

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790321  
 研究課題名 (和文) 新規治療薬開発に向けたエキノコックス増殖関連遺伝子群の  
 プロファイリングと機能解析  
 研究課題名 (英文) Studies on molecular factors responsible for active growth of  
*Echinococcus multilocularis* metacestodes

研究代表者  
 松本 淳 (MATSUMOTO JUN)  
 日本大学生物資源科学部・講師  
 研究者番号：70296169

研究成果の概要 (和文)：本研究では、エキノコックスの発育増殖に関わる虫体および宿主双方の分子機構の解明を目的とした。虫体から全長 cDNA のライブラリーを構築し、その構成遺伝子群を解析した。得られた情報から、虫体の発育増殖に関わる遺伝子群の発現解析を進めている。一方、各種近交系マウスへの感染実験で、宿主体内での虫体発育が顕著に異なる 2 系統を明らかにした。これをもとに、虫体の発育増殖に関わる宿主側の責任遺伝子の同定につなげた。

研究成果の概要 (英文)： This study aims to elucidate molecular factors responsible for the active growth of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. We established a full-length cDNA library of the parasite by V-capping method. *In silico* analyses of this cDNA library containing over 20,000 clones revealed expression profile in the larval parasite. We are presently developing a *E. multilocularis* DNA microarray, which is expected to facilitate comprehensive expression analyses of the parasite. Experimental infections of larval *E. multilocularis* to 4 inbred mouse strains identified DBA/2 and C57BL/10 strains as highly susceptible and resistant strains, respectively. Based on these findings in this study, we are performing further genetic experiments using backcrossing mice with various genetic backgrounds originated from the resistant and susceptible mouse strains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 獣医寄生虫学

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： 人獣共通寄生虫、エキノコックス

## 1. 研究開始当初の背景

エキノコックス症は、世界的規模で深刻な被害をもたらしている人獣共通寄生虫症で、わが国でも北海道全域に高度な流行が見られる。本症は、致死的な疾病であるにも関わらず、これを根治できる治療薬は未開発である。病原寄生虫は、エキノコックスと呼ばれるサナダムシの1種である。成虫期のエキノコックスは、終宿主であるイヌ科動物の腸管内に寄生して虫卵を産出する。この虫卵を、自然界の中間宿主であるげっ歯類が摂取することにより、幼虫期のエキノコックスに感染する。この感染中間宿主を終宿主が捕食することにより成虫期エキノコックスに感染し、エキノコックスの生活環が完結する。

幼虫期エキノコックスは、人体内で主に肝臓に寄生するが、その増殖の様子は悪性腫瘍と似ている。すなわち、虫体を構成する未分化の胚芽細胞は、宿主体内で無性的に増殖し、嚢胞を形成しながら肝臓組織内に浸潤する。他臓器への転移も頻発し、最終的には寄生臓器の機能不全により患者を死に至らしめる。従って、エキノコックスの増殖機構はエキノコックス症の病態形成と密接な関わりがあり、その急所を明らかにすることが、有効な治療薬開発にとって不可欠である。

近年、エキノコックスの増殖関連因子についての実験的解析手法が急速に改良され、その成果も着実に蓄積されている (Brehm, 2010)。しかしながら、エキノコックスの増殖特性について分子レベルに踏み込んだ解析は近年始まったばかりであり、これまでに得られた知見は限られている。従って、エキノコックス増殖の急所を浮き彫りにするためには、関連因子群の全体像およびそれら因子の相互作用をさらに明らかにする必要がある。

一方、エキノコックスの発現遺伝子に関する情報も、着実に蓄積されている。特に、エキノコックスの全長 cDNA ライブラリーを基盤とする発現遺伝子群のデータベースが近年公開されたことにより、虫体の遺伝子発現プロファイルに関する情報が大幅に増大した。また、欧州の研究者が中心となってエキノコックスのゲノムプロジェクトが進展しており、入手可能な情報は急増すると考えられる。

宿主側の要因もエキノコックスの増殖活性に影響することが知られている。ヒトは、幼虫期エキノコックスにとって好適な宿主ではないが、感受性の高い遺伝的背景をもつ患者体内で虫体が活発に増殖してエキノコ

ックス症の発症に至ると推測されている。このように、幼虫期エキノコックスの発育には宿主の遺伝的背景が関与することを示唆する知見が得られているものの、重要な役割を担う具体的な因子については明らかにされておらず、解明すべき課題が多く残されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的の1つは、エキノコックス症の病原因子としての虫体発育および増殖に関わる虫体由来因子を明らかにすることである。宿主であるヒトや動物には存在しない、エキノコックス特有の増殖機構を分子レベルで明らかにすることにより、有効かつ副作用のない安全なエキノコックス症治療薬の創薬のための標的分子候補を選出する。

本研究のもう1つの目的は、宿主体内におけるエキノコックスの定着、増殖および発育に関わる宿主側の因子を遺伝学的手法により明らかにすることである。この結果に基づき、エキノコックス感染に対して高い感受性を示す遺伝的ハイリスクグループの特定法の確立につなげ、効果的なエキノコックス症コントロール対策の実施に寄与することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) エキノコックスの発現遺伝子群の解析と DNA マイクロアレイ作製

幼虫期および成虫期のエキノコックス虫体が発現する遺伝子群の塩基配列を決定するために、それぞれの虫体由来の遺伝子全長をコードする cDNA ライブラリーを作製した。幼虫期虫体は、虫卵の経口投与により人工感染させたコトンラットから採取した原頭節を含む成熟虫体を使用した。一方、成虫期虫体は、原頭節の経口投与により人工感染させた犬から採取した虫体を使用した。それぞれの虫体から mRNA を回収し、これをもとに V-capping 法により全長 cDNA ライブラリーを構築し、発現遺伝子の解析に供した。

### (2) 種々の近交系マウス体内における虫体増殖活性の比較解析

4 種類の近交系マウス (DBA/2、AKR/N、C57BL/6、C57BL/10) に対して、エキノコックス虫卵 200 個を経口投与することにより人工感染させ、宿主体内における虫体の定着と増殖を比較解析した。具体的には、虫体定着の評価として、虫卵投与後 4 週目にマウスを剖検し、エキノコックスの寄生部位である肝臓に形成された虫体病変の総数をカウント

し、投与虫卵数に対する虫体定着率を算出した。続いて、虫卵投与後9週目および16週目にマウス肝臓に寄生する虫体を採取し、虫体増殖の指標として虫体総重量を計測するとともに、採取した虫体の一部を組織学的に観察して、原頭節の形成などの発育状態を確認した。

一方、宿主である感染マウス側のエキノコックス感染に対する応答の指標として、虫体由来可溶性粗抗原および種々の組み換え抗原に対する抗体応答の推移を観察した。使用した粗抗原は、幼虫期エキノコックス虫体の可溶性画分とした。一方、組み換え抗原は、エキノコックスが発現する主要な分子5種で、EM95、EMY162、II/3、14-3-3およびAgBとした。

#### 4. 研究成果

##### (1) エキノコックスの発現遺伝子群の解析とDNAマイクロアレイ作製

エキノコックス全長 cDNA ライブラリーに含まれる遺伝子の塩基配列を決定し、得られた塩基配列情報のコドン読み枠の確認、相同配列のクラスタリング、既存の遺伝子データベースとの相同性の確認、宿主由来遺伝子の除去を中心とする情報整理を実施した。最終的に、幼虫期および成虫期のエキノコックスから作製した cDNA ライブラリーが含むクローン総数は約 20,000 となったが、同一の遺伝子が重複しているものもあった。得られた遺伝子塩基配列情報をもとに、発現解析に供するためのDNAマイクロアレイの作製を現在進行中である。

一方、宿主体内における虫体の定着と発育に関わる具体的な因子として、テトラスパニンに着目して解析した。テトラスパニンは、多細胞生物に広く保存されており、細胞接着や発生、形態形成に関与する分子として注目されている。エキノコックス cDNA ライブラリーから選出したテトラスパニン7種の組換えタンパクを作製し、そのワクチン効果を評価した。その結果、一部のテトラスパニンは、虫体の定着率を非免疫群の15%以下に抑える高い感染防御効果を示した。この結果から、一部のテトラスパニン分子種が、宿主体内におけるエキノコックスの定着と増殖において重要な機能を担っていることが示唆された。

##### (2) 種々の近交系マウス体内における虫体増殖活性の比較解析

感染実験の結果、4種の近交系マウス体内における幼虫期エキノコックスの定着および発育態度は著しく異なることが明らかと

なった。虫卵投与後4週目の評価では、DBA/2マウス体内では200個投与した虫卵のうち平均142.0(定着率71.0%)が宿主肝臓に定着したのに対して、AKR/Nマウス、C57BL/6マウスおよびC57BL/10マウス体内における平均定着虫体数は、それぞれ90.2(同45.7%)、39.3(同19.7%)、63.2(同61.6%)となった。

宿主体内における虫体増殖の指標として、寄生臓器である肝臓を含む虫体総重量の経時変化を観察した結果、いずれのマウス体内においても虫体重量は虫卵投与後16週目まで増加し続け、4系統のマウス間で有意な差は認められなかった。しかしながら、虫体の発育状況を組織学的に観察した結果、明らかな違いが観察された。DBA/2マウス体内では虫体の発育が最も早く、虫卵投与後16週目の観察では虫体内に多数の原頭節形成が認められた。この所見は、宿主体内における虫体発育が完了したことを意味している(図1A)。一方、AKR/Nマウス体内では、

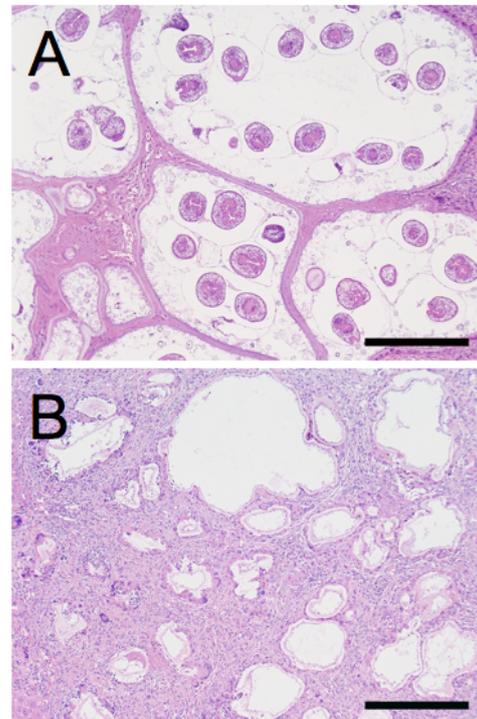


図1. 虫卵投与後16週目のDBA/2マウス(A)およびC57BL/10マウス(B)肝臓に寄生した幼虫期エキノコックス

原頭節の形成が認められたものの、いずれも未熟な状態であった。また、C57BL/6マウスおよびC57BL/10マウス体内においては、虫体内には原頭節形成がまったく認められなかった(図1B)。

エキノコックス感染に対する宿主応答の指標として、虫体由来可溶性粗抗原および種々の組み換え抗原に対する抗体価の推移

を観察した。その結果、虫体由来可溶性粗抗原に対する抗体価の推移には、4つの近交系マウス間に顕著な差は認められず、いずれも虫卵投与後9週目から明らかな抗体価の上昇が観察された。一方、組み換え抗原 EM95、EMY162、II/3、14-3-3 および AgB に対する抗体応答には、系統間で明らかな違いが見られた。特に、エキノコックス感染に対して高感受性を示す DBA/2 マウスは、EM95、EMY162、II/3 および AgB に対して顕著な IgG 産生と、同分子に対する IgM 低応答を示した。マウス系統間で観察された抗体応答の差異と、宿主体内における虫体発育との関連は不明であるが、エキノコックス症における分子レベルでの宿主-寄生体相互作用の一端を示す所見として興味深い。

以上のように、虫卵投与により人工感染させた4種の近交系マウス体内におけるエキノコックスの定着および発育は明らかに異なっていた。この結果から、宿主側の何らかの因子がエキノコックスの定着と発育に関与していることが示された。その宿主側因子の同定に向けて、現在 DBA/2 マウスおよび C57BL/10 マウスの交配により作製した F1 と、この F1 と DBA/2 の戻し交配により作製したバッククロスマウスに対して感染実験を実施し、宿主体内における虫体の定着・増殖を指標とする QTL 解析により、虫体の定着と発育に関わる責任遺伝子群の同定を進めている。ヒトの場合も、エキノコックス感染に対する抵抗性と感受性は遺伝的背景により大きく異なっていることが知られているが、抵抗性と感受性を左右する具体的な要因については未同定である。マウスモデルを使った遺伝学的解析を進めることにより、エキノコックス感染に対して高感受性を示すハイリスクグループの特定法の開発や、これに基づく効果的な疾病予防法の確立につなげたい。

## 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4件)

① Kouguchi, H., Matsumoto, J., Katoh, Y., Suzuki, T., Oku, Y., and Yagi, K. (2010): *Echinococcus multilocularis*: Two-dimensional Western blotting method for the identification and expression analysis of immunogenic proteins in infected dogs. *Experimental Parasitology* 124(2):238-243.

② Dang, Z., Yagi, K., Oku, Y., Kouguchi, H., Kajino, K., Watanabe, J., Matsumoto, J., Nakao, R., Wakaguri, H., Toyoda, A.,

and Sugimoto, C. (2009): Evaluation of *Echinococcus multilocularis* tetraspanins as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis. *Vaccine* 27(52):7339-7345.

③ Dang, Z., Watanabe, J., Kajino, K., Oku, Y., Matsumoto, J., Yagi, K., Kouguchi, H., and Sugimoto, C. (2009): Molecular cloning and characterization of a T24-like protein in *Echinococcus multilocularis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 168(1):117-119.

④ Bhutto, A. M., Soomro, F. R., Baloch, J. H., Matsumoto, J., Uezato, H., Hashiguchi, Y., and Katakura, K. (2009): Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) major* infection in Sindh province, Pakistan. *Acta Tropica* 111(3):295-298.

[学会発表] (計1件)

① 平松 滯、水上智秋、松本 淳、野中成晃、片倉 賢、李 爽、山下理宇、渡辺純一、奥祐三郎 (2009. 3) : 多包虫の cDNA ライブラリーに見られた抗酸化活性関連遺伝子. 第78回日本寄生虫学会大会、88、東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 淳 (MATSUMOTO JUN)  
日本大学生物資源科学部・講師  
研究者番号 : 70296169