

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689024

研究課題名(和文)免疫回避におけるタンデムリピート抗原の意義

研究課題名(英文)The role of tandem repeat antigens in immune escape

研究代表者

後藤 康之 (Yasuyuki, Goto)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50553434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,000,000円、(間接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：原虫のTandem repeat (TR) 蛋白は強いB細胞抗原として報告があるが、その抗原性を生み出すメカニズムや機能性については不明な点が多い。本研究では、ゲノム解析によりキネトプラスチダ目原虫の巨大TR遺伝子の存在は哺乳宿主適応と関連していることを明らかにした。また、その抗原性には一般的な蛋白性抗原と異なり、多価抗原ならではのB細胞活性化の関与が示唆された。さらに、リーシュマニア原虫感染時における異常なB細胞活性化に関わる候補因子としてBAFFを同定した。以上の結果は、原虫の宿主適応におけるTR抗原を介した免疫回避機構を明らかにするうえで大きなステップと言える。

研究成果の概要(英文)：Tandem repeat (TR) proteins of protozoan parasites have been reported as strong B cell antigens, whereas the mechanisms for the antigenicity or the biological meaning of the antigenic TR proteins remain unknown. In this study, we revealed through genome analyses of Kinetoplastida parasites that the presence of huge TR genes is related to the pathogenesis to mammals. Besides, we found a distinct antibody production pattern to TR antigens compared to non-TR antigens, indicating the unique mechanism for TR antigens to be recognized by B cells. Furthermore, we identified BAFF as a candidate molecule related to excessive activation of humoral responses during leishmaniasis. Taken together, these findings will be a great step towards understanding immune escape mechanisms of protozoan parasites by using TR antigens.

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：抗原 タンデムリピート 寄生虫 リーシュマニア症

### 1. 研究開始当初の背景

過去に数々の病原体から同定された抗原の多くが tandem repeat (TR) ドメインを持っておりそのことから TR タンパクは免疫原性が高いと考えられていたが、これまでに体系的な研究は行われていなかった。研究代表者はこのことに着目して、病原体ゲノムから TR タンパクをコードする遺伝子を探索することで抗原性の高い新規抗原を効率よく同定できると考え、これまでに原虫のうち内臓型リーシュマニア症を引き起こす *Leishmania infantum*、およびシャーガス病を引き起こす *Trypanosoma cruzi* において極めて良好な成績を得た。

その抗原性という共通点の一方で、TR 蛋白の発現パターンは原虫種によって様々であり、興味深いことにそれぞれの感染における液性免疫の役割が TR 蛋白の種類や発現パターンと相関することが見出された。これらのことは、TR 蛋白が宿主液性免疫をコントロールする抗原群として存在していることを示唆しているが、その分子生物学的機序については明らかになっていない点が多かった。

### 2. 研究の目的

本研究では、なぜ繰返し配列を持つことが強い抗原性に繋がるのかを分子生物学・免疫学的手法を用いて明らかにしていくこととした。直接のエフェクター細胞である B 細胞の活性化パターンやその機構について解析を行った。また、他のアクセサリー細胞、つまり T 細胞の関与についても免疫不全マウスを用いた実験系を用いて解析した。さらに、寄生虫における TR 遺伝子の獲得について進化遺伝学的な観点から明らかにするためキネトプラスト目原虫 TR 蛋白の比較解析を行った。キネトプラスト目には眠り病、シャーガス病、リーシュマニア症と世界保健機構が指定する重要感染症のうち三つもの感染症を引き起こす病原原虫が含まれている。比較的近い共通の祖先を持つことから形態学的特徴を含め様々な共通点がある一方、その感染によって引き起こされる病態および宿主免疫回避機構は全く異なる。これら原虫の TR 遺伝子について比較解析することによって進化の過程のどの段階で獲得されたものなのか、またその獲得に免疫学的要素は影響してきたのかについて明らかにしていくこととした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 原虫 TR 蛋白の比較解析

1 本の鞭毛を持つ原生生物からなる分類群であるトリパノソーマ科に属する原虫は、比較的近い共通の祖先を持つことから形態学的特徴を含め様々な共通点がある一方、その感染によって引き起こされる病態および宿主免疫回避機構は全く異なる。そこでトリパノソーマ科原虫における TR 遺伝子について

解析をおこなった。

(2) TR 特異的液性免疫の活性化メカニズム  
リピート抗原には非リピート抗原には無いユニークな B 細胞活性化機能がありそれが TR 蛋白の強い抗原性に寄与していることは明らかである。本研究では、リーシュマニア原虫感染マウスにおける抗 TR 抗体のサブクラス解析や抗体産生への T 細胞の関与について解析を行った。

(3) B 細胞活性化に関わる因子の探索  
リーシュマニア感染時には TR 抗原に対して非常に強い抗体産生が引き起こされるが、それに関与する分子は明らかになっていない。そこで、TR 抗原と似た性質を持つ TI-2 抗原への抗体産生に関わるとの報告がある B-cell activating factor (BAFF) の発現について解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 原虫 TR 蛋白の比較解析

キネトプラスト目原虫のうち、ヒトへの病原性の報告がある *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *T. brucei*, *T. cruzi* と、ヒトへの病原性の報告の無い *L. tarentolae*, *B. saltans* について TR 遺伝子のレパートリー解析を行った。総 TR 遺伝子数やその割合については、*L. tarentolae* が若干低く、*B. saltans* が若干高いという結果が得られたが、他の種との差はそれほど顕著で無かった(表1)。一方、TR スコアの高い、つまり TR ドメインの大きな遺伝子となると、これら非病原性原虫において顕著に少ないことが明らかとなった。アクチン遺伝子など他の遺伝子配列を基にした系統樹解析では、*Leishmania* と *Trypanosoma* の遺伝的距離の方が遠いことより、TR 遺伝子の保存性には進化的時間よりも環境要因が強く働いたことが示唆された。

表1. キネトプラスト目における TR 遺伝子の割合

	<i>L. major</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. tarentolae</i>	<i>B. saltans</i>
Total genes	8412	8241	8357	9826	10342	8452	16201
150-499	45 0.53%	35 0.42%	38 0.45%	46 0.47%	79 0.76%	41 0.49%	431 2.66%
500-999	16 0.19%	9 0.11%	19 0.23%	19 0.19%	25 0.24%	3 0.04%	149 0.92%
1000-2499	17 0.20%	14 0.17%	23 0.28%	29 0.30%	55 0.53%	0 0.00%	69 0.43%
2500-4999	11 0.13%	19 0.23%	21 0.25%	24 0.24%	28 0.27%	0 0.00%	2 0.01%
5000-9999	10 0.12%	9 0.11%	9 0.11%	12 0.12%	2 0.02%	0 0.00%	0 0.00%
10000+	6 0.07%	7 0.08%	7 0.08%	6 0.06%	0 0.00%	0 0.00%	0 0.00%
TR genes	105 1.25%	93 1.13%	117 1.40%	136 1.38%	189 1.83%	44 0.52%	651 4.02%
TR >=2500	27 0.32%	35 0.42%	37 0.44%	42 0.43%	30 0.29%	0 0.00%	2 0.01%
	(25.71%)	(37.63%)	(31.62%)	(30.88%)	(15.87%)	(0.00%)	(0.31%)

(2) TR 特異的液性免疫の活性化メカニズム  
エピトープの繰返しを持つ抗原の代表的なものとして T-independent 2 抗原 (TI-2 抗原)がある。TI-2 抗原による B 細胞の活性化は BCR の架橋によっておこり、TI-2 抗原への抗体産生は T 細胞非依存的であることが知られている。本研究では、蛋白性多価抗原である TR 抗原に対する抗体産生

メカニズムについて解析を行った。Nude マウスに対する *L. donovani* 感染実験より、リーシュマニア粗抗原 (LdSLA) および TR 抗原 (rK39) 両者とも抗体産生には T 細胞が必要であることが分かった (図 1)。

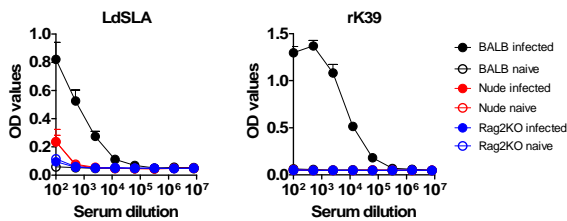


図 1 . *L. donovani* 感染マウスの抗体産生

次に、*L. donovani* 感染 BALB/c マウスにおける抗 TR 抗体のサブクラス解析を行った。非 TR 抗原に対する IgG のサブクラスは IgG1 が主要なものであり IgG3 抗体の割合が引くものに対して、TR 抗原に対しては IgG3 抗体の産生が比較的高いことが明らかとなった (図 2)。IgG3 産生は TI-2 抗原については報告があるが、蛋白抗原に対しての強い産生は報告がほとんどなく、非常にユニークな発見である。と共通するシグナルがあることが示唆された。

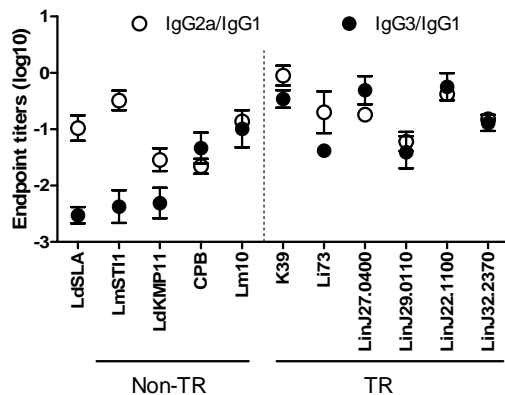


図 2 . *L. donovani* 感染マウスの抗体サブクラス

### (3) B 細胞活性化に関わる因子の探索

近年の研究より、TI-2 抗原に対する B 細胞の活性化には B cell activating factor (BAFF) が重要な役割を果たすことが明らかになってきている。BAFF の上昇が見られる疾患の多くは自己免疫疾患であり、異常な液性免疫の活性化という点で内臓型リーシュマニア症と共通点を多く持つ。そこで、*L. donovani* 感染 BALB/c マウスにおける血中 BAFF の動態を解析した。

感染マウスでは脾臓や肝臓の腫大が確認され (図 3 A, B、●)、それらの臓器では多数の原虫が観察されるが (図 3 C, D、●) AmBisome による治療により原虫の排除および臓器腫大の緩和が達成された (図 3 A-D、○)。これらマウスの血中 BAFF を測定したところ、症状の悪化と共に BAFF の

上昇が見られ、治療によって回復したマウスでは BAFF の低下が見られた (図 3 E)。

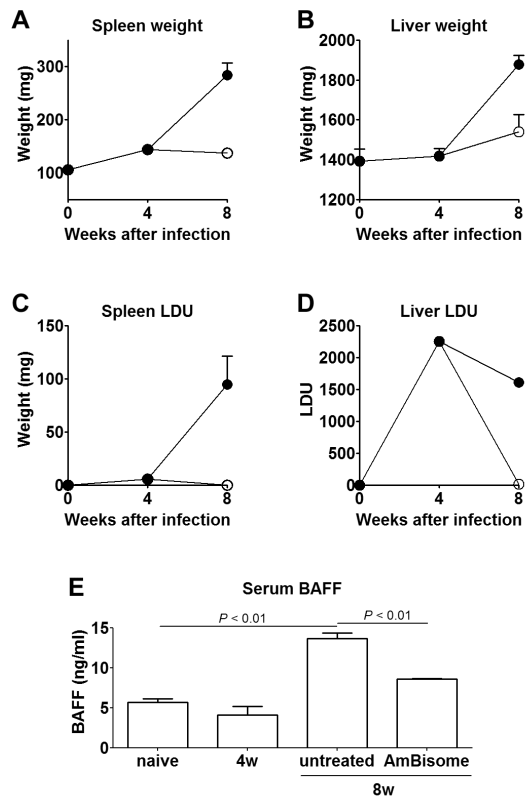


図 3 . *L. donovani* 感染マウスの血中 BAFF 濃度

次にヒト VL 患者における血中 BAFF を測定したところ、VL 患者では BAFF 濃度が上昇していた。BAFF の過剰な発現は全身性エリテマトーデスや関節リウマチ、シェーグレン症候群など自己免疫疾患の発症などに深く関わっており、現在では BAFF シグナルがこれら疾患の治療標的となっているが、VL 患者における BAFF の上昇割合は前述の自己免疫疾患と同等かそれ以上であった (図 4)。

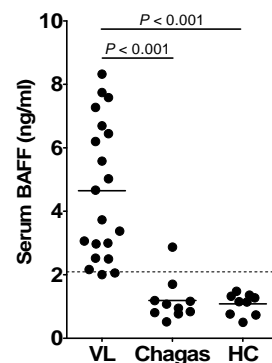


図 4 . ヒト VL 患者における血清中 BAFF 濃度

以上のことから、リーシュマニア原虫感染による病態悪化に BAFF を介した異常な液性免疫の活性化が関与する可能性が示された。

## 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)

[雑誌論文](計3件)

1. Angeles JM, Goto Y, Kirinoki M, Asada M, Leonardo LR, Rivera PT, Villacorte EA, Inoue N, Chigusa Y, Kawazu S. 2012. Utilization of ELISA Using Thioredoxin Peroxidase-1 and Tandem Repeat Proteins for Diagnosis of *Schistosoma japonicum* Infection among Water Buffaloes. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1800. doi: 10.1371/journal.pntd.0001800. 査読有
2. 松本芳嗣, 後藤康之、三條場千寿。2013年。「犬のリーシュマニア症」。日本獣医師会雑誌、66:5-7。査読無
3. 後藤康之。2012年。「リーシュマニア症に対するワクチン開発の展望」。獣医寄生虫学会誌、11:1-7。査読有

[学会発表](計28件)

### 国際学会

1. Osada Y, Seki M, Sanjoba C, Goto Y, Matsumoto Y. Susceptibility and resistance correlates with differential expansion of helper T cell subsets in experimental murine visceral leishmaniasis. *Worldleish5*. May 17, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.
2. Goto Y, Sanjoba C, Reed SG, Noiri E, Matsumoto Y. Tandem repeat proteins for serological diagnosis of visceral leishmaniasis. *Worldleish5*. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.
3. Ozbek Y, Sanjoba C, Goto Y, Noiri E, Matsumoto Y. Kala Azar in South Asia - current status and challenges ahead: vector surveillance studies in Bangladesh; hints and hopes. *Worldleish5*. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.
4. Goto Y, Yamagishi J, Sanjoba C, Reed SG, Matsumoto Y. In silico identification of vaccine antigens for leishmaniasis. *Worldleish5*. May 14, 2013, Enotel, Porto de Galinhas, Brazil.
5. Goto Y. Antigen Discovery for Serological Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Third International Conference on Neglected Tropical Diseases, Bangladesh and Scientific Meeting on Kala-azar and PKDL. Sep 2, 2012, Filaria and General Hospital, Savar, Bangladesh.

### 国内学会

1. 長田康孝、関信弥、松井洋輔、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。実験的内臓型リーシュマニア症における治療後の再感染抵抗性。第83回日本寄生虫学会大会、愛媛大学、松山、2014年3月28日。
2. 大間知聡子、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。実験的内臓型リーシュマニア症における血中IgGの異常亢進。第83回日本寄生虫学会大会、愛媛大学、松山、2014年3月28日。
3. 孫家梅、イゴーリハタンバター、Yusuf Ozbek、長田康孝、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。Anti-*Leishmania* IgE antibodies: a bio-maker for characterization of cutaneous leishmaniasis. 第83回日本寄生虫学会大会、愛媛大学、松山、2014年3月28日。
4. Angeles J, 後藤康之、桐木雅史、Leonardo L, Nicasio B, Hakimi H, Lee S, Rivera P, Villacorte E, 井上昇、千種雄一、河津信一郎。Detection of canine schistosomiasis japonica using recombinant thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins. 第83回日本寄生虫学会大会、愛媛大学、松山、2014年3月28日。
5. Wen D, Ishigami D, Goto Y, Matsumoto Y, Kanto K, Nakao Y. Search for Anti-leishmanial Compounds from Marine Sponge. 第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、神戸、2013年12月4日。
6. Sun J, Igori K, Omachi S, Osada Y, Sanjoba C, Goto Y, Matsumoto Y. Involvement of IgE responses in experimental cutaneous leishmaniasis. 第73回日本寄生虫学会東日本支部大会、国立科学博物館、東京、2013年10月12日。
7. Angeles J, 後藤康之、Leonardo L、桐木雅史、Hakimi H、Tongol-Rivera P、Villacorte W、井上昇、千種雄一、河津信一郎。Detection of canine schistosomiasis japonica using recombinant thioredoxin peroxidase-1 and tandem repeat proteins. 第54回日本熱帯医学会大会、長崎ブリックホール、長崎、2013年10月5日。
8. Dan Y, Kato K, Goto Y, Fujii Y, Hamano S. Application of tandem repeat recombinant proteins as potential antigens for the sero-diagnostic test of *Schistosoma mansoni* infection. 第54回日本熱帯医学会大会、長崎ブリックホール、長崎、2013

- 年 10 月 5 日。
9. 長田康孝、三條場千寿、木村純二、後藤康之、松本芳嗣。海藻類 *Sargassum yamadai* より単離したキノテルペノイドの抗リーシュマニア症活性。第 82 回日本寄生虫学会大会、東京医科歯科大学、東京、2013 年 3 月 31 日。
  10. Angeles J, Kirinoki M, Goto Y, Asada M, Hakimi H, Leonardo L, Rivera P, Villacorte E, Inoue N, Chigusa Y, Kawazu S. Localization and expression profiling of a 31 kDa antigenic repetitive protein Sjp\_0110390 in *Schistosoma japonicum* life stages. 第 82 回日本寄生虫学会大会、東京医科歯科大学、東京、2013 年 3 月 30 日。
  11. 後藤康之、山岸潤也、長田康孝、三條場千寿、松本芳嗣。Reverse vaccinology によるリーシュマニア症ワクチン抗原の探索。第 82 回日本寄生虫学会大会、東京医科歯科大学、東京、2013 年 3 月 29 日。
  12. Angeles J, Goto Y, Kirinoki M, Asada M, Leonardo L, Tongol Rivera P, Villacorte E, Inoue N, Chigusa Y, Kawazu S. Development of recombinant antigen-based serological diagnosis for the detection of *Schistosoma japonicum* infection in water buffaloes. 第 155 回日本獣医学会学術集会、東京大学、東京、2013 年 3 月 28 日。
  13. 長田康孝、関信弥、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。マウス実験的内臓型リーシュマニア症における Th1、Th2 の感受性、抵抗性への関与。第 155 回日本獣医学会学術集会、東京大学、東京、2013 年 3 月 28 日。
  14. 後藤康之、山岸潤也、長田康孝、三條場千寿、松本芳嗣。リーシュマニア症ワクチン抗原の有用性に寄与するパラメータの探索。第 154 回日本獣医学会学術集会、岩手大学、岩手、2012 年 9 月 16 日。
  15. Angeles J, Goto Y, Kirinoki M, Asada M, Leonardo L, Tongol-Rivera P, Villacorte E, Inoue N, Chigusa Y, Kawazu S. Evaluation of Recombinant Proteins for *Schistosoma japonicum* Infection Diagnosis among Water Buffaloes in Two New Endemic Foci in the Philippines. 第 53 回日本熱帯医学会大会、とかちプラザ、帯広、2012 年 9 月 6 日。
  16. Nguyen T, Goto Y, Lun Z, Kawazu S, Inoue N. Development of Immunochromatographic Test (ICT) for Animal Trypanosomosis. 第 53 回日本熱帯医学会大会、とかちプラザ、帯広、2012 年 9 月 5 - 6 日。
  17. 長田康孝、大間知聡子、三條場千寿、後藤康之、松本芳嗣。実験的内臓型リーシュマニア症における MRP8、14 陽性細胞の増加。第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸セミナーハウス、神戸、2012 年 8 月 26 日。
  18. 後藤康之、三條場千寿、Steve Reed、松本芳嗣。リーシュマニア原虫の抗原学。第 20 回分子寄生虫学ワークショップ、神戸セミナーハウス、神戸、2012 年 8 月 26 日。
  19. 長田康孝、三條場千寿、麻田正仁、後藤康之、松本芳嗣。実験的 *Leishmania donovani* 感染マウス血液からの原虫分離。第 153 回日本獣医学会学術集会、大宮ソニックシティ、大宮、2012 年 3 月 28 日。
  20. Angeles J, Goto Y, Kirinoki M, Asada M, Leonardo L, Tongol-Rivera P, Villacorte E, Inoue N, Chigusa Y, Kawazu S. Serological Comparison of Recombinant Thioredoxin Peroxidase-1 and Tandem Repeat Proteins for Detection of Human and Animal *Schistosoma japonicum* Infection. 第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、西宮、2012 年 3 月 24 日。
  21. 麻田正仁、薄井美帆、後藤康之、横山直明、井上昇、河津信一郎。パベシア原虫細胞内酸化ストレスの可視化。第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、西宮、2012 年 3 月 24 日。
  22. 長田康孝、三條場千寿、麻田正仁、後藤康之、松本芳嗣。内臓型リーシュマニア症 in vivo モデルを用いた AmBisome の抗リーシュマニア症活性。第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、西宮、2012 年 3 月 23 日。
  23. 後藤康之、Carter D, Duthie M, 河津信一郎、井上昇、Reed S、松本芳嗣。Commonness and uniqueness of tandem repeat antigens in the trypanosomatid parasites. 第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、西宮、2012 年 3 月 23 日。
- 〔図書〕(計 1 件)
1. Goto Y, Reed SG. 2012. Section 5, 25.2 Current approaches to the development of a vaccine against leishmaniasis. "Immunity to Parasitic Infections" (edited by Tracey Lamb), Wiley-Blackwell, 431-440.
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)
- 名称 :

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

後藤 康之 (GOTO, Yasuyuki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：50553434

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：