応させた。染色したゲルからイムノブロットのシグナルと一致する位置のバンドを切り出し、2と同様にLC/MS/MS分析を行った。Mascot Serverの *P. falciparum* データに基づく分析の結果、Hitするタンパク質は認められなかった。そこで、*B. microti* および *B. bovis* での再分析を行なった。*B. microti* では合計35個、*B. bovis* では合計75個のタンパク質がHitした。このうち共通して観察されたものはElongation factor や Ubiquitin family タンパク質、などが認められた。また *B. bovis* ではアノテーションされていないhypothetical proteinも多く検出された。*B. gibsoni* は *B. microti* より *B. bovis* により近縁であることが知られているため、以降の解析は *B. bovis* 原虫のデータベースを中心に行なった。

高頻度に検出されてきたhypothetical protein 4種 (A7AQF0、A7AUM4、A7AW52、A7AWX0) の遺伝子情報を、Piroplasma DB (<https://piroplasmadb.org/piro/app/>) にて得た。A7AQF0、A7AUM4は膜タンパク質、A7AWX0は肝臓ステージの発現タンパク質の可能性が示唆された。一方A7AW52については情報がなかったため、*B. gibsoni* 原虫由来RNAを抽出しRACEによるクローニングを試みたが、単離できなかった。

### (4) 炎症性サイトカインおよび血小板活性化因子の解析

協力動物病院から提供いただいた血清のうち、20頭分の *B. gibsoni* 急性感染犬および本学で飼育管理している正常犬計8頭の血清を用いて、IL-2、IL-6、IL-8、IL-10、GM-CSF、MCP-1、RAGE、SCF、TNF- $\alpha$ 、VEGFを測定し比較した。これのうち、血小板から放出されるものはVEGFのみである。IL-10、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、VEGFは検出限界以下となり測定できなかったが、*B. gibsoni* 急性感染犬血清において、IL-8値の顕著な上昇が観察された(図3)。一方、IL-8値と *B. gibsoni* 寄生率や血小板数・貧血指数との相関は認められなかった。加えてIL-2、IL-6、MCP-1、RAGE、SCFの減少も感染犬では低い傾向が示されたが、これらと寄生率や血小板数・貧血指数との相関も認められなかった。

### (5) まとめ

本研究から、BgHSP70などの原虫由来蛋白質が惹起する抗原抗体反応の交差反応が血小板においても起きていることが推測された。また、血小板抗原として可能性のある分子として、細胞骨格タンパク質が考えられるが、*B. gibsoni* 原虫の感染により、それらの分子に対する抗体産生が亢進するかについては今後検討する必要がある。一方 *B. microti* においては、ヒトのThrombospondin-1のドメインと似た構造を有するタンパク質の存在と、それによる免疫回避について報告があり (PMID: 29040286) 低スコアであるものの *B. gibsoni* 原虫急性感染犬との反応性のあるスポットとしてLC/MS/MS解析において検出されたことは興味深い。

また、抗血小板抗体の抗原となりうる *B. gibsoni* 原虫タンパク質については、残念ながらRACEではクローニングができなかった。これには *B. gibsoni* 原虫の遺伝子情報の全解読が望まれる。次世代シーケンサーによる分析を共同研究にて依頼しており、解読後、再度着す

る予定である。

また IL-8 の上昇については、*B. canis* 感染犬における AsierGalán ら (PMID: 29304171) の報告とも一致した。一方で、Andrew Leisewitz ら (PMID: 31063593) は、*B. rossi* 寄生では IL-8 は疾患の重症度と負の相関を示したと報告している。IL-8 は CXCL8 と同一で、CXC ファミリーの炎症性ケモカインとして知られ、食作用の誘導にも作用することが知られる。また現在、エイコサノイドのトロンボキサン (TX) B2 について測定・解析中である

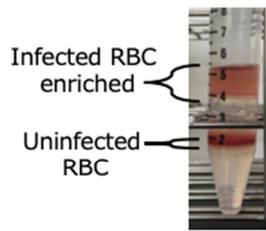
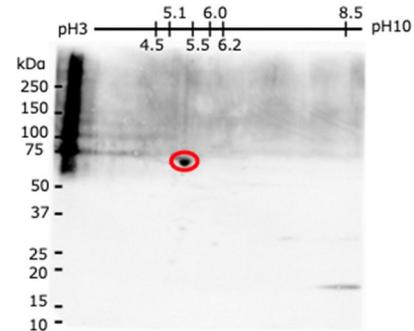


図 1 : 密度勾配遠心法による原虫寄生赤血球の分離



犬HSP70の理論pI / Mw : 5.41 / 69935.00

図 2 : 犬血小板不可溶性画分の抗BgHSP70抗体とのイムノブロット

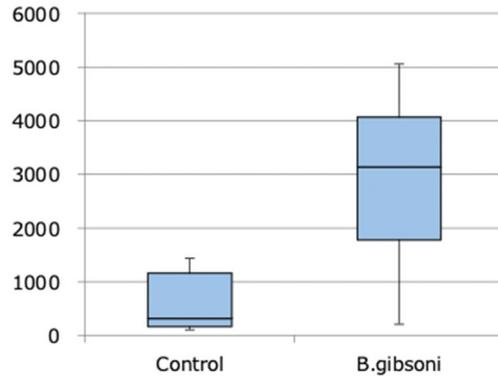


図 3 : *B. gibsoni* 急性感染犬の血清IL-8 値

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Yayoi OTSUKA-YAMASAKI, Osamu INANAMI, Haruka SHINO, Reeko SATO, Masahiro YAMASAKI   | 4. 巻<br>83            |
| 2. 論文標題<br>Characterization of a novel nicotinamide adenine dinucleotide-cytochrome b5 reductase mutation associated with canine hereditary methemoglobinemia | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Veterinary Medical Science   | 6. 最初と最後の頁<br>315-321 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1292/jvms.20-0390   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Misa MASUDA, Yayoi OTSUKA-YAMASAKI, Nobuyuki SHIRANAGA, Aiko IGUCHI, Naohiro UCHIDA, Reeko SATO, Masahiro YAMASAKI | 4. 巻<br>81                |
| 2. 論文標題<br>Retrospective study on intercurrent pancreatitis with Babesia gibsoni infection in dogs                           | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>J Vet Med Sci  | 6. 最初と最後の頁<br>1558 ~ 1563 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1292/jvms.19-0280  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                 |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Reeko SATO, Naohiro UCHIDA, Yuka KAWANA, Minako TOZUKA, Saori KOBAYASHI, Nana HANYU, Yoshinobu KONNO, Aiko IGUCHI, Yayoi YAMASAKI, Konomi KURAMOCHI, Masahiro YAMASAKI | 4. 巻<br>81                |
| 2. 論文標題<br>Epidemiological evaluation of cats associated with feline polycystic kidney disease caused by the feline PKD1 genetic mutation in Japan                               | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>J Vet Med Sci  | 6. 最初と最後の頁<br>1006 ~ 1011 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1292/jvms.18-0309  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山崎(大塚)弥生、稲波 修、篠 春香、佐藤れえ子、山崎真大                       |
| 2. 発表標題<br>ボメラニアン犬で見つかったNADHメトヘモグロビン還元酵素欠損症原因タンパク質b5R-I194Lの解析 |
| 3. 学会等名<br>第16回獣医内科学アカデミー                                      |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小林 沙織、山崎弥生、内田 直宏、佐藤 れえ子                 |
| 2. 発表標題<br>ネコpolycystin-1遺伝子(PKD1)の遺伝子多型と腎嚢胞形成の関連性 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本腎臓学会学術総会                          |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|--|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 山崎 真大<br><br>(Yamasaki Masahiro)<br><br>(40322846) | 岩手大学・農学部・教授<br><br><br><br>(11201) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|