

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 3月 1日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20590433

研究課題名 (和文)

腸管寄生線虫の定着と排除を規定する寄生虫側に発現するリガンドの同定

研究課題名 (英文)

Characterization of parasite's molecules specifying host-parasite relationship

研究代表者

石渡 賢治 (ISHIWATA KENJI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00241307

研究成果の概要 (和文)：

腸管寄生線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) の定着環境である粘液の主成分、ムチンのシアル化(シアロムチン)が Nb の排除に関与すること、一方で定着時には極微量のシアル化が存在することからシアロムチンを軸に Nb の定着・排除を規定する寄生虫側のリガンドの同定を試みた。シアロムチンへの Nb の指向性は認めなかった。またシアロムチンに対する Nb 側のリガンドも未同定と課題を残した。ムチンの糖鎖解析結果は、先行結果を概ね支持するものであった。

研究成果の概要 (英文)：

Based on my previous evidences that linkage of sialic acid to mucins associates with expulsion of an gastrointestinal nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*, from mice, and that existence of a small amount of sialomucin at the establishment of the worms, I tried to characterize ligand molecules expressed on the worms which affect the establishment/expulsion, especially those of sialomucin. No directional characteristic of the worms towards sialomucin was detected. Characterization of ligands of sialomucin is still going on. Analyses of glycosylation of mucins by the lectin-array and the MALDI-TOF-MS supported previously reported results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：蠕虫、腸管免疫

1. 研究開始当初の背景

腸管寄生線虫感染に対して宿主は Th2 免疫応答を引き起こし、これによって誘導されたエフェクターが寄生虫の排除を担うと考えられている (Finkelman et al., 2004)。申請者はこれまで、ネズミの腸管寄生線虫

Nippostrongylus brasiliensis (Nb) を用いたマウスの感染モデルにおいて、Th2 免疫応答のカスケードで誘導されてくるムチンのシアル化が Nb の排除に重要である可能性を報告してきた (石渡、名和 2002)。加えてシアロムチン (糖鎖末端にシアル酸をもつムチン

ン)の小腸における発現とNbの寄生部位の観察からマウス小腸におけるNbの定着と排除がシアロムチンを介して以下のように起こることが考えられた。1)Nbは小腸絨毛基部で局所的に極微量分泌されるシアロムチンを認識して定着する。2)Th2免疫応答によってシアロムチンの産生が亢進する。3)多量のシアロムチンが絨毛間から腸管腔へも分布する。4)Nbは絨毛上部あるいは管腔のシアロムチンと結合する機会が増える。5)Nbはシアロムチンに結合したまま腸管腔を流され、排除されてしまう。

腸管からの排除は寄生線虫の殺滅を伴わない(Ishiwata and Watanabe, 2006, 2007)。したがって、シアロムチンの認識・定着とその産生亢進による腸管からの排除は理に適っている。またNbによるシアロムチンの認識・定着は、Nbにシアロムチンあるいはシアル酸に対するリガンドあるいはセンサーの存在を仮定すると理解しやすい。

2. 研究の目的

腸管寄生線虫の *N. brasiliensis* に発現するシアロムチンあるいはシアル酸等に対するリガンドを同定することで、寄生虫の定着と排除を理解する。

3. 研究の方法

(1)腸管から排除される虫体表面に存在する宿主因子の検出

感染マウスより回収したNbを2% CHAPS/10 mM Tris-HCl (pH 7.0)/Protease Inhibitor Cocktail (P8340, Sigma)で処理し、虫体表面に存在/結合したタンパクを1次元および2次元電気泳動で展開した；等電点はIPG-strip pH 3-11(non-linear)。

(2)シアロムチンに対するセンサー探索

0.3% Bacto™ agar (寒天)/phosphate buffered saline (PBS)を入れたシャーレの中央にNbをのせた後、マウスの腸管粘液をシャーレの辺縁あるいは中央にのせて、Nbの動きを観察した。培養は37°C、5% CO₂で行った。

(3)小動物用内視鏡による寄生動態の観察

TESALAのAVS細径内視鏡システムおよび本学高次元医用画像医学研究所の鈴木直樹教授によって開発された内視鏡によって、小腸に移植したNbの定着から排除の様子を観察した。

(4)粘液の糖鎖解析

マウスへNbを感染させ9日目の腸管より1% TritonX-100/PBSにて粘液を回収した。対照として非感染マウスの粘液を採った。これらの粘液に対して、レクチンアレイと質量分析による解析を行った。

レクチンアレイ：両粘液中のタンパクを蛍光標識した後、予め45種類のレクチンを結合させたチップに反応させ、レクチンへの結合性を蛍光量で評価することで糖鎖の発現率の大小を比較した。

質量分析：ムチンのほとんどがO-グリコシド結合型糖鎖であることから、粘液をヒドラジン分解してO-型糖鎖をタンパクより切り出し、糖に特異的に結合するBlotGlyco®beadsを作用させて精製した後に蛍光標識して、MALDI-TOF-MSで解析、GlycoMod Toolを使用して糖鎖の一次構造を推定した。

4. 研究成果

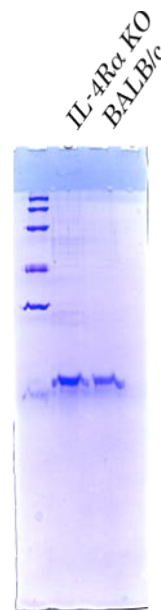
(1)腸管から排除される虫体表面に存在する宿主因子の検出

虫体表面に存在する分子に結合する宿主由来物質を同定することで、寄生虫の定着・排除を規定する寄生虫側の分子(リガンド)を同定可能と考えた。感染マウスより回収したNbの表面タンパクを界面活性剤であるCHAPSを含んだ溶液で処理することで回収し、排除される虫体と排除されない虫体とで比較し、排除される虫体のみ認められる分子の性状を明らかにすることを試みた。

インターロイキン4受容体を構成する α 鎖を遺伝的に欠失した(IL-4R α ノックアウト)マウスは、Th2免疫応答を誘導できず、腸管に寄生する線虫を排除できない。このマウスに感染させたNbと野生型マウス(ノックアウトマウスを作出した元のマウス；Th2免疫応答を誘導して寄生線虫を排除できる)から排除される直前のNbの表面に存在するタンパクを比較した。

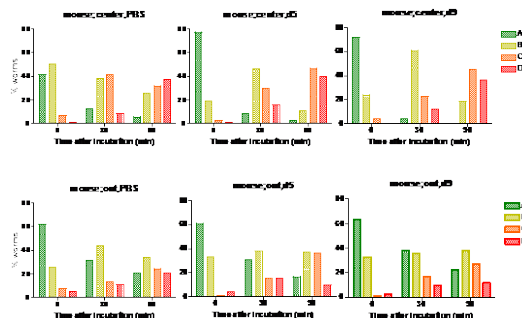
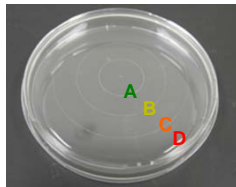
1次元および2次元で展開しても両虫体に明瞭なスポットの差が認められなかった(左図；SDS-PAGE後、CBB染色)。

この結果は、虫体表面に結合性を持つマウス由来タンパクは排除に関与しないことを示唆する。しかしながら、虫体に摂取された分子が排除に関わっている可能性もある。この場合、定着と排除は別々の機序によることになる。



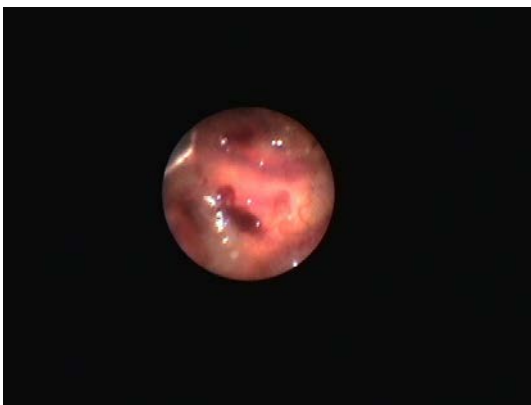
(2) シアロムチンに対するセンサー探索

N. brasiliensis にシアル酸を認識するセンサーが存在する可能性を考え、シアロムチンを含む粘液（感染後9日目のマウス腸管粘液）に対する化学走性を調べた。対照として、感染5日目の腸管粘液をおいた。シアロムチンに対する走化性はとくに認めず、粘液に対する負の走化性を認めた（下図；シャーレ中心部よりA、B、C、Dに分布するNbの数をグラフにした）。



(3) 小動物用内視鏡による寄生動態の観察

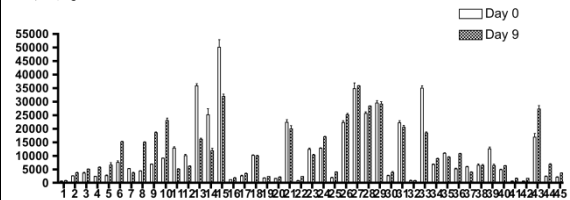
腸管寄生の線虫が腸管腔でどのように定着し排除されるかを、短時間で定着/排除する実験系で観察した。TESALAのAVS細径内視鏡システムはマウスの小腸に入れるには大きく、ラットでの観察となった（下図；右にNb）が、細径のため画質解像度が悪く観察に耐えなかった。鈴木教授による内視鏡は、マウス小腸において観察できた。内視鏡による腸管腔の観察には、腔内に空気を入れる必要がある。空気を入れた状態での定着/排除の観察は困難で、経時的な記録には至っていないが、前処理した虫体の定着過程を観察できる等有用な方法のため、引き続き検討中である。



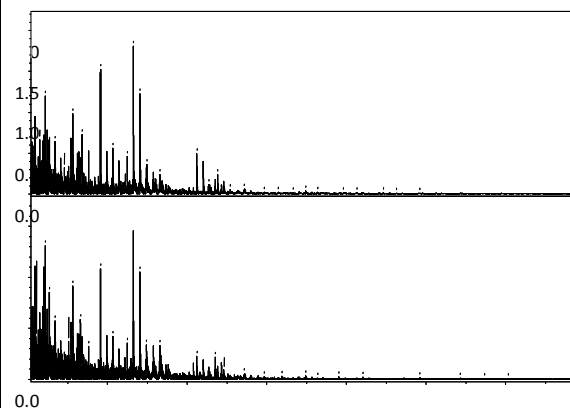
(4) 粘液の糖鎖解析

Th2免疫応答によって誘導される腸管粘膜上皮の変化が核酸レベルで検索され、いくつかのペプチドが寄生虫の排除に関与することを示す報告がなされてきている。しかしながら最近、糖タンパクの糖の部分が分子の認識、細胞の接着などに関与することが明らかになりつつある。腸管粘液の主成分であるムチンは高分子よりなる糖タンパクであり、このムチンの糖鎖変化が寄生虫の定着/排除に関与する可能性が考えられる。シアル酸は糖である。近年、糖の解析が比較的容易となった。データベースをもとに質量分析が可能となってきた。そこで、寄生線虫の排除期のムチンの糖鎖構成を通常のムチンのそれと比較した。

レクチンアレイでは、排除時に非感染時の2倍以上の高値を示したレクチンは12種類、逆に非感染時の1/2以下を示したのは3種類であった（下図；45種のレクチン（横軸）に結合したサンプル中の糖タンパクの相対量（縦軸））。



質量分析による解析では、排除時に非感染時の2倍以上の高値を示した分子は6、非感染時の1/2以下を示した分子は10あった（下図；横軸は相対分子量、縦軸は相対量）。



レクチンアレイと質量分析の傾向が一致したのは、排除時のDeoxyhexose(フコース)およびフコースとHexosamine、N-AcetylhexosamineあるいはN-Acetylneuraminic acid(シアル酸)などよりなる糖鎖の増加であった。アレイではシアル酸の発現増強が認められたが、質量分析結果では明らかな増加は認められなかった。

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6件)

- ①石渡賢治、渡辺直熙. T細胞のサブセットへの分化・機能発現とサイトカイン、臨床免疫・アレルギー科、査読無、Vol. 54、(増刊；サイトカインのすべて)、印刷中
- ②Takeshi Wada, Kenji Ishiwata, Haruhiko Koseki, Tomoyuki Ishikura, Tsukasa Ugajin, Naotsugu Ohnuma, Kazushige Obata, Ryosuke Ishikawa, Soichiro Yoshikawa, Kaori Mukai, Yohei Kawano, Yoshiyuki Minegishi, Hiroo Yokozeki, Naohiro Watanabe, and Hajime Karasuyama. Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. J. Clin. Invest. 査読有, 120; 2010, 2867-2875
- ③Kenji Ishiwata, Naohiro Watanabe, Miao Guo, Kei Tomihara, Michael J. Brumlik, Hideo Yagita, Drew Pardoll, Lieping Chen, and Tahiro Shin. Costimulator B7-DC attenuates strong Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis*. J. Immunol. 査読有, 184; 2010, 2086-2094
- ④石渡賢治. 消化管寄生線虫の小腸上部への寄生、実験医学、査読無、Vol. 27、No. 10 (増刊；感染症のサイエンス)、2009、pp. 1606-1612
- ⑤ Kohhei Tetsutani, Kenji Ishiwata, Hidekazu Ishida, Liping Tu, Motomi Torii, Shinjiro Hamano, Kunisuke Himeno, and Hajime Hisaeda. Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppress anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg in mice. Eur. J. Immunol. 査読有, 39; 2009, 2822-2830
- ⑥ Kohhei Tetsutani, Kenji Ishiwata, Motomi Torii, Shinjiro Hamano, Hajime Hisaeda, and Kunisuke Himeno. Short Report: Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* modulates murine host response against *Plasmodium berghei* ANKA infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 査読有, 79; 2008, 819-822

[学会発表] (計16件)

- ① 石渡賢治. 消化管寄生線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* 感染に対する所属リンパ節樹状細胞応答解析とその展開. 第4回蠕虫研究会、2010年11月27日、宮崎

- ②石渡賢治、三浦隆介、渡辺直熙. 消化管寄生線虫感染における腸間膜リンパ節の抗原提示細胞応答. 第127回成医学会、2010年10月8日、東京都
- ③石渡賢治. *Nippostrongylus brasiliensis* 感染が誘導するTh2 応答の補助刺激分子B7-DCによる減衰. 第70回日本寄生虫学会東日本支部大会、2010年10月2日、栃木
- ④石渡賢治、渡辺直熙. *Nippostrongylus brasiliensis* 感染に対するマウス腸管の適応免疫応答の腸間膜リンパ節における解析. 第79回日本寄生虫学会大会. 2010年5月20日、旭川市
- ⑤ 石渡賢治. 消化管寄生線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* 感染におけるマウス初期免疫応答; 腸間膜リンパ節細胞の解析. 第3回蠕虫研究会、2009年11月14日、宮崎
- ⑥石渡賢治、渡辺直熙. 消化管寄生線虫感染における樹状細胞の解析; IL-4の影響. 第8回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム、2009年10月10日、大阪府
- ⑦石渡賢治. *Nippostrongylus brasiliensis* の宿主腸管粘液成分に対する走性. 第2回蠕虫研究会. 2008年11月8日、宮崎
- ⑧石渡賢治、渡辺直熙. *Nippostrongylus brasiliensis* の宿主腸管粘液に対する走性. 第68回日本寄生虫学会東日本支部大会、2008年10月4日、浜松市
- ⑨石渡賢治、近藤遥子、高橋梓、猪爪知奈、松岡諒、渡辺直熙. *in vitro*系を用いた消化管寄生線虫に対する宿主消化管粘液の作用解析. 第125回成医学会総会、2008年10月9日、東京都
- ⑩石渡賢治、渡辺直熙. $\alpha 2$ アドレナリン受容体作働薬を用いたマウス小腸からの *Nippostrongylus brasiliensis* 排除の動態解析. 第77回日本寄生虫学会大会、2008年4月4日、長崎

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.jikei.ac.jp/academic/course/12_netutai.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石渡 賢治 (ISHIWATA KENJI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00241307