

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19388

研究課題名(和文)住血吸虫症の克服に向けて - 中間宿主の自然免疫機構をゲノム編集で解明

研究課題名(英文)Overcoming schistosomiasis - Elucidating the innate immune mechanism of the intermediate host by genome editing

研究代表者

黒田 玲子(Kuroda, Reiko)

中部大学・先端研究センター・特任教授

研究者番号：90186552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な感染症であるヒト住血吸虫症に対する全く新しい制御法の開発に挑戦した。住血吸虫はヒトに経皮感染する前に、特異的な中間宿主巻貝に感染し、その中で変態するので、そこにゲノム編集で介入することを目指した。巻貝のゲノム編集は大変難しいが、感染耐性にかかわる候補遺伝子のguide-RNA配列/Cas9蛋白質の1細胞期胚へのマイクロインジェクションとその胚の人工培養に世界で初めて成功した。候補遺伝子の標的部位に6塩基欠失が起きていた。感染の理解と制御に向けて道を大きく拓くことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト住血吸虫症は世界保健機関(WHO)により「顧みられない熱帯病」に指定されており、2.5億人以上が罹患、毎年20万人が死亡する。日本でもかつて山梨などで風土病として恐れられていた。全く新しいアプローチで感染症を制御すべくゼロから研究を立ち上げた。原虫はヒトに経皮感染する前にまず巻貝に感染しその中で変態するので、そこに介入する。軟体動物のゲノム編集に成功したのは別の目に対する我々の研究のみであった。感染耐性にかかわる候補遺伝子をターゲットとし、世界で初めてゲノム編集員の作成に成功した。6塩基欠失ではあったが、大きく道を拓くことができた。軟体動物の自然免疫の理解にもつながる研究である。

研究成果の概要(英文)：We have explored the development of a completely new control strategy against human schistosomiasis, a serious parasitic infectious disease. Schistosoma infects a specific intermediate host snail and metamorphoses in it before infecting humans through the skin. Thus, we aimed to intervene in the steps occurring inside the snail by genome editing techniques. Genome editing of snails is challenging but we have succeeded in microinjecting guide-RNA/Cas9 protein targeted to a candidate gene related to infection resistance into one-cell stage embryos and achieved exo ovo culture of the embryos for the first time in the world. A 6-base deletion occurred at the target site of the candidate gene, which paves the way to understanding parasite infection.

研究分野：分子生物学・発生生物学・分光学・結晶学・化学

キーワード：住血吸虫症 ゲノム編集 巻貝 自然免疫機構

1. 研究開始当初の背景

住血吸虫症は、住血吸虫（セルカリア幼生）がヒトの皮膚から侵入して起こる感染症で、熱帯地域を中心に世界 78 か国で 2.5 億人以上が罹患し、毎年 20 万人が死亡する。社会経済学的損失はマラリアの次に大きく、世界保健機関(WHO)により「顧みられない熱帯病」(Neglected Tropical Diseases)に指定されている。かつては日本でも山梨などで風土病として恐れられていた。様々な対策を講じているが、感染リスクの高い水辺の生活と切り離せない発展途上国の生活様式が深く関わっているため解決は困難を極める。特効薬は親虫にしか効かないうえに耐性が生じてきている。これまでと全く異なるアプローチでなければこの感染症を制御することはできない。

住血吸虫は中間宿主である巻貝の中でミラシジウムからスポロシスト 2 世代を経て、セルカリアへと変態し、セルカリア幼生がヒトに経皮感染を起こす。**今、最も期待されているのは、媒介貝に介入することで住血吸虫の生活環を止めるという方法である。** マンソン住血吸虫 (*S. mansoni*) は淡水産巻貝 *Biomphalaria* (*B.*) *glabrata* を特異的に宿主とするが、この巻貝には感染に耐性のあるものが天然に存在する。感染系統 (**M-line**) と耐性系統 (**BS-90**) が樹立されており、これまでに、両者の発現比較解析等により耐性遺伝子候補が既知/未知遺伝子を含め 100 種余り報告されてきた (Castillo et al. 2020)。しかし、候補遺伝子と耐性形質が関係づけられたものは皆無である。

2. 研究の目的

天然由来の感染系統 (**M-line**) と耐性系統 (**BS-90**) を当研究室で継代飼育することに成功している。BS-90 系統で耐性形質への関与が予想される候補遺伝子をゲノム編集技術でノックアウトし、その結果、耐性形質が損なわれるかを確認する。貝のゲノム編集は他の動物と比べて大変に難しく、*B. glabrata* のゲノム編集の成功例がないどころか、次世代まで続く形質として軟体動物のゲノム編集に成功しているのは、淡水産巻貝、ヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea* (*L.*) *stagnalis*) に対する我々の研究だけである。そこで、*B. glabrata* に対するゲノム編集技術を開発することを目的とした。候補遺伝子が感染耐性に寄与する働きを分子から細胞/個体レベルまで関連付けて明らかにする。形質を人為的にコントロールできることを実証できれば、世界の感染症対策に大きな変革をもたらすと期待される。さらに、遠い目的として、ほとんど明らかになっていない巻貝全般、あるいは軟体動物の自然免疫機構の解明にもつなげたい。

3. 研究の方法

I-1. 胚外培養 (EOC) 技術の開発

実験対象の *B. glabrata* の受精卵はカプセル内の栄養分をもとに発生し、稚貝となり孵化する。ゲノム編集のためのマイクロインジェクションにはカプセルから取り出した 1 細胞期の受精卵を使用するため、マイクロインジェクション後の胚を胚外培養により正常発生させる必要がある。これまで我々がヨーロッパモノアラガイ *L. stagnalis* で確立した胚外培養技術を基盤に、様々な培養条件を試みた。胚外培養で得られた稚貝を個別に飼育・成長させ、形態観察や繁殖能力 (自家受精) の検証を行った。

I-2. *B. glabrata* 胚へのマイクロインジェクション技術の確立

L. stagnalis では受精卵を DTT 処理することにより卵膜の状態をマイクロインジェクションに最適な状態にしたこと (*Dev Genes Evol.*, 2009) を参考にして、*B. glabrata* 1 細胞期胚 (受精卵)

を様々な条件で DTT 処理してマイクロインジェクションを行った。マイクロインジェクションには 低分子量の蛍光物質 Lucifer Yellow と EGFP mRNA を使用した。

II. guide RNA の設計とゲノム編集巻貝の作製

まず始めに実験対象である感染耐性系統 BS-90 から DNA を単離して感染耐性に関与することが予想される候補遺伝子の塩基配列がデータベース上の配列と同じであることを確認した。次に、ファミリー遺伝子との塩基配列を比較し、それぞれが特異的な配列を有する領域を標的として guide RNA を設計した。Cas9 タンパク質と guide RNA を 1 細胞期の胚にマイクロインジェクションし、胚外培養により稚貝まで成長させた。

4. 研究成果

I-1. 胚外培養 (EOC) 技術の開発

B. glabrata の 1-2 細胞期の胚を用いて様々な条件を変えて胚外培養を行った結果、感染耐性系統 BS-90 と感受性系統 M-line のどちらにおいても正常な形態をした稚貝に成長させることに世界で初めて成功した。人工胚培養により得られた貝 (F0) を個別飼育したところ、成貝まで成長した全ての個体が次世代 (F1) を産む自家受精能を有していた (図 1)。

I-2. *B. glabrata* 胚でのマイクロインジェクション技術の確立

当初は DTT 処理条件を検討していたが、装置の改良、手法の工夫により DTT 処理を行わずにマイクロインジェクションをすることが可能となった。2 細胞期の片側の割球にのみ EGFP mRNA を注入した胚では、その後、胚の一部でのみ EGFP の蛍光が観察された (図 2)。

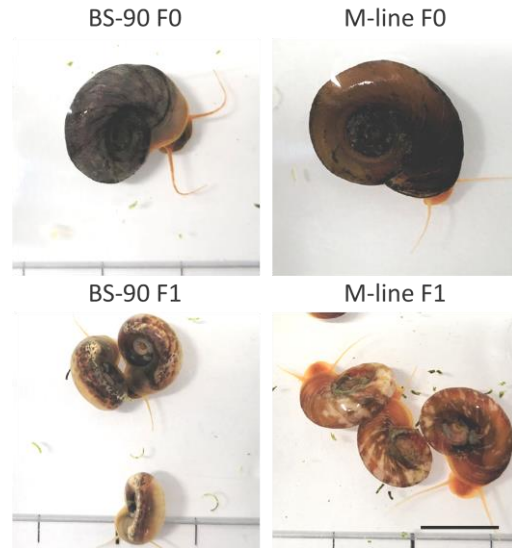


図 1. 胚外培養により得られた成貝 (F0) と自家受精により生まれた次世代 (F1). スケールバー: 1 cm。

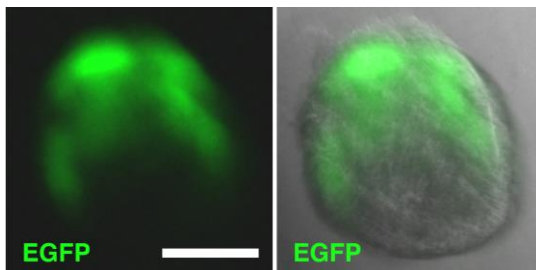


図 2. マイクロインジェクション胚における EGFP 蛍光の検出. 2 細胞期胚の片割球に EGFP mRNA をマイクロインジェクションし、原腸胚期に観察した。左: 蛍光像, 右: 蛍光像と明視野像を重ねた像。スケールバー: 50 μm 。

II. guide RNA の設計とゲノム編集巻貝の作製

研究計画では *Cas9* mRNA と候補遺伝子の標的部位に対する guide RNA の利用を計画していたが、早期に効率良くゲノム編集が起こることが期待される Cas9 タンパク質を用いた。Cas9/guide RNA の複合体を注入した後に発生の進んだ胚から DNA を調製、標的配列近傍をクローニングした。各 5 クローンから PCR により増幅しヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA) を行った結果、高分子領域にゲノム配列変異による別のバンドが現れた (図 3、個体 2)。DNA シーケンシングにより塩基配列を決定したところ、HMA の結果から予想された通り、個体 1 では変異は起こっていなかったが、個体 2 では標的部位に 6 塩基欠失が起こっていた。これはフレームシフトを伴う変異ではなかったが、本研究で開拓したゲノム編集技術により、*B. glabrata* の候補遺伝子ノックアウト研究への道が大きく拓かれた。

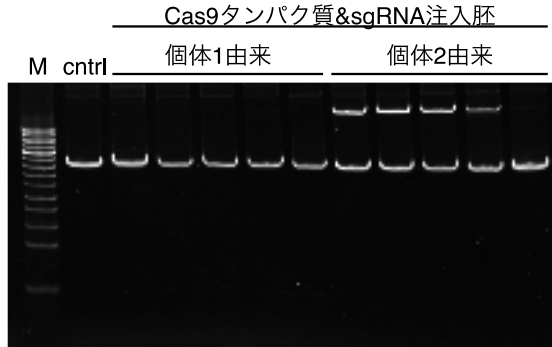


図 3. ヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA).

Cas9 タンパク質と guide RNA をマイクロインジェクションした胚について胚外培養を行い、発生の進んだ胚から DNA を調製し、ゲノム編集標的配列を含む領域をクローニングした。その後、個々のプラスミド内にある巻貝由来のゲノム領域 (約 400 bp) を PCR で増幅して HMA を実施した。cntrl : コントロール胚 (野生型) , M : 50 bp ladder。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Reiko Kuroda	4. 巻 34
2. 論文標題 Exploring the structural difference in homologous proteins that are crucial in organismal body handedness determination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sogo-Kogaku	6. 最初と最後の頁 38-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Reiko Kuroda
2. 発表標題 Mechanical and CRISPR/Cas manipulation of snail embryos changes righties into lefties
3. 学会等名 Biologists Workshop（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Reiko Kuroda
2. 発表標題 Left-right body plan and cell-fate determination at the very early embryogenesis
3. 学会等名 Franco-Japanese Developmental Biology Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Reiko Kuroda
2. 発表標題 Turning Lefties to Righties; Development of Crispr/Cas9 genome editing in mollusk and its application to medicine
3. 学会等名 World Gene Convention（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Reiko Kuroda
2. 発表標題 Left-right body plan of freshwater snails is determined by a single gene in very early embryogenesis
3. 学会等名 Yamada Conference LXXV (招待講演) (国際学会)
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	濱野 真二郎 (Hamano Shinjiro) (70294915)	長崎大学・熱帯医学研究所・教授 (17301)	
研究分担者	阿部 真典 (Abe Masanori) (60599918)	中部大学・先端研究センター・特任講師 (33910)	削除：2022年5月17日
研究分担者	内田 孝幸 (Uchida Takayuki) (80334093)	中部大学・先端研究センター・特任講師 (33910)	追加：2022年5月17日

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
---------	---------