

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15656

研究課題名(和文) ネットアイシマカ新規自然免疫分子LRIM18による犬糸状虫排除応答の遺伝学的解明

研究課題名(英文) Phenotypic analysis of *Dirofilaria immitis* infection in LRIM18-knockout *Aedes aegypti*

研究代表者

白水 貴大 (Shirozu, Takahiro)

藤田医科大学・病態モデル先端医学研究センター・助教

研究者番号：80804608

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)：本研究では、RNAiスクリーニング解析で選定された自然免疫分子LRIM18について、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集によりノックアウト(KO)した蚊を作製し、犬糸状虫感染表現型解析を行うことで、蚊の宿主応答におけるLRIM18の機能を解明することを目的とした。KOホモ型と野生型間で比較した結果、犬糸状虫感受性系統ではKOにより感染11、13日後の頭胸部における感染期幼虫数が減少し、腹部における未発達な幼虫数が増加する傾向がみられた。RNA-seq解析の結果、KOマルピーギ管では免疫系遺伝子の発現増加がみられた。したがって、蚊のLRIM18のKOは犬糸状虫媒介能を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蚊媒介感染症であるフィラリア症は「顧みられない熱帯病」の一つで、開発途上国を中心に蔓延しており、世界の感染者数は約5000万人以上とされる。また、犬のフィラリア(犬糸状虫)症は致死に至ることもあり、獣医学領域においても対策が必要な感染症である。致死性の高いマラリア、デング熱などと比べて、開発途上国やペットで問題となるフィラリア症に関する研究進展状況は芳しくない。犬糸状虫とネットアイシマカをフィラリア感染モデルとした本研究で、LRIM18のKOにより蚊の犬糸状虫媒介能が抑制されることが示唆された。本研究成果は、フィラリアを媒介しない蚊の作出による感染症制御に向けた学術基盤になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Susceptible (S) and resistance (R) strains to *Dirofilaria immitis* infection were identified in *Aedes aegypti* Liverpool strain. RNA-seq and RNAi screening analysis showed that Leucine-rich immune protein (LRIM) 18 was identified as a target gene related to vectorial capacity for *D. immitis* in mosquitoes. In this study, LRIM18 knockout (KO) mosquitoes were generated by genome editing using CRISPR/Cas9 and we analyzed *D. immitis* infection phenotype to elucidate the function of LRIM18 in the host response. Comparative analysis between KO and wild type in S showed that the number of infective third-stage larvae was significantly low in the head and thorax in KO-S. Moreover, the number of undeveloped larvae was significantly high in the abdomen in KO-S. RNA-seq analysis showed the immune system-related genes expression increased in the Malpighian tubules in KO-S. In summary, our findings suggests that KO of LRIM18 in mosquitoes may contribute to the control of *D. immitis*.

研究分野：寄生虫学

キーワード：ネットアイシマカ 犬糸状虫 ゲノム編集 ベクターコントロール 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

蚊は病原体の媒介者として人類に最も脅威を与えている生物である。蚊媒介性感染症の制御には従来、殺虫剤の噴霧等による予防策が主に行われてきた。しかしながら、環境や人体への悪影響、殺虫剤耐性蚊の出現などの諸問題から、全く新たな概念に基づく感染症制御法の開発が望まれている。このような背景から近年、遺伝子組換えの応用による「病原体を媒介しない蚊」を用いた感染症制御法が着目されている。ゲノム編集技術の進歩により、非モデル生物の蚊においても組換え体の作製が比較的容易になった。さらに、**CRISPR/Cas9**を用いたジーンドライブ技術の開発により、自然界での遺伝子改変動物の優占種化も実現可能となった。したがって、蚊の媒介制御メカニズムにおける責任遺伝子が同定されれば、特定の病原体を媒介しない蚊の作出による感染症制御は科学的に実現できる状況である。

蚊媒介性感染症のうち、マラリア、デング熱などのヒト致死性の感染症では、蚊の媒介制御遺伝子についての研究が進んでいる。その一方で、開発途上国やペットで問題となる感染症についての研究進展状況は芳しくない。その内の一つとしてフィラリア症があげられる。フィラリア症は、「顧みられない熱帯病」の一つに含まれ、開発途上国を中心に未だ蔓延している蚊媒介性の寄生虫感染症である。その中で、犬糸状虫症はイヌ致死性の感染症であり、獣医学領域において最も対策が必要な感染症である。また、犬糸状虫症は人獣共通感染症としての認知度も高まってきており、公衆衛生上も見逃すことができない。イベルメクチンの開発により本症の予防は可能になったが、野生動物を含む全ての終宿主動物への投与は困難であり、未だ先進国を含む世界中で蔓延し続けている。さらに近年、予防薬への耐性犬糸状虫の出現も問題視されている。したがって、予防薬に頼らない新たな犬糸状虫症への対策法が必要とされている現状である。

申請者は、ネッタイシマカと犬糸状虫を蚊のフィラリア感染モデルとした研究において、遺伝的背景の近いネッタイシマカ **Liverpool** 系統の中から感受性および抵抗性表現型を示す系統の同定に成功した。さらに、**RNA-seq** データに基づいた **RNAi** スクリーニング解析により、媒介能に関連するターゲット遺伝子として新規自然免疫分子 **Leucine-rich immune protein (LRIM) 18** の同定に成功した。そこで本研究では、犬糸状虫に感染した蚊の宿主応答における **LRIM18** の機能を詳細に解析することで、蚊のフィラリア媒介メカニズムの一端の解明を目指す。**LRIM18** の機能解明により、フィラリアを媒介しない蚊の作出による感染症の制御法の開発に向けた学術基盤形成への貢献が期待される。

2. 研究の目的

フィラリア症に対する予防薬・治療薬に関する研究は進んでいる一方で、蚊がフィラリアを媒介することに関する詳細な分子メカニズムについては不明な点が多い。申請者は、犬糸状虫感染感受性(**Susceptible: S**)系統および抵抗性(**Resistance: R**)系統を用いた研究から、媒介能に関連するターゲット遺伝子として **LRIM18** を同定した。そこで本研究では、ゲノム編集技術を用いて **LRIM18** ノックアウト(**KO**)蚊を作製後、野生型系統と犬糸状虫感染表現型の比較解析を行うことで、蚊の宿主応答における **LRIM18** の機能を解明することを目指した。

3. 研究の方法

実験 **CRISPR/Cas9** によるゲノム編集技術を用いた **LRIM18** ノックアウト(**KO**)蚊の作製

組換え箇所の一部の配列と相同な配列情報を持つガイド **RNA** と **Cas9** スクレアーゼタンパク質の混合液を **S** 系統、**R** 系統それぞれの卵へマイクロインジェクションした。羽化後、蚊の後肢を個体別にサンプリングした。蚊は個体別にトレースできるように一時、保管した。後肢から **DNA** を抽出後、ジェノタイプング **PCR** 解析に供し、**LRIM18** が **KO** されているかを確認した。**KO** 系統の樹立後、ヘテロ同士の交配を行った。再度、蚊の後肢由来 **DNA** を用いたジェノタイプング **PCR** を行い、ホモ個体を選別した。ホモ個体の雌雄を交配させて得られた蚊集団を犬糸状虫感染表現型の解析に供した。

実験 **LRIM18 KO** と野生型群間の犬糸状虫感染表現型の比較解析

ミクロフィラリア(**mf**)感染血液を **6 mf/μl** の濃度に調整し、遮光下で **KO** および野生型(**WT**)の蚊にそれぞれ吸血させた。二酸化炭素による麻酔台で飽血蚊のみを選別し、感染実験を開始した。感染 **13** 日後を目安に感染期幼虫(**L3**)が蚊の頭胸部に出現し始める。吸血 **13** 日後までの蚊の生存率および各感染部位におけるステージ別(**mf**, **L1**, **L2**, **L3**)の感染数を指標に犬糸状虫感染表現型を解析した。**L3** については哺乳動物への感染能を評価するために、**in vitro** の **L4** への脱皮アッセイを行った。また、**KO** による宿主応答への影響を分子レベルで解析するために、感染 **3** 日後のマルピーギ管組織をサンプリングし、**RNA** を抽出後、**RNA-seq** 解析に供した。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の結果、**S** 系統、**R** 系統それぞれにおいて **LRIM18** ノックアウト(**KO**)系統の作製に成功した。シーケンス解析の結果、それぞれエクソン **4** のオープンリーディングフレーム上の領域が欠損されており、**S** 系統では **281** 塩基、**R** 系統では **250** 塩基の配

列の欠損が確認された。

S 系統において、**KO** と **WT** 間における犬糸状虫感染表現型の比較解析を行った。蚊の生存率に有意差はみられなかった。感染 13 日後の頭胸部における **L3** 数については、**WT** と比べて **KO** で減少する傾向がみられた(図 1)。そこで、**L3** が頭胸部に移行する前の段階に着目し、腹部における **L3** または **L1** ~ **L2** の感染数を解析した。その結果、**KO** の腹部における **L3** および **L1** ~ **L2** 数はともに **WT** より有意に高いことが示された(図 2, 3)。さらに詳細に解析した結果、感染 11 日後の時点で、**KO** の頭胸部における **L3** 数が減少する傾向が示された(図 4)。**L1**、**L2**、**L3** の総感染数に有意差はみられなかった。頭胸部 **L3** 数を総感染数で割った **L3** の頭胸部移行率は、**WT** 比べて **KO** で有意に低いことが示された(図 5)。これらの結果から、**S** 系統では **LRIM18** の **KO** により、腹部において未発達な幼虫の割合が増加し、その結果として頭胸部へ移行する **L3** 数が減少することが示唆された。**S** 系統由来 **L3** を用いた *in vitro* での **L4** への脱皮アッセイを行った結果、**LRIM18** の **KO** で脱皮率が低下する傾向がみられた(図 6)。したがって、**S** 系統では **LRIM18** の **KO** により、正常な **L3** への発育が抑制され、媒介能が低下する可能性が示唆された。

次に **R** 系統について、**KO** と **WT** 間における犬糸状虫感染表現型の比較解析を行った。その結果、**KO** で感染後の蚊の生存率が低下する傾向がみられた。感染 13 日後の **mf** 数は **KO** で増減する結果となり、再現性はみられなかった。また、感染後 13 日以降の 18、20 日で頭胸部を解剖したが、**L3** は検出されず、抵抗性表現型を維持していた。したがって、**R** 系統では **LRIM18** の **KO** により、犬糸状虫を排除する能力に影響はないものの、感染後の体を守る能力に影響を与える可能性が考えられ、その結果、感染後の蚊の生存率が下がることが示唆された。

LRIM18-KO が犬糸状虫の発育抑制、感染 **L3** 数の減少をもたらす関係性を分子レベルで解析するために、**S** 系統において **KO** と **WT** それぞれの感染 3 日後のマルピーギ管由来 **RNA** を用いて **RNA-seq** 解析を行った。その結果、まず、**KO** において **LRIM18** の発現を示す **Transcripts per million(TPM)** 値は 0 であり、発現欠損が確認された。また **WT** と比べて **KO** では、一部の抗菌ペプチド(**antimicrobial peptides: AMPs**)遺伝子(**Effector-A, B, C, D**)の **TPM** 値が約 2.3 ~ 17.7 倍増加していた。したがって、これらの **AMPs** の発現増加と **KO** における正常な **L3** 数の減少との相関性が示唆された。一方で、一部の **Toll** 経路に関連する遺伝子(**Adaptor-A, B**)の **TPM** 値は約 6.2 ~ 34.2 倍の減少がみられた。**DAVID** の解析ツールを用いて **KEGG pathway** 解析した結果、**KO** で発現増加傾向がみられるシグナル経路として **Lysosome, Neuroactive ligand-receptor interaction, Hippo signaling pathway-fly, Notch signaling pathway, TGF-beta signaling pathway** などが、発現減少傾向がみられるシグナル経路として **Toll and Imd signaling pathway, Circadian rhythm-fly, Glycerophospholipid metabolism, Wnt signaling pathway, Mitophagy-animal** などがそれぞれ示された。発現増加グループに含まれる **Lysosome** は貪食された病原体や異物の分解にも関わる細胞内小器官であり、蚊の犬糸状虫の排除メカニズムにおいても重要な役割を担う可能性が示唆された。

本研究期間中において、犬糸状虫感染後のネッタシマカに対してターゲット遺伝子の特定領域と相同な二本鎖 **RNA** のインジェクションによる **RNA** 干渉を用いた **Cactus** 遺伝子のノックダウン(**KD**) 実験を行い、**Toll** 経路を活性化させた研究論文が報告された(**Edgerton EB et al., 2020**)。その論文では、**Cactus** の **KD** によりマルピーギ管組織における未発達な幼虫数の増加および感染 **L3** 数の有意な減少がみられることが示された。そこで、この先行研究の結果と本研究の **LRIM18** の **KO** による **L3** 数抑制との相関性を調べる目的で、**Cactus** を **KD** した **S** 系統の感染 3 日後のマルピーギ管由来 **RNA** の **RNA-seq** 解析を行った。コントロールとして **GFP** と相同性を持つ二本鎖 **RNA** をインジェクションした蚊と比較した結果、**Cactus** の **KD** 蚊においても同様に上記の **AMPs** の **TPM** 値が上昇していた。**LRIM18** を **KO** した **S** 系統で 34.2 倍の **TPM** 値の減少がみられた **Toll** 経路関連遺伝子(**Adaptor-A**)は、**Cactus** を **KD** した **S** 系統では 64.1 倍増加していた。**KEGG pathway** の結果においても、**LRIM18-KO-S** 系統の発現減少遺伝子グループとして **Toll and Imd signaling pathway** が含まれていた。したがって、**LRIM18-KO-S** 系統において **Toll** 経路の活性化をさらに図ることで、犬糸状虫媒介能の抑制効果が高まる可能性が考えられる。また **Cactus-KD-S** 系統では、**LRIM18** の **TPM** 値が約 4.4 倍減少していた。この結果により、ネッタシマカにおける **LRIM18** の発現抑制・欠損が感染犬糸状虫の発育抑制、**L3** 数の減少に寄与する可能性が改めて示唆された。

以上より、蚊の **LRIM18** の **KO** はフィラリア媒介制御に寄与する可能性が示唆された。今後、蚊における **LRIM18** やその他関連する免疫系遺伝子の機能、宿主応答におけるリソソーム活性の役割などをさらに詳細に解明することで、フィラリアを媒介しない蚊の作出による感染症制御に向けた応用研究がさらに発展することが期待される。

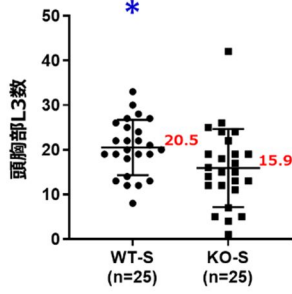


図1. 感染13日後のS系統における頭胸部L3数

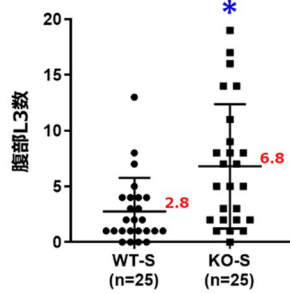


図2. 感染13日後のS系統における腹部L3数

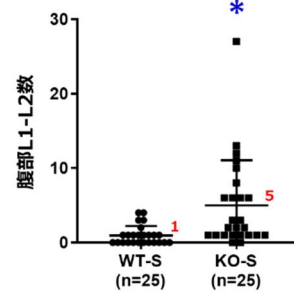


図3. 感染13日後のS系統における腹部L1-L2数

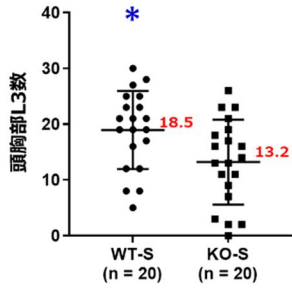


図4. 感染11日後のS系統における頭胸部L3数

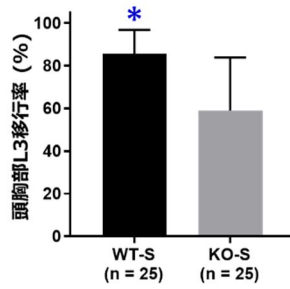


図5. S系統における頭胸部L3移行率

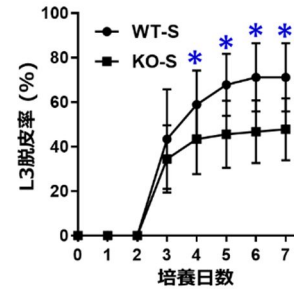


図6. S系統におけるin vitroでのL3脱皮率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahiro Shirozu, Nobuaki Seki, Akira Soga, Shinya Fukumoto	4. 巻 72-4
2. 論文標題 Evaluation of mosquitocidal efficacy of Scorpion Toxin Tf2 from Tityus fasciolatus against Anopheles stephensi mosquitoes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 255-259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7601/mez.72.255	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 Shirozu Takahiro, Soga Akira, Fukumoto Shinya	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification and validation of a commercial cryopreservation medium for the practical preservation of <i>Dirofilaria immitis</i> microfilaria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 383, 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13071-020-04257-1	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白水貴大, 曾賀晃, 池田奈央, 水関実法子, 白藤梨可, 暮地本宙己, 大手学, 嘉糠洋陸, 福本晋也
2. 発表標題 ネッタイシマカにおける共生細菌ボルバキアと犬糸状虫の共感染時の表現型
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白水 貴大, 福本 晋也
2. 発表標題 犬糸状虫感染ネッタイシマカのマルピーギ管組織培養によるex vivo実験系の構築
3. 学会等名 第67回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白水貴大, Manusvee Kaikuntod, Doolyawat Kladkempetch, Saruda Tiwananthagorn, 福本晋也
2. 発表標題 フィールド由来ネッタイシマカからの犬糸状虫感受性・抵抗性系統の遺伝学的分離法の確立
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白水貴大, 関信彰, 曾賀晃, 福本晋也
2. 発表標題 殺ハマダラカ活性を持つ生物由来毒素分子のスクリーニング
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白水貴大, Saruda Tiwananthagorn, Doolyawat Kladkempetch, Manusvee Kaikuntod, 福本晋也
2. 発表標題 タイ北部チェンマイ由来ネッタイシマカからの犬糸状虫感受性および抵抗性系統の作出
3. 学会等名 第73回日本衛生動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白水貴大, 曾賀晃, 森下雄貴, 関信彰, 纈纈摩美, 福本晋也
2. 発表標題 十勝地方生息エゾシカにおけるクリプトスポリジウムおよびプラストシスチス感染の疫学調査
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会 第32回日本臨床寄生虫学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白水 貴大, 佐久間 知佐子, 瀧澤 摩美, 嘉糠 洋陸, 福本 晋也
2. 発表標題 LRIM18欠損ネッタイシマカにおける感染犬糸状虫の第三期幼虫への発育抑制
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 白水 貴大, 佐久間 知佐子, 瀧澤 摩美, 嘉糠 洋陸, 福本 晋也
2. 発表標題 自然免疫分子LRIM18の遺伝子欠損ネッタイシマカにおける犬糸状虫感染表現型の解析
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 白水 貴大, 福本 晋也
2. 発表標題 市販細胞凍結保存培地による犬糸状虫ミクロフィラリア凍結保存
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 白水貴大, 曾賀晃, 白藤梨可, 暮地本宙己, 大手学, 嘉糠洋陸, 福本晋也
2. 発表標題 ボルバキア感染Aedes aegyptiにおけるDirofilaria immitis媒介能の解析
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 白水 貴大, 曾賀 晃, 瀧瀬 摩美, 福本 晋也
2. 発表標題 Dirofilaria immitis高媒介および非媒介性Aedes aegypti株の交雑後代における感染表現型解析
3. 学会等名 第72回日本衛生動物学会大会
4. 発表年 2020年～2021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