

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月16日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590464

研究課題名（和文）寄生虫由来の遺伝子組換え免疫抑制因子の作用と免疫抑制機序の研究

研究課題名（英文） A study of the effect of a recombinant immunosuppressive factor from parasites and immune-inhibitory mechanisms

研究代表者

福本 宗嗣 (FUKUMOTO SOJI)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：60111126

研究成果の概要（和文）：マンソン裂頭条虫幼虫由来の免疫抑制因子（ES90）の遺伝子をクローニングし、コムギ胚芽の無細胞系で組換えタンパク質を作成したが、マクロファージのNO産生の抑制作用は認められなかった。一方、旋毛虫感染マウスの腹腔マクロファージでは、FIZZ1, Ym1, arginase などの遺伝子発現が認められ、これに関連して2種類の Prx をクローニングした。Prx-1は発育ステージによって遺伝子発現に変化がみられた。

研究成果の概要（英文）：An immunosuppressive factor (ES90) from *Spirometra erinaceieuropaei* plerocercoids was cloned and the recombinant ES90 was synthesized using wheat germ cell free expression system. However, the recombinant ES90 did not inhibit nitric oxide production in macrophages. Messenger RNA of Ym1, FIZZ1, and arginase 1 were expressed in peritoneal macrophages from *Trichinella spiralis*-infected mice. In connection with this, 2 types of peroxiredoxin (Prx) from *T. spiralis* were cloned, Prx-1 mRNA expression was stage-specific.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
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：寄生虫、マンソン裂頭条虫、免疫抑制因子、マクロファージ、旋毛虫、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) マンソン裂頭条虫のプレロセルコイド（幼虫）は、ヒトやマウスに感染するとその腸壁を穿通して、腹腔内に侵入する。幼虫表

面では細菌由来のLPSで腹腔マクロファージなどが活性化すると考えられるが、虫体周囲の炎症反応は弱く、幼虫は長期間いろいろの組織で寄生を続けることが可能である。我々

は、この幼虫が免疫抑制因子を分泌しているのではないかと考え、本研究を開始した。そして、LPS 活性化マクロファージの遺伝子発現を抑制する 90 kDa の糖タンパク質 (ES90) を精製した。また、この ES90 が破骨細胞形成を抑制することを見だし、その N 末端と内部のアミノ酸配列の一部を決定した。

近年、寄生虫による免疫修飾が注目されるようになってきたが、蓄積されてきたデータでは、これらの免疫修飾因子は寄生蠕虫に共通ではなく、寄生虫ごとに進化の過程で獲得してきたと考えられる。マンソン裂頭条虫由来の免疫抑制因子は、未知の免疫抑制因子であり、宿主-寄生虫関係の免疫学的な解析だけでなく、新しい免疫抑制剤の開発につながる研究成果が期待された。

(2) 旋毛虫を含む蠕虫感染症において Th2 免疫応答が優位になることが知られている。Th2 サイトカインである IL-4 で刺激したマクロファージは、Ym1, FIZZ1, arginase 1 などの遺伝子を発現し Alternatively activated macrophage (AAMp) と称されている。AAMp は Th1 免疫応答を抑制する作用がある。旋毛虫感染マウスにおけるマクロファージの応答については、不明な点が多い。また、肝蛭の研究では、肝蛭由来の peroxiredoxin (PRX) がマクロファージの alternative activation を起こす作用があるとの報告があり、寄生虫因子が直接マクロファージの活性化の型を制御している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

(1) 免疫抑制因子 ES90 の全塩基配列の決定

本研究では、免疫抑制因子 ES90 の cDNA 断片を基にして、3' RACE 法および 5' RACE 法を用いて全長の cDNA を合成し、その塩基配列を決定する。また、ゲノム DNA についても解析する。

(2) リコンビナント免疫抑制因子 ES90 の作成と免疫抑制作用の検討

全長の cDNA を大腸菌または無細胞系を用いて遺伝子組み換えタンパクを作成し、その免疫抑制活性について検討する。まず、LPS または CpG 活性化 RAW264.7 細胞株と腹腔マクロファージの nitrite (NO) 産生と TNF- α , IL-1 β および MIP-2 や IP-10 などのケモカインの遺伝子発現抑制作用について検討する。

(3) マクロファージの alternative activation 誘導因子のクローニング

旋毛虫感染マウスの腹腔マクロファージを回収し、classical な活性化または alternative activation が起きていないか検討する。

今までに報告されている PRX の mRNA の塩基配列から、保存領域を検索し、プライマーを作成する。そして、マンソン裂頭条虫のプレロセルコイド (幼虫) や旋毛虫などから RNA を回収し、RT-PCR 法で cDNA を得、全長をクローニングする。そして、旋毛虫の各発育段階における PRX の遺伝子発現について比較し、alternative activation との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 免疫抑制因子 ES90 の主要な isoform の cDNA 断片を基にして、3' RACE 法および 5' RACE 法を用いて全長の cDNA を合成し、その塩基配列を決定する。この全長の cDNA と 2 種類の部分的に欠失させた cDNA を無細胞のコムギ胚芽蛋白合成系で遺伝子組換えタンパク質 (ES90) を合成するために、プラスミッド (pEU-E01-GST-TEV-MCS-N2) に組み、遺伝子組換え ES90 を合成する。

(2) マクロファージの培養液に遺伝子組換え ES90 を添加し、LPS 活性化マクロファージの一酸化窒素 (NO) 産生に対する作用を検討する。

(3) 旋毛虫感染マウスの腹腔マクロファージ数について検討するとともに、FIZZ, Ym1, arginase などの遺伝子発現について調べ、alternative activation が認められているか検討する。

(4) 旋毛虫の筋肉内幼虫の mRNA から cDNA を合成し、PCR 法で全長の PRX cDNA のクローニングを行う。また、PRX mRNA が旋毛虫の発育段階で変化するか RT-PCR 法によって検討する。

4. 研究成果

(1) N 末端側には 26 アミノ酸からなるシグナル配列があり、454 アミノ酸をコードする 1443 塩基の cDNA をクローニングした。この cDNA を解析すると、フィブロネクチンドメイン (FN III) とホモロジーのある部位を挟んでシステインが同数のアミノ酸ごとに 13 個ずつ認められる構造をしていた。

(2) 我々は、これまでにマンソン裂頭条虫のプレロセルコイド (幼虫) 由来の免疫抑制因子

子 (ES90) の遺伝子組換えタンパク質を 3 種類作成した (図 1)。しかし、LPS で活性化した RAW264.7 マクロファージ細胞株の nitrite (NO) 産生の抑制作用は ES90 のいずれの組換えタンパク質でも認められなかった。

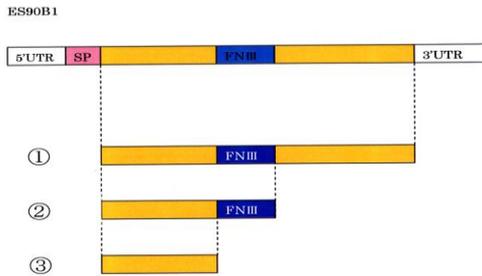


図 1 ES90 のアミノ酸配列の特徴と作成した 3 種類の遺伝子組換えタンパク質の cDNA 構造

(3) 一方、旋毛虫感染マウスでは、腹腔マクロファージ数が増加し (図 2)、これらのマクロファージでは、TNF- α 、IP-10、誘導型の NO 合成酵素 (iNOS) の遺伝子発現は認められず、classical activation は起きていなかったが、FIZZ, Yml, arginase などの遺伝子発現が認められ (図 3)、alternative activation が起きていると考えられた。次に、旋毛虫感染ラットの腸管より旋毛虫の成虫を回収し、in vitro で新生幼虫を得、これをマウスの腹腔に投与したところ、腹腔浸出マクロファージが増加し、alternative activation が認められた。

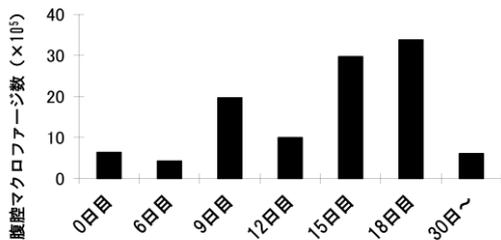


図 2 旋毛虫感染マウスの腹腔マクロファージ数の推移 筋肉内幼虫 500 隻を経口感染させたマウス 1 匹あたりのマクロファージ数を測定した。感染当日を 0 日目とする。

(4) 近年、寄生蠕虫の肝蛭由来の peroxiredoxin (PRX) がマクロファージの alternative activation を起こすとの報告があるため、我々は旋毛虫の PRX のクローニングを試み、2 種類の PRX をクローニングし

た。Prx-1 は 642 bp で Prx-2 は 588 bp であり、この 2 つの塩基配列の一致率は 57%、アミノ酸配列では 53% であった (図 4)。いずれの Prx もマウスや他の寄生虫で保存されている酵素活性中心付近の領域は保存されていた (図 5)。

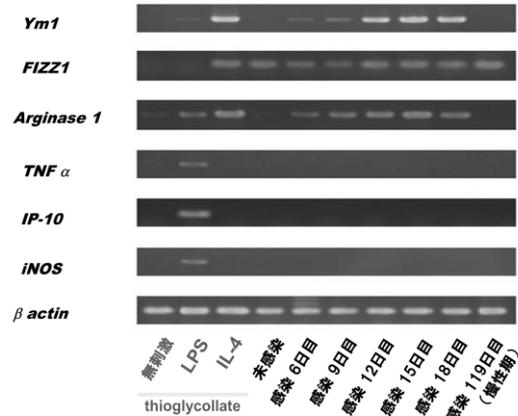


図 3 旋毛虫感染初期のマウス腹腔マクロファージの mRNA 発現

筋肉内幼虫 500 隻を感染させたマウス腹腔マクロファージの mRNA 発現量を半定量的 RT-PCR で調べた。左の 3 レーンは、Thioglycollate で誘導したマクロファージを in vitro にて、無刺激または LPS、IL-4 刺激し、それぞれ 3 時間もしくは 24 時間培養した。それぞれのマクロファージから total RNA を回収し、半定量 RT-PCR 法によって遺伝子発現を比較した。



図 4 旋毛虫の Prx-1 と Prx-2 の塩基配列の比較



図5 Prx アミノ酸配列の比較

旋毛虫 *Trichinella spiralis* (Ts)、肝蛭 *Fasciola hepatica* (Fh)、マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* (Sm)、マレー糸状虫 *Brugia malayi* (Bm)、回旋糸状虫 *Onchocerca volvulus* (Ov)、マウス(Mo)

また、発育ステージごとに Prx の発現を調べたところ、Prx-2 は被囊幼虫、成虫、新生幼虫の3つの発育段階で同様な発現がみられた(図6B)。しかし、Prx-1 は成虫や新生幼虫ではほとんど発現が認められず(図6A)、被囊幼虫でのみ強く遺伝子発現がみられ、筋肉内での被囊幼虫の生存に関与している可能性が示唆された。

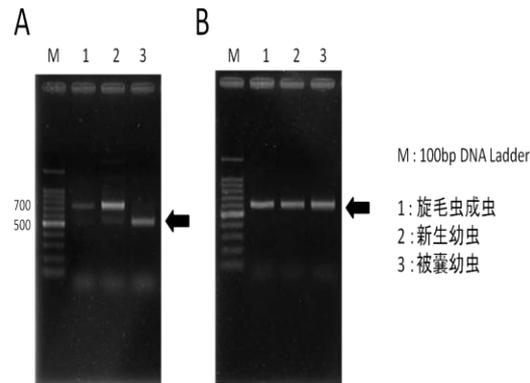


図6 旋毛虫の発育ステージ別の Prx 遺伝子発現の比較

各発育ステージ別の total RNA を回収し、半定量 RT-PCR 法によって TsPrx-1 (A) と TsPrx-2 (B) の遺伝子発現を比較した。

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)

[学会発表] (計2件)

①井上菜菜瀬、福本宗嗣、大槻均、入子英幸、旋毛虫の新生幼虫によるマウス腹腔マクロファージの Alternative activation、第80回日本寄生虫学会大会、2011年7月18日、東京慈恵会医科大学(東京)

②井上菜菜瀬、入子英幸、大槻均、福本宗嗣、旋毛虫感染マウスにおける腹腔マクロファージの Alternative activation 第66回日本寄生虫学会西日本支部大会 2010年11月6日 岡山大学(岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福本 宗嗣 (FUKUMOTO SOJI)
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：60111126

(2) 研究分担者

入子 英幸 (IRIKO HIDEYUKI)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：60346674

大槻 均 (OTSUKI HITOSHI)
鳥取大学・医学部・講師
研究者番号：80403806
(H22)

(3) 連携研究者

なし