

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06995

研究課題名(和文)磁性ナノ粒子を用いた蠕虫のin vivoイメージングによる体内移行動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of helminthic larval migration dynamics using in vivo imaging with magnetic nanoparticles

研究代表者

吉田 彩子 (Yoshida, Ayako)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20343486

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)：寄生線虫の豚回虫とネズミ糞線虫の感染型L3 (iL3)を、蛍光標識ナノビーズとの共培養により、遺伝子組み換え技術を用いることなく感染性を保持したままで標識する技術確立した。

また、線虫類幼虫の体内移行における組織親和性決定因子の解明を試みるため、ネズミ糞線虫iL3と、頭蓋腔(hL3)または肺(lL3)に移行した第3期幼虫を材料としてRNAseq解析を実施し、それぞれのステージで特徴的な遺伝子の発現パターンを解析した。体内移行経路の決定に関連性が示唆された44遺伝子について、さらに、RNAi等の技術を用いて発現修飾することで、幼虫の体内移行経路に与える影響を検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寄生性蠕虫類は多細胞生物であるため組換え体の作出が困難で、動物宿主への感染が生活環の維持に必須なことから組換え体の株化にも大きな労力が必要となる。本研究で確立したナノ粒子を用いた寄生線虫幼虫の標識技術は、遺伝子を組み替えることなく比較的長期間幼虫を蛍光標識することを可能とすることから、宿主体内での寄生現象の解析に大きく貢献する新しい技術であると言える。また、ネズミ糞線虫の発現遺伝子解析により得られたデータの解析が進み、線虫類幼虫の体内移行における組織親和性決定因子が明らかとなれば、寄生虫の体内移行という生命現象の解明や寄生虫症の病態形成メカニズムの解明につながる新しい知見が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：A labeling technique using fluorescent-labeled nanobeads was established for parasitic nematode larvae, third-stage larvae (L3) of *Ascaris suum* and *Strongyloides ratti*, without the need for genetic recombination technology. Furthermore, to elucidate the determining factors of tissue migration routes in *S. ratti* larvae, RNAseq was conducted using infectious L3, L3 migrated to the nasofrontal area, and L3 migrated to the lungs. Analysis of the gene expression patterns in each L3 identified 44 genes suggested to be relevant to the determination of the larval migration route. Further studies will be necessary to investigate the effect of these candidate genes on larval migration routes by modifying gene expression using techniques such as RNAi.

研究分野：寄生虫学

キーワード：寄生線虫 ナノビーズ 体内移行 RNAseq

1. 研究開始当初の背景

寄生性蠕虫類には運動性や移動性が高く、幼虫が感染宿主の体内組織を移動する体内移行を行う種が知られている。寄生虫の体内移行経路の解析は、生物学的な真理の探究に加え、寄生虫感染による病態の解明を目的として実施されてきた。しかしながら、その手法は実験的に感染させた動物を経時的に安楽殺し、組織から回収された寄生虫数の推移を観察することにより得られた個体群動態 (population dynamics) であり、同一の動物体内での移行動態を検討したものではない。また、寄生性蠕虫の中には、同属であっても種によって移行先の組織が異なる種が知られているが、そのような移行幼虫の組織親和性を決める因子についてはほとんどわかっていない。体内移行動態の解析のために、多くの研究者が蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだ組換え蠕虫の作成を試みてきた。しかし、寄生性蠕虫類は多細胞生物であるため組換え体の作出自体が困難であることに加え、*in vitro*の系で生活環を維持できず、動物宿主への感染が必須で株化が難しく、実験に使用可能なレベルでの組換え体の作成は実現していない。

近年、*in vivo*イメージングの進歩は目覚ましく、様々な技術が開発されている。磁性ナノ粒子は超磁性を持ったナノメートルサイズの粒子で、核磁気共鳴画像法 (MRI) の造影剤として医療分野においても応用されている^{1, 2}。磁性ナノ粒子は、生体への安全性が高く、共培養によって簡単に細胞に取り込まれて磁気標識することができ、MRIを利用して生体内での1細胞レベルでの追跡が可能である。さらに、細胞の磁気標識は比較的長期間 (3週間程度) 維持されることが報告されており³、同一個体における継時的な動態の観察が期待できる。そこで、磁性ナノ粒子標識寄生虫を用いたMRIによる*in vivo*トラッキングを用いることで、同一個体での幼虫の移行動態の解析が可能ではないかと着想した。

2. 研究の目的

蠕虫類には成虫へと発育する過程において、幼虫が感染宿主の体内組織を移動する体内移行を行う種が知られている。*Toxocara*属 (犬回虫、猫回虫) や *Ascaris*属 (豚回虫、人回虫) の回虫類や糞線虫類は体内移行を行う代表的な蠕虫である。そこで、本研究では、従来の個体群動態 (population dynamics) を評価した体内移行経路よりもより精度の高い虫体の体内移行動態解析を目的に、MRIの造影剤として医療分野において応用されている磁性ナノ粒子による細胞標識技術を寄生虫学分野に応用し、磁性ナノ粒子で標識した幼虫の体内移行動態をMRI撮像によりトラッキングする、寄生虫の*in vivo*イメージング技術の開発を試みた。また、回虫類や糞線虫類の幼虫は宿主へ感染後に体内移行を行うことが知られているが、その移行経路や移行組織は虫種で異なり、この違いが感染宿主での病態形成の違いに繋がる。そこで、寄生線虫種の移行経路や組織親和性の決定因子に関する知見を得るため、異なる組織に移行したネズミ糞線虫の体内移行幼虫を材料に用いてRNAseqによる網羅的な発現遺伝子解析を実施した。

3. 研究の方法

1). 寄生虫

豚回虫は都城食肉衛生検査所から、猫回虫はみやざき動物愛護センターから成虫虫体の分与を受けた。雌成虫の子宮から採取した虫卵を25℃で4週間培養して得られた、幼虫包蔵卵を物理的に孵化させて第3期幼虫 (L3) を回収した⁴。

ネズミ糞線虫は宮崎大学において継代・維持されているTDL株を用いた⁵。感染ラットの糞便を27℃で5日間ろ紙培養し、遊出した感染型幼虫iL3を回収した。7-8週令の雄のWisterラットにiL3を皮下接種し、感染後30時間後に解剖して、頭蓋腔または肺からバールマン法でそれぞれの組織に移行した幼虫を回収した。

2). 寄生線虫第3期幼虫 (L3) のナノビーズ標識

虫卵から孵化させた豚回虫、猫回虫L3は37℃、5% CO₂ 下で24穴プレートを用い、100 µg/ml ストレプトマイシン、100 U/ml ペニシリン、250 ng/ml アムホテリシナムホテリシンBを添加したDMEM中で培養した。ネズミ糞線虫のiL3については、抗菌・抗真菌剤を添加したDMEM中に懸濁し、27℃で培養した。

L3幼虫の標識には、RITC標識ナノビーズ (NEO-STEM TSR50, BITERIALS, Seongnam, South Korea) と、磁性コアとして酸化鉄の含まれた磁気ナノビーズ NEO-LIVE Magnoxide 675 (BITERIALS) および LUORESCENT MAGNETIC POLYMER MEFR001 (Bang laboratories, Fishers, IN) を用いた。DMEMで濃度を調整したナノビーズとL3を前述の条件で24または48時間共培養した。その後、3.0 µmのCell Culture Insert (FALCON, Newark, NJ) を用いて培養液中のナノビーズを取り除き、検討に用いた。L3におけるナノビーズの取り込みは、デジタル倒立顕微鏡 (EVOS M5000 Imaging System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) でナノビーズからの蛍光シグナルを検出することで確認した。

3). 透過型電子顕微鏡による観察

NEO-STEM TSR50 で標識した豚回虫幼虫をカコジル酸バッファーで 3%に調整したグルタルアルデヒドで 4、4 時間固定した。洗浄後、同バッファーで 1%に調整した四酸化オスミウムで 4、2 時間固定し、エタノールで脱水した後、エポン 812 樹脂で包埋した。厚さ約 80 nm に薄切した切片をクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。

4).MRI 撮像による磁性ナノビーズ標識 L3 の検出

市販の精肉に 23G 注射針を用いて磁気ナノビーズ標識 L3 を注入したのに対して MRI 撮影を行った。MRI 撮影はコイル(100 フレキシブルコイル MJLC-102F, キヤノンメディカルシステムズ, 栃木, 日本)を使用し、3 テスラの MRI (Vantage Titan 3T, キヤノンメディカルシステムズ)で行った。

5).RNAseq 解析

ネズミ糞線虫の感染型幼虫 (iL3) と、頭蓋腔 (hL3) または肺 (IL3) から回収した体内移行幼虫から、NucleoSpin RNA Plus XS (MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany) を用いて RNA を抽出した。RNA Sequencing は株式会社 Rhexia に委託した。SMART-Seq HT PLUS kit (Takara Bio USA, Inc., Mountain View, CA) でライブラリーを調整し、NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA) によりシーケンシングデータを取得した。シーケンシングデータは、Wormbase (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) より得たネズミ糞線虫 ED 株の配列をリファレンスゲノム配列として、Geneious Prime v2023.2.1 (Dotmatrix, Hertfordshire, UK) を用いて解析した。

4. 研究成果

1). ナノビーズを用いた寄生線虫 L3 の標識

幼虫包蔵卵から機械的に孵化させた回虫類 L3 を dMEM 中で RITC 標識ナノビーズ (NEO-STEM TSR50) と共培養 (37、5% CO₂) し、蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを観察した。まず、豚回虫 L3 においては、消化管に沿って蛍光シグナルが検出され、標識から 1 週間後もシグナルを保持していた (図 1)。標識に用いるビーズの濃度 (0.1、0.2、0.4mg/ml) と共培養時間 (24、48 時間) について検討を行い、幼虫の標識率や死亡率から、豚回虫 L3 ではビーズ濃度 0.2mg/ml で 48 時間培養する条件が適当と考えられた。この条件で、猫回虫 L3 も標識が可能であり、蛍光シグナルは 1 か月後も検出できることを確認した。透過型電子顕微鏡を用いて豚回虫幼虫体内でのビーズの局在を観察したところ、消化管腔のみならず、細胞内にもビーズが取り込まれていることを確認した。また、ろ紙培養により得られたネズミ糞線虫の感染型第 3 期幼虫 (iL3) についても、dMEM 中で NEO-STEM TSR50 と共培養 (27、48 時間) することにより、ナノビーズによる標識が可能であった。さらに、MRI 撮像時の磁性シグナル強化を目的に、NEO-STEM TSR50 (54nm) より粒径が大きい MEFR001 (860nm) を用いたナノビーズ標識について検討を行った。豚回虫の L3 を MEFR001 と 37、5% CO₂ 下で、48 時間共培養を行ったところ、蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルが確認されたことから、MEFR001 を用いることでも幼虫の標識が可能であることが示された。



図 1. RITC 標識ナノビーズを用いた豚回虫 L3 の標識
ナノビーズの取り込み後、DMEM 培地中で 1 週間培養した幼虫においてもナノビーズに由来する蛍光シグナル (矢印) が検出された。

2). MRI 撮像による磁性ナノビーズ標識 L3 の検出

NEO-LIVE Magnoxide 675 および MEFR001 により標識した豚回虫 L3 を 10 隻または 50 隻精肉に接種し、MRI 撮像を行った。その結果、いずれのナノビーズによる標識においても 50 隻の接種部位に幼虫からの MR シグナルが検出され、MEFR001 を標識に用いた方が NEO STEM の場合に比べより強いシグナルが確認できた。しかしながら、10 隻の接種部位では、いずれのナノビーズを用いた場合も、標識 L3 からのシグナルの識別は困難であった。また、NEO-LIVE Magnoxide 675 を用いて標識したネズミ糞線虫 iL3 を用いて MRI 撮像を行った場合においても、回虫類と同様に 10 隻の幼虫のシグナルの検出は困難であった。本研究では撮影に 3T の MRI を用いたが、少数の幼虫からのシグナルを検出するには解像度が不足しており、磁性ナノビーズ標識幼虫の *in vivo* トラッキングにはより高解像度の機器を用いた解析が必要であると考えられた。

3).RNAseq による体内移行幼虫の組織親和性決定因子の探索

線虫類幼虫の体内移行における組織親和性決定因子の解明を試みるため、L3 が体内移行を行うネズミ糞線虫を材料に検討を行った。ネズミ糞線虫 TDL 系統の L3 は頭蓋腔に移行した後、臭神経をつたって鼻腔から咽頭へと至り、消化管を下降して小腸で成虫に発育するが、一部の L3

は回虫類と同様に肺へと移行した後、気道をさかのぼって咽頭から消化管へと移行する。そこで、体内移行前の感染型幼虫 (iL3) と、頭蓋腔 (hL3) または肺 (IL3) といった異なる組織に移行した体内移行幼虫を材料として RNAseq 解析を行った。その結果、iL3、hL3、IL3 でそれぞれ 2200、197、3976 遺伝子の有意な発現上昇を、逆にそれぞれ 3857、1889、327 遺伝子で有意な発現低下を認めた。さらに、hL3 に着目して解析を進めたところ、iL3、hL3 に比べ、Metalloendopeptidase や Fatty acid-and retinol-binding protein、Bicarbonate transporter-like transmembrane domain-containing protein を含む 15 遺伝子について hL3 で特異的に発現量が上昇し、Proteinase inhibitor I33 や Cathepsin D、Heat shock 70 を含む 29 遺伝子の発現量が低下していることを確認した。

今後、これらの遺伝子発現を RNAi 等の技術を用いて修飾することで、幼虫の体内移行経路に与える影響を検討していく。

【引用文献】

- ¹ Braga CW, Chen Q, Burschtin OE, Rapoport DM, Ayappa I. (2011) Changes in lung volume and upper airway using MRI during application of nasal expiratory positive airway pressure in patients with sleep-disordered breathing. *J Appl Physiol*, 11(5):1400-9.
- ² Publico-Lansigan MH, Hickling WJ, Japp EA, Rodriguez OC, Ghosh A, Albanese C, Nishida M, Van Keuren E, Fricke S, Dollahon N, Stoll SL. (2013) Magnetic nanobeads as potential contrast agents for magnetic resonance imaging. *ACS Nano*, 7(10): 9040-48.
- ³ Cohen ME, Muja N, Fainstein N, Bulte JW, Ben-Hur T. (2010) Conserved fate and function of ferumoxides-labeled neural precursor cells in vitro and in vivo. *J Neurosci Res*, 88(5):936-44.
- ⁴ Nguyen YTH, Hayata Y, Sonoda S, Nonaka N, Maruyama H, Yoshida A. (2020) Establishment of a serodiagnosis system for the detection of *Toxocara* spp. and *Ascaris suum* infection in chickens. *Parasitol Int*, 75:102022.
- ⁵ Hino A, Tanaka T, Takaishi M, Fujii Y, Palomares-Rius JE, Hasegawa K, Maruyama H, Kikuchi T. (2014) Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology*, 141(13):1736-45.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Poulsen Casper Sahl, Yoshida Ayako, Wellbrant Tinna Thordardottir, Leifsson Pall Skuli, Skallerup Per, Thamsborg Stig Milan, Nejsun Peter	4. 巻 43
2. 論文標題 Migratory pattern of zoonotic Toxocara cati and T. canis in experimentally infected pigs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 587 ~ 596
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10096-024-04753-7	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田千晴、兒玉紘奈、松尾智英、吉田彩子
2. 発表標題 in vivoイメージングへの利用を目的とした回虫類第3期幼虫のナノビーズを用いた標識
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会 第32回日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Ishida, Takao Irie, Ryusei Tanaka, Haruhiko Maruyama, Ayako Yoshida
2. 発表標題 Analysis for the determinants of larval migration routes in Strongyloides ratti
3. 学会等名 第14回蠕虫研究会
4. 発表年 2023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
研究分担者	佐藤 裕之 (Sato Hiroyuki) (20545404)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	丸山 治彦 (Maruyama Haruhiko) (90229625)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	

	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
研究協力者	入江 隆夫 (Irie Takao)		
研究協力者	田中 龍生 (Tanaka Ryusei)		
研究協力者	兒玉 紘奈 (Kodama Hirona)		

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		
デンマーク	University of Copenhagen	Aarhus University	Statens Serum Institut