

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15996

研究課題名（和文）肝蛭の宿主体内における酸素濃度依存的なエネルギー代謝の転換

研究課題名（英文）Oxygen concentration-dependent energy metabolism conversion of Fasciola flukes inside host

研究代表者

関 まどか（Ichikawa-Seki, Madoka）

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：20700488

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝蛭症は世界各地で広く発生する人獣共通感染性の吸虫症で、畜産業に与える経済被害は吸虫類の中で最大である。本研究では、宿主体内への寄生による酸素濃度の劇的な変化に応じて、肝蛭のミトコンドリア呼吸鎖の生化学的特性がどのように変動するかを解析した。肝蛭の成虫では、低酸素環境に適応したフマル酸呼吸が作動していることが明らかになった。一方、幼虫では生息環境の酸素濃度に応じて酸素呼吸とフマル酸呼吸を切り替えることが判明し、低酸素環境の宿主体内では、薬剤標的としてフマル酸呼吸が極めて有望であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、薬剤耐性肝蛭の出現が問題となっているため、新規薬剤の開発が求められている。宿主と異なる寄生虫独自の代謝系は格好の薬剤標的となるため、本研究結果は新規候補化合物の探索につながる重要な基盤情報になる。

研究成果の概要（英文）：Fasciolosis is a zoonotic parasitic disease distributed around the world. Its economic damage to the livestock industry is the largest among trematode infections. In this study, we analyzed changes in biochemical properties of the mitochondrial respiratory system of Fasciola flukes in response to dramatic changes of oxygen concentration inside host. In adults, it was revealed that fumaric acid respiration adapted to the hypoxic environment was activated. On the other hand, it was found that larvae switch between oxygen respiration and fumaric acid respiration according to the oxygen concentration in the habitat, and it was shown that fumaric acid respiration is extremely promising as a drug target in the host body in a hypoxic environment.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：肝蛭 人獣共通感染症 ミトコンドリア呼吸鎖 薬剤標的

## 1. 研究開始当初の背景

肝蛭(図1)は牛などの反芻家畜の肝臓に寄生する吸虫で、肝障害の原因となる。肝蛭は世界中に分布するため、畜産業に対する経済被害額は吸虫類で最も大きく、年間32億ドルにも及ぶ。また、人獣共通感染性の寄生虫でもあり、人の肝蛭症は「顧みられない熱帯病」に分類される。WHOによれば、世界中で240万人が肝蛭に感染し、1億8000万人に感染のリスクがあり、70カ国以上で人体症例の報告がある。

近年、WHOが推奨する唯一の治療薬に対する薬剤耐性の出現が世界的な問題になっており、新規薬剤の開発が求められている。そこで本研究では、薬剤標的として肝蛭のエネルギー代謝経路に着目した。

牧草などに付着した肝蛭の幼虫は、哺乳類宿主に経口的に摂取された後に小腸で殻を脱ぎ、腹腔を経由して肝臓に到達し、最終的には肝臓深部の胆管内に侵入して成虫になる(図2)。

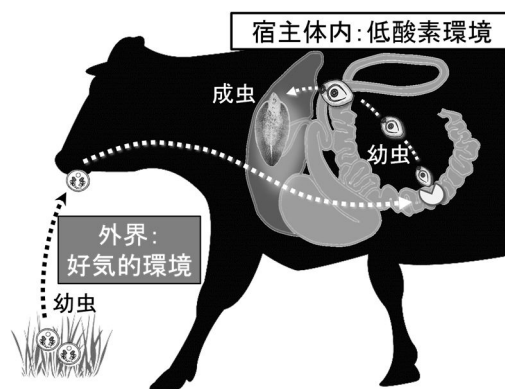


図2. 肝蛭の体内移行

この体内移行の過程で、肝蛭は酸素が豊富な外界から哺乳類体内の低酸素環境への劇的な変化に適応する。また、感染初期には100 $\mu$ m程度だった幼虫が5cmを超える大きさの成虫(図1)にまで著しく成長する。したがって、肝蛭は宿主の体内環境に適応したエネルギー代謝経路をもつと考えられる。実際に、申請者らの最新の研究成果により、胆管に寄生する成虫では低酸素環境に適応したフマル酸呼吸が作動し、エネルギー産生を担っていることが明らかになった

(2018年日本生化学会シンポジウム講演、International Congress of Parasitology 2018)。

フマル酸呼吸は哺乳類には存在しないので、有望な薬剤標的になる。一方、酸素が豊富な外界に存在する幼虫では、宿主と同じ酸素呼吸が働くと推測される(図3)。酸素呼吸とフマル酸呼吸の転換は感染初期の幼虫で起こると推測されるが、詳細は解明されていない。そこで本研究では、「酸素濃度の劇的な変化に応じて、肝蛭のミトコンドリア呼吸鎖の生化学的特性がどのように変動するか」という学術的な問いについて明らかにする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝蛭のミトコンドリア呼吸鎖の生化学的特性を明らかにすることにより、薬剤標的としての有用性を検討し、喫緊の課題である新規薬剤候補化合物の開発につながる基盤情報を得ることである。

WHOが推奨する唯一の治療薬であるトリクラベンダゾールが人と家畜双方の臨床現場で用いられてきた。トリクラベンダゾールは幼虫から成虫に至る哺乳類体内における全発育ステージに有効な唯一の薬剤である。すなわち、感染初期の幼虫を排除する感染予防効果が期待できる。肝蛭症に対するワクチンは存在しないため、トリクラベンダゾール耐性肝蛭に対しては、予防的に適用できる薬剤が存在しないことが臨床上的問題点

となっている。

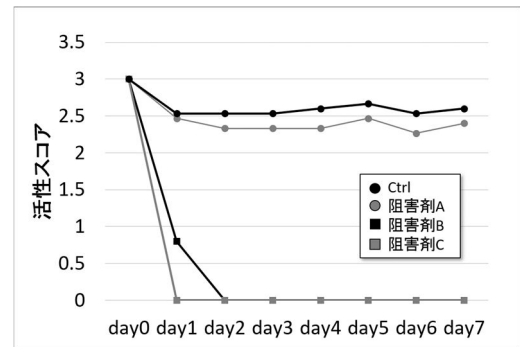
そこで本研究では、幼虫から成虫に成長する過程におけるミトコンドリア呼吸鎖の生化学的特性の変動について解析する(図3)。これにより、幼虫と成虫の双方に有効な薬剤標的を探索するための基盤情報が得られる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 好気および嫌気条件下での酸素濃度依存的な幼虫のミトコンドリア呼吸鎖の機能の変動

好気<sup>\*1</sup>および嫌気<sup>\*2</sup>培養条件下で感染初期の幼虫が経験する感染前後の酸素濃度の変化を再現し、酸素濃度依存的な呼吸鎖の変動を解析する。ここでは、*in vitro* 培養系で肝蛭の複合体 I、II、III の特異的阻害剤を用いて、幼虫の生存試験を実施する(図5)。好気条件下で幼虫が酸素呼吸に依存する場合は、複合体 III の阻害が致命的になると予想される(図4左)。一方、嫌気条件下で幼虫がフマル酸呼吸に依存する場合には、複合体 III の阻害による影響は少なく、複合体 I と II の阻害が致命的になると予想される(図4右)。この実験により、幼虫における酸素濃度依存的な呼吸鎖の機能の転換と、薬剤標的として有望なフマル酸呼吸の存在の有無を明らかにできる。<sup>\*1</sup>: 5%CO<sub>2</sub>, 20%O<sub>2</sub> <sup>\*2</sup>: アネロバックケンキ®: >16%CO<sub>2</sub>, <0.1%O<sub>2</sub>

図5. 幼虫の *in vitro* 生存試験の例



#### (2) 幼虫のミトコンドリア呼吸鎖における電子受容体の種類と比率

酸素濃度が高い外界に生息する生物では、電子受容体としてユビキノン(UQ)を介した呼吸鎖複合体 I-III-IV または複合体 II-III-IV の電子伝達による酸素呼吸が行われる(図4左)。一方、肝蛭の成虫のように低酸素環境に生息する生物では低電位キノンであるロドキノン(RQ)を介した複合体 II-I の電子伝達によるフマル酸呼吸が作動する(図4右)。したがって、酸素濃度が劇的に変化する感染初期の幼虫では、酸素呼吸への依存度が高いほど、UQ の比率が高くなり、フマル酸呼吸の依存度が高ければ RQ が優勢になると予想される。感染初期の幼虫について、HPLC 解析により UQ と RQ の同定を行い、その存在比率を解析する。幼虫でも RQ が存在することが判明すれば、フマル酸呼吸が作動していることが示唆される。

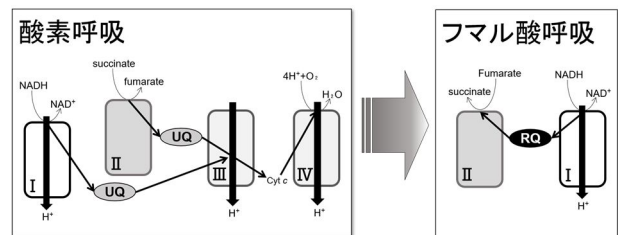


図4. ユビキノン(UQ)とロドキノン(RQ)

### 4. 研究成果

#### (1) 好気および嫌気条件下での酸素濃度依存的な幼虫のミトコンドリア呼吸鎖の機能の変動

肝蛭実験室株の成虫からミトコンドリア分画を単離し、呼吸鎖を構成する Complex I と II に対する典型的な阻害剤である Rotenone と Atpenin A5 について成虫の呼吸鎖酵素に対する阻害率を算出した。さらに、*In vitro* 培養系で各阻害剤の NEJ に対

する殺滅効果を評価し、NEJ のミトコンドリア呼吸鎖の特性を解析した。

Rotenone と Atpenin A5 は、成虫の Complex I と II の活性を特異的に阻害した。好気培養条件下において Complex I の阻害剤は NEJ を殺滅したが、Complex II の阻害剤は効果が無かった。したがって、酸素が豊富な環境では、Complex II に依存しない酸素呼吸が NEJ で作動していることが判明した。一方、嫌気培養条件下では

Complex I と Complex II の阻害剤がともに NEJ を殺滅した。したがって、NEJ は低酸素環境では Complex II により作動するフマル酸呼吸に強く依存することが判明した。肝蛭の NEJ は生息環境の酸素濃度に応じて酸素呼吸とフマル酸呼吸を切り替えることが判明し、低酸素環境の宿主体内では、薬剤標的としてフマル酸呼吸が極めて有望であることが示された。

## (2) 幼虫のミトコンドリア呼吸鎖における電子受容体の種類と比率

成虫ではフマル酸呼吸で電子受容体として働くロドキノン (RQ10) が圧倒的に優勢であったのに対し (RQ10/UQ10 : 36.67)、幼虫では酸素呼吸で働くユビキノン (UQ10) とフマル酸呼吸で働くロドキノン (RQ10) がほぼ等量であった (RQ10/UQ10 : 1.07)。このことから、肝蛭の幼虫は酸素呼吸とフマル酸呼吸を酸素濃度に応じて切り替えることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 9件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Thang TN, Sivakumar T, Kothalawala H, Silva SSP, Yokoyama N, Ichikawa-Seki M.	4. 巻 91
2. 論文標題 Geographic origin of <i>Explanatum explanatum</i> (Creplin, 1847) Fukui, 1929 detected from domestic water buffaloes in Sri Lanka.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infect Genet Evol	6. 最初と最後の頁 104806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sugiyama T, Ichikawa-Seki M, Sato H, Kounosu A, Tanaka M, Maruyama H.	4. 巻 82
2. 論文標題 Molecular characterization and phylogenetic analyses of <i>Fasciola gigantica</i> of buffaloes and goats in Punjab, Pakistan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Int	6. 最初と最後の頁 102288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102311	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Rehman ZU, Tashibu A, Tashiro M, Rashid I, Ali Q, Zahid O, Ashraf K, Shehzad W, Chaudhry U, Ichikawa-Seki M.	4. 巻 82
2. 論文標題 Molecular characterization and phylogenetic analyses of <i>Fasciola gigantica</i> of buffaloes and goats in Punjab, Pakistan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Int	6. 最初と最後の頁 102288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Masatani T, Kojima I, Tashiro M, Yamauchi K, Fukui D, Ichikawa-Seki M, Harasawa R.	4. 巻 83
2. 論文標題 Molecular detection of filarial nematode parasites in Japanese black bears ( <i>Ursus thibetanus japonicus</i> ) from Iwate Prefecture, Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 208-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0466	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Laatamna AE, Tashiro M, Zokbi Z, Chibout Y, Megrane S, Mebarka F, Ichikawa-Seki M.	4. 巻 80
2. 論文標題 Molecular characterization and phylogenetic analysis of <i>Fasciola hepatica</i> from high- plateau and steppe areas in Algeria.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Int	6. 最初と最後の頁 102234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102234	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato H, Hiraya H, Sugiyama T, Fukumoto S, Matsuyama R, Yanagawa Y, Nakao R, Irie T, Taira K, Yamazaki A, Hagiwara K, Yoshida A, Kamata Y, Ichikawa-Seki M.	4. 巻 80
2. 論文標題 Seroprevalence of fasciolosis in Hokkaido sika deer ( <i>Cervus nippon yesoensis</i> ) from Hokkaido Prefecture, Japan revealed by ELISA using recombinant cathepsin L1.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitol Int	6. 最初と最後の頁 102222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichikawa-Seki Madoka, Fereig Ragab M., Masatani Tatsunori, Kinami Aiko, Takahashi Yoko, Kida Katsuya, Nishikawa Yoshifumi	4. 巻 69
2. 論文標題 Development of CpGP15 recombinant antigen of <i>Cryptosporidium parvum</i> for detection of the specific antibodies in cattle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 8~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.10.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Thang Tran Nhat, Hakim Hakimullah, Rahimi Raihana Royan, Ichikawa-Seki Madoka	4. 巻 72
2. 論文標題 Molecular analysis reveals expansion of <i>Fasciola hepatica</i> distribution from Afghanistan to China	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 101930 ~ 101930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.101930	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Loeuring Vandara, Ichikawa-Seki Madoka, Wannasan Anchalee, Sothyra Tum, Chaisowong Warangkham, Tiwananthagorn Saruda	4. 巻 273
2. 論文標題 Genetic Characterization of Cambodian <i>Fasciola gigantica</i> and Dispersal Direction of the Species in Asia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Parasitology	6. 最初と最後の頁 45 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetpar.2019.07.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ichikawa-Seki Madoka, Motooka Daisuke, Kinami Aiko, Murakoshi Fumi, Takahashi Yoko, Aita Junya, Hayashi Kei, Tashibu Atsushi, Nakamura Shota, Iida Tetsuya, Horii Toshihiro, Nishikawa Yoshifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Specific increase of <i>Fusobacterium</i> in the faecal microbiota of neonatal calves infected with <i>Cryptosporidium parvum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48969-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bozorgomid Arezoo, Rouhani Soheila, Harandi Majid Fasihi, Ichikawa-Seki Madoka, Raeghi Saber	4. 巻 19
2. 論文標題 Genetic diversity and distribution of <i>Fasciola hepatica</i> haplotypes in Iran: Molecular and phylogenetic studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports	6. 最初と最後の頁 100359 ~ 100359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vprsr.2019.100359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Calvani Nichola Eliza Davies, Ichikawa-Seki Madoka, Bush Russell David, Khounsy Syseng, ?lapeta Jan	4. 巻 50
2. 論文標題 Which species is in the faeces at a time of global livestock movements: single nucleotide polymorphism genotyping assays for the differentiation of <i>Fasciola</i> spp.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal for Parasitology	6. 最初と最後の頁 91 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpara.2019.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Thang Tran Nhat、V?zquez-Prieto Severo、Vilas Rom?n、Paniagua Esperanza、Ubeira Florencio M.、 Ichikawa-Seki Madoka	4. 巻 76
2. 論文標題 Genetic diversity of Fasciola hepatica in Spain and Peru	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102100 ~ 102100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池内葵, 近藤大輔, Halajian Al, J. Luus-Powell Wilmien, 関まどか
2. 発表標題 南アフリカのカバから得られた双口吸虫の形態学的・分子学的解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本衣美, 田代みちよ, Tran Nhat Thang, 関まどか
2. 発表標題 Fasciola属における新規種鑑別DNAマーカーの確立
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉山琢俊, 佐藤浩庸, 関まどか, 黒木美香, 丸山治彦
2. 発表標題 組み換えCathepsinL1を抗原としたELISAによるヒト肝蛭症の血清診断
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------