

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 5 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21590471

研究課題名（和文） ポスト・C エレガンスの線虫モデル ～ ネズミ糞線虫の大腸寄生 ～

研究課題名（英文） Post-*C. elegans* nematode model ～ Large intestinal parasitism of *Strongyloides ratti* ～

研究代表者

木村 英作 (Kimura Eisaku)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70153187

研究成果の概要（和文）：ネズミ糞線虫は、ラット小腸に 2-3 週間寄生の後、宿主免疫により急激に排除（排虫）される。しかし、少数の成虫は排虫に耐え、感染約 20 日以降、大腸寄生を開始する。大腸寄生は、宿主の免疫反応を逆手に取った寄生虫の生存戦略と考えられ、そのメカニズムを解明することにより寄生現象の本質に迫ることができる。大腸寄生成虫において発現量が増加する遺伝子を得た。それらの機能を解明するため RNA 干渉を用いた解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：*Strongyloides ratti* parasitizes the small intestine of a rat for 2-3 weeks and then is expelled quickly by host immunity. However, some adults tolerate the expulsion, and around 20 days after infection, start parasitizing the large intestine. The large intestinal parasitism is considered as their survival strategy, which is triggered by otherwise harmful host immunity. We have obtained genes that are expressed more in large intestinal adults, and the functions of such genes are under investigation with RNA interference.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、ネズミ糞線虫、大腸寄生、自食作用、遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

ネズミ糞線虫は自由生活世代と寄生生活世代を併せ持つユニークな線虫である。比較ゲノム解析によれば、自由生活性生物と寄生生物の中間的な存在であるとされており、その複雑な生活史の様々な段階において観察される興味深い現象は、研究対象として大変魅力的である。

従来、ネズミ糞線虫はラット小腸に寄生し、感染後 2-3 週間程度で＜完全に＞排除（排虫）されると考えられていた。このため宿主動物による排虫メカニズム（特に免疫システム）解明のモデルとして研究されてきた。

当研究室ではネズミ糞線虫がラット小腸から‘排虫’された後、少数ではある

が感染後約 20 日目以降に大腸に再定着して長期間寄生し続けるという現象（大腸寄生）を見出した。大腸寄生成虫は通常 100 日間以上大腸に寄生を続ける。これは、小腸寄生の成虫が、2-3 週（排虫により死亡）、自由生活世代の成虫はわずか数日の寿命しかないことを考えると、驚くべき現象であり、研究対象として極めて興味深い。

我々はさらに、小腸寄生の成虫（雌のみが寄生している）は単為生殖で産卵し、その虫卵はラットに感染性を持つ感染幼虫に発育（直接発育）するが、大腸寄生の成虫（同様に雌のみ）が産む卵は外界で 1 : 1 の比率で自由生活性の雄・雌成虫に発育すること、そして交尾後に産出される虫卵が感染幼虫に発育（間接発育）することを示した。すなわち、大腸寄生成虫は、「間接発育による増幅作用」と「長い寄生期間」により（その寄生数小腸寄生数の半分以下であるにもかかわらず）、小腸寄生成虫よりはるかに多くの子孫（感染幼虫）を残すことができる（Kimura et al., 1999）。ネズミ糞線虫の大腸寄生現象は野生のラットにも観察されることから実験室内感染による人為的な現象ではないことも示された（Shintoku et al., 2005）。

大腸寄生成虫の生物学的特質を研究するため、小腸寄生成虫を大腸に移植する実験を行った。最初に糞線虫に対する免疫を既に持っているラット（免疫ラット）を作製し、その大腸に通常感染 7 日目あるいは 19 日目の時点で小腸に寄生している成虫を移植した。7 日目の成虫は直ちに排除されたが、19 日目の成虫は長期間の寄生が可能であった。そして次第に体長が伸び、子宮内虫卵数も増加した。通常感染 7 日から 19 日の間に何らかの「刺激」を受けて成虫は大きな変化（大腸適応など）を遂げたと考えられる。通常感染ラットに抗酸化剤 BHA を投与すると大腸寄生が完全に消去されることより、上記の「刺激」は活性酸素である可能性が高い。

以上の成果を踏まえ、ネズミ糞線虫の大腸寄生という複雑な現象のメカニズムと意義を明らかにすることは、同線虫のユニークな生存戦略を理解するに留まらず、寄生現象の本質に迫ることができる有意義な研究であると考えている。

2. 研究の目的

(1) 大腸寄生成虫の形態学的、生理学的

特徴を明らかにする。大腸寄生成虫の腸管細胞に認められる自食作用と思われる所見については特に注目する。

(2) 大腸寄生の成立にかかわるメカニズムを解明する。具体的には、

- ①大腸寄生特異的に発現する遺伝子の探索、
- ②大腸寄生成立に関わる遺伝子の同定、
- ③大腸寄生成虫の長寿にかかわる遺伝子の同定、
- ④成虫の大腸寄生によって誘発される自由生活世代出現のメカニズムに関する研究を行う。

(3) 宿主粘膜肥満細胞 (MMC) に関する研究

3. 研究の方法

研究目的 (1)、(3) では、主として電子顕微鏡を用いた形態学的な観察と、動物（ラット）を用いた感染実験、薬剤投与実験を実施した。研究目的 (2) については遺伝子解析を中心に研究を進めた。特に、小腸と大腸に寄生する成虫を得て、遺伝子発現量を比較し、大腸寄生で強く発現する遺伝子に注目して、その機能を明らかにする。

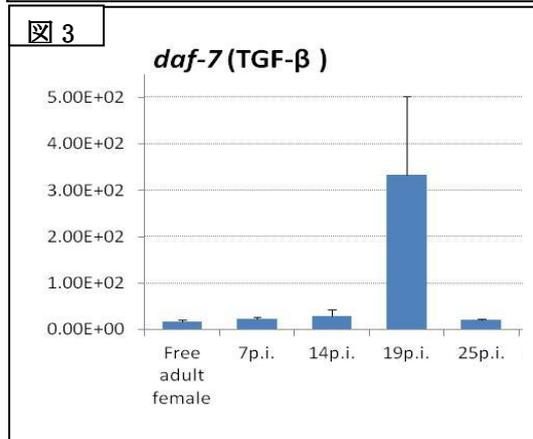
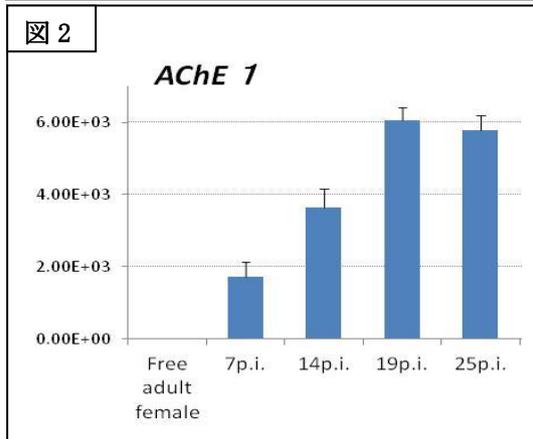
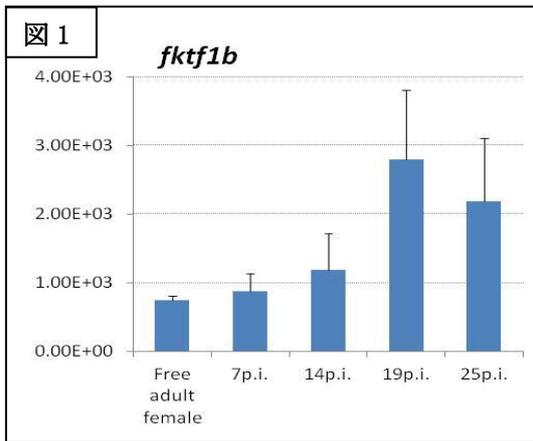
4. 研究成果

大腸寄生成虫に特異的に発現する遺伝子の探索のため、小腸寄生成虫と大腸寄生成虫の cDNA を使い、differential screening 法によって網羅的な解析を行った。

(1) 解析結果

検出された遺伝子は、*C. elegans* で寿命に関連すると報告されている fork head transcription factor 遺伝子 (*fktf-1a* および *fktf-1b*: *C. elegans* の *daf-16* に相当)、核酸と結合する領域を持つ KH domain protein 遺伝子 [仮名]、アセチルコリンエステラーゼ遺伝子 (*AChE-1*, *AChE-2* および *AChE-3*)、HSF-1 (ストレス応答に関与する転写因子) 遺伝子、TGF- β 遺伝子 (*daf-7*)、hormone receptor 遺伝子 (*daf-12*) などである。

これらの遺伝子は全て、感染後 19 日目 (19p. i.) に発現のピークが出現し、14p. i. と 19p. i. の間に重要な変化が起きることが示された。*fktf* の発現は概ね代表的なパターンで、他の遺伝子でも見られる (図1)。*AChE* は自由生活性雌成虫 (free adult female) にはほとんど認められず、寄生をきっかけに発現し、徐々に増加するようである (図2)。*Daf-7* はユニークな発現パターンを示し、19p. i. のみ強い反応を示している (図3)。

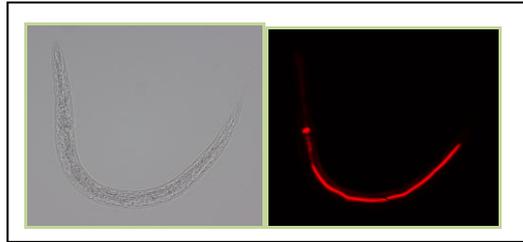


(2) RNAi を利用した遺伝子の機能解析

これらの遺伝子がネズミ糞線虫の大腸寄生成立とどのように関わっているかを解明するための方法の一つとして、RNAi 法の可能性を探る基礎実験を行った。

- ① RNA の糞線虫内への取込みを調べるため、自由生活世代の幼虫あるいは成虫を、蛍光色素で標識した dsRNA あるいは siRNA を含む反応液中でインキュベートした (soaking 法)。いずれの RNA でも腸管が強く染色され (図 4)、蛍光色素は 24 時間後にも観察された。

図 4 標識 RNA の取り込み



- ② 自由生活世代幼虫に *lgg-1* と *actin-1* に対する dsRNA 及び siRNA をそれぞれ取り込ませ、遺伝子発現に対する影響を RT-PCR によって確認した。dsRNA を用いた場合、*lgg-1* は約 10% に、*actin-1* は約 30% に減少した。siRNA の場合は、*lgg-1* は変化がなく、*actin-1* は逆にコントロールに比べ発現量が約 2 倍に増加していた。

これらの予備実験の結果を踏まえ、未知遺伝子の機能を解析する予定である。

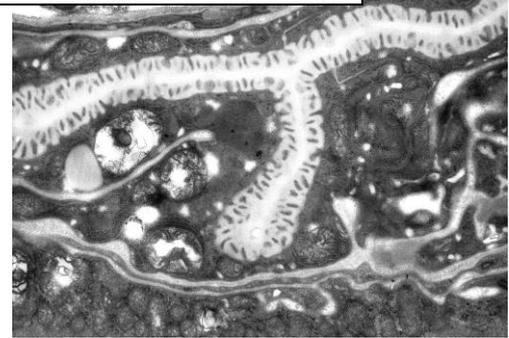
(3) 電子顕微鏡を用いた研究

小腸上部寄生 of 成虫と大腸寄生 of 成虫では形態学的に大きな差異がある。特に消化管の細胞で著しい。前者 (図 5) では多数の正常ミトコンドリアが見られるのに対し、後者 (図 6) ではその変性・崩壊が著しい。腸絨毛は委縮し、腸管は十分機能していない可能性がある。形態的には自食作用を思わせる所見があるが、それに関わる遺伝子はこれまでのところ発見されていない。これに対し、筋細胞内のミトコンドリアの形態は正常であった。

図 5 小腸上部寄生の成虫の腸管



図 6 大腸寄生の成虫の腸管



(4) 大腸寄生と粘膜肥満細胞 (MMC)

MMC は、ネズミ糞線虫感染 2-3 週後に起きる小腸からの排虫に必要なエフェクターであるとされている。しかし大腸寄生成虫と MMC の関連については報告がなかった。糞線虫感染に伴う肥満細胞の変化を、小腸上部・下部、盲腸及び結腸の 4 部位において経時的に調べたところ、以下の結果を得た。[i]4 部位の全てにおいて、MMC 数のピークは寄生成虫数のピークの 5-7 日後に出現した。[ii]各腸管部位における MMC 数は、そこに寄生している成虫数に依存する。これらの事実は、基本的には寄生虫が MMC 反応を支配していると考えても矛盾しない。MMC 反応は、単に寄生虫排除のための宿主反応ではなく、糞線虫自身が誘導する「糞線虫のための反応」(生存戦略)かもしれない。

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 3 件)

① Shintoku Y, Takagi H, Kadosaka T, Kondo S, Itoh M, Honda S, Kimura E. *Strongyloides ratti*: transplantation of adults obtained from the small intestine at different days after infection into the colon of naïve and infection-primed Wistar rats, and the effect of antioxidant treatment on large intestinal parasitism. *Parasitology*. 2011, 138: 1053-1060. 査読 (有)

② Takagi H, Itoh M, Kasai S, Yahathugoda TC, Weerasooriya WA, Kimura E. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. *Parasitology International*. 2011, 60: 493-497. 査読 (有)

③ 木村英作. 無視され続ける寄生虫病: わが国の糞線虫症の現状. *Clinical Parasitology*. 2011, 22: 18-22. 査読 (有)

[学会発表] (計 6 件)

① 高木秀和. 大腸寄生しているネズミ糞線虫で発現量が増加している遺伝子について. 第 3 回蠕虫研究会, 2009 年 11 月 13 日, 青島サンクマール (宮崎)

② 高木秀和. ネズミ糞線虫の *ftf-1/daf-16* は大腸寄生時に発現量が増加する. 第 79 回日本寄生虫学会大会, 2010 年 5 月 20-21 日, 大雪クリスタルホール (旭川)

③ 高木秀和. 糞線虫は大腸に寄生するためにどのように変化するのか? 第 4 回蠕虫研究会, 2010 年 11 月 26-27 日, 青島サンクマー

ル (宮崎)

④ Shintoku Y. Large intestinal parasitism of *Strongyloides ratti*: the significance and mechanisms. 11th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, 27 Dec, 2010, Incheon, Korea

⑤ 高木秀和. 宿主免疫刺激が *Strongyloides ratti* のストレス応答およびシグナル伝達遺伝子の発現を増加させる. 第 80 回日本寄生虫学会大会, 2011 年 7 月 17-18 日, 慈恵医大 (東京)

⑥ 高木秀和. ネズミ糞線虫 *Strongyloides ratti* に対する RNAi の試み. 第 81 回日本寄生虫学会大会, 2012 年 3 月 23-24 日, 兵庫医大 (西宮)

[図書] (計 1 件)

① 木村英作, 医学書院, 今日の診断指針 第 6 版 (糞線虫症). 2010: 1364-1366.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 英作 (Kimura Eisaku)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70153187

(2) 研究分担者

高木 秀和 (Takagi Hidekazu)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90288522
角坂 照貴 (Kadosaka Teruki)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90109760
伊藤 誠 (Itoh Makoto)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90137117

(3) 研究協力者

神徳 好美 (Shintoku Yoshimi)
愛知医科大学・医学部・研究員
近藤 繁生 (Kondo Shigeo)
愛知医科大学・医学部・教学監