

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450425

研究課題名(和文)エキノкокクス感染初期(虫卵から多胞化嚢胞)における遺伝子発現の推移

研究課題名(英文) Analysis on gene expression profile in oncospheres and early stage metacystodes from *Echinococcus multilocularis*

研究代表者

奥 祐三郎 (OKU, YUZABURO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：60133716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：エキノкокクス(多包条虫)症は人獣共通感染症の一つで、北海道では野生動物間で高度に流行している。人への感染は、虫卵の経口摂取により起こり、肝臓に移行した幼虫が、定着し、嚢胞・多胞化し、その後の無制限の多胞化により、人で重篤な疾患を引き起こす。我々の研究は、この虫卵から多胞化までの感染初期における、寄生虫の様々な遺伝子発現を網羅的に解明する事を目的とした。まず、これらの初期の寄生虫からmRNAを採取し、次世代シーケンサーにより、各遺伝子の発現状況を解明した。特に、ワクチンおよび診断用抗原に焦点を絞り、発現状況を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Alveolar echinococcosis is a worldwide zoonosis of great public health concern. Analysis of genome data for *Echinococcus multilocularis* has identified antigen families that can be used in diagnostic assays and vaccine development. However, little gene expression data is available for antigens of the egg and early larval stages. To address this information gap, we used a Next-Generation Sequencing approach to investigate three different stages (non-activated and activated oncospheres, and early stage metacystodes) of *E. multilocularis* (Nemuro strain). Transcriptome data analysis revealed that some diagnostic antigen gp50 isoforms and the antigen Eg95 family dominated in activated oncospheres, and the antigen B family dominated in early stage metacystodes. Furthermore, heat shock proteins and antigen 11/3 are constantly expressed in the three stages.

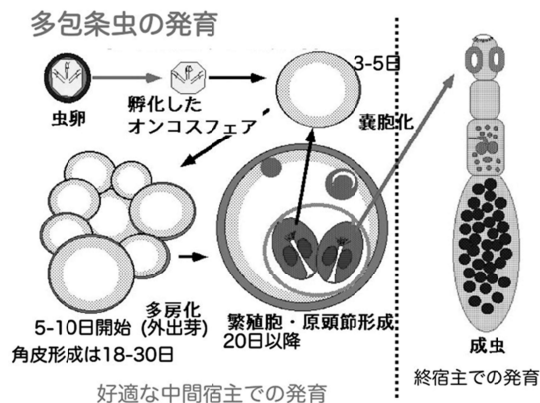
研究分野：獣医寄生虫病学

キーワード：寄生虫 感染防御 ワクチン開発 トランスクリプトーム解析 次世代シーケンサー 抗原解析 中間宿主

1. 研究開始当初の背景

エキノコックスは世界的に重要な人獣共通寄生虫である。国内においては、エキノコックスの一種である多包条虫 *Echinococcus multilocularis* が重要で、北海道におけるキツネの感染率は約40%で、野生動物間では高度の流行状態にある。人では、適切な治療を行わない場合肝臓において幼虫が無性増殖し、重篤な経過をたどため、診断および対策が重要である。人は虫卵を経口摂取して感染するため、虫卵の研究が必要とされるが、特別な実験施設がないと研究できないため、虫卵を用いた研究は遅れている。我々のグループは本種の虫卵の採取可能な感染実験研究システムを保有し、虫卵採取が可能である。

本寄生虫は、人を含む中間宿主体内では経口的に取り込まれた虫卵が、まず小腸で孵化し、六鉤幼虫となり、活性化後小腸から侵入し、肝臓実質で、嚢胞化・角皮層形成・多房化 繁殖胞・石灰小体形成および原頭節形成(分化)へと進行する(下図参照)。



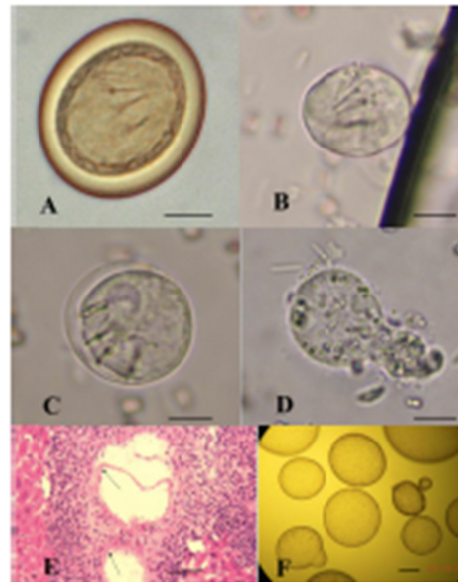
2. 研究の目的

今回、我々は次世代シーケンサーを用いて、(i)活性化前虫卵 Nonc、(ii)活性化虫卵 Aonc および(iii)感染初期嚢胞 4Wmet および(iv)培養微小嚢胞 Cmet のトランスクリプトームを解析することを目的とした。すでにサンガー研究所から公表されているゲノムデータ、成熟嚢胞、未熟成虫、受胎成虫のトランスクリプトームデータと合わせて、主要抗原の発現時期について *in silico* 解析し、特に幼

虫感染初期の診断用の抗原およびワクチン候補分子の選択を主たる目的とした。

3. 研究の方法

多包条虫の各発育段階(4検体)のmRNAの発現状態を調べるため、次世代シーケンサー IlluminaHiSeq を用いて解読した。さらに、すでに公表されている発育後期の嚢胞(原頭節を含む)および成虫も成績も利用した。



A. 虫卵 (感染したイヌの糞便より分離した) B. 孵化した虫卵(活性化前) CおよびD. 活性化した虫卵 E. 感染後初期嚢胞(感染後4週 マウス肝臓の寄生虫)、F 培養嚢胞

解読された100bp(表1)のリードを Trinity による *de novo* アセンブリにより contig 予想、もしくはサンガー研究所から公表されているゲノムデータへのマッピングにより、各 contig の FPKM 値の算出、アノテーションを行った。

4. 研究成果

これらの試料には宿主もしくは糞便細菌の混入が予想され、これらの混入遺伝子を取り除いた。各発育段階後のエキノコックス由来と予想された遺伝子の割合は虫卵由来のものは多かったが、特に感染初期病変から採

取したものでは、ほとんどが宿主由来遺伝子と考えられた(表 1)。

表 1. 各サンプル毎の解析されたリード数

| Samples | Raw Reads | Clean Reads(mouse mapped reads filtered) |
|---------|-------------|--|
| 活性化前虫卵 | 141,966,744 | 131,761,968 |
| 活性化前虫卵 | 146,847,812 | 136,531,516 |
| 活性化虫卵 | 134,400,788 | 126,184,658 |
| 感染初期嚢胞 | 132,558,666 | 231,874 |
| 培養嚢胞 | 107,407,454 | 98,702,084 |

網羅的な各発現遺伝子の発現状況(FPKM)の MA マップによる比較では、虫卵と嚢胞間で明瞭な発現状態の変化が認められた(図 1 および 2)。

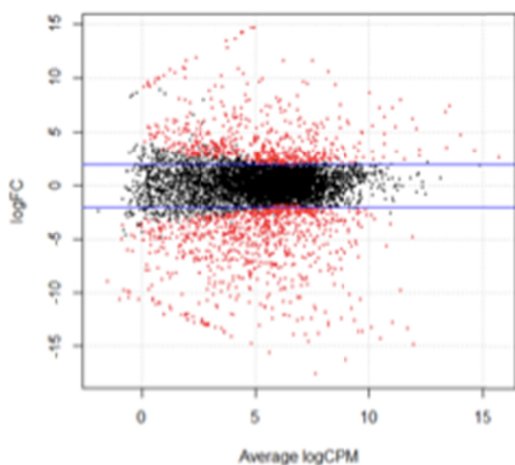


図 1. エキノコックス虫卵と嚢胞の比較

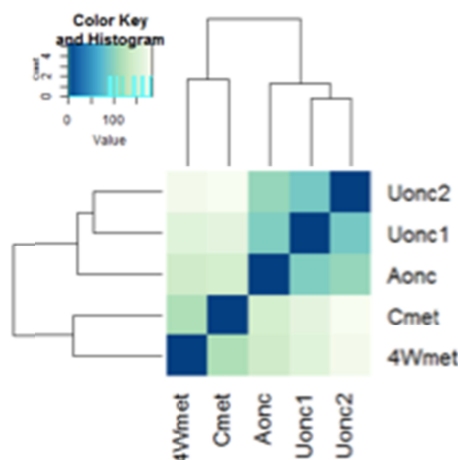


図 2. 各試料毎のヒートマップ解析結果

人のエキノコックス症診断には主に血清診断が用いられ、様々な診断用抗原が用いられてきた。特に人は非固有宿主であるため、幼虫(嚢胞)の正常な発育はまれで、感染初期の発育段階に留まる症例がほとんどと予想される。

現在使用されている幼虫感染の診断用抗原である、Antigen B、Antigen 5、EG 19、EM13 については、主に感染後期において多くの発現が見られたが、Antigen B グループでは、EnAgB8/3 は 3 種含まれ、いずれもが成虫においても発現し、EmAg B8/5 は成虫にのみ発現が見られた。虫卵では、これらの AntigenB、Eg19、Antigen 5 はほとんど発現しなかったが、EM13 と Antigen 11/3 については、すべての発育段階で発現し、特に、虫卵での発現が顕著であった。このように、EM13 と Antigen 11/3 が虫卵の段階から発現されていることは、人において感染極初期における診断が可能であることが示唆された。なお、虫卵の活性化により一部の AntigenB が急激に発現されるようになることが示された。虫卵の活性化により様々な分子の発現が増加し、全体的な代謝系の活性化が示唆された。

Taenia solium の診断用抗原として知られている糖タンパク抗原 Diagnostic antigen gp50 については、多包条虫においては 35 種の存在が予想されたが、発現量が多いものとしては 24 種あり、そのうち成虫で顕著に多いものは 15 種、虫卵で多いものは 6 種、活性化後虫卵から感染初期幼虫に多いものは 5 種あったが、成熟幼虫ではいずれも顕著な発現はなかった。*Taenia solium* においては gp50 が幼虫(嚢虫)感染における有効な抗原である事が良く知られているが、エキノコックスにおいては幼虫感染後期(通常感染が抗体検出法で診断される時期)では gp50 はほとんど発現せず、診断用抗原としては有用ではないことが示唆された。さらに、幼虫周囲は

laminated layer (LL) が取り囲み、これらは主に糖タンパクからなることがわかっているが、LL には gp50 の関与はないものと考えられ、LL の主要成分としては、他の糖タンパクの存在が予想された。近縁種である単包条虫で、LL と関連が予想されている apomucin との比較では、これらは嚢胞だけで無く、活性化前虫卵や活性化虫卵でも発現している事が予想された。

我々は今までワクチンの研究を行ない、EMY163 および TSP3 がワクチン効果を示すことを報告してきたが、これらの分子をコードする遺伝子については誤解していたものと予想された。アミノ酸配列が同じである類似した遺伝子の発現がワクチン効果として重要であることが推定された。また、ワクチンの候補分子が多数発見され、今後のワクチン研究の進展が期待された。

このように、今まで研究されてこなかった虫卵および活性化虫卵のトランスクリプトームが解明され、感染初期の診断に有効な分子の選択やワクチン候補分子の選択を可能となった。今後ともこれらのデータが多数の研究者によって共有され、今後のエキノコックス研究に寄与するものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Huang F, Dang Z, Suzuki Y, Horiuchi T, Yagi K, Kouguchi H, Irie T, Kim K, Oku Y, Analysis on gene expression profile in oncospheres and early stage metacestodes from *Echinococcus multilocularis*. PLOS Neglected Tropical Diseases (査読有り) 2016 Apr 19;10(4):e0004634. doi: 10.1371/journal.pntd.0004634.

〔学会発表〕(計 2 件)

HUANG Fuqiang, 八木欣平、孝口裕一、

入江隆夫、鈴木穰、堀内映実、金京純、党志勝、奥祐三郎 Expression level analysis of antigen in oncosphere and early stage metacestode from *Echinococcus multilocularis* 第 85 回日本寄生虫学会大会 宮崎市民プラザ 宮崎市 2016 年 3 月 19・20 日
奥祐三郎、黄福強、金京純、八木欣平、孝口裕一、入江隆夫、鈴木穰、堀内映実、党志勝 次世代シーケンサによる多包条虫の主要抗原の発現ステージの *in silico* 解析 第 158 回日本獣医学会学術集会 北里大学獣医学部 十和田市 2015 年 9 月 7-9 日

〔図書〕(計 0 件)

〔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 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

本研究で得たすべての生データ(全リード)はDDBJにDRA003058として登録した。

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥 祐三郎 (OKU, Yuzaburo)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：60133716

(2)研究分担者

八木 欣平 (YAGI, Kinpei)

北海道立衛生研究所・感染症部・部長

研究者番号：70414323

(3)連携研究者

孝口 裕一 (KOUGUCHI, Hirokazu)

北海道立衛生研究所・感染症部・研究員

研究者番号：50435567