

課題番号 : 29指2013

研究課題名 : 宿主好中球活性化機序を標的にした、赤痢アメーバ症に対する新たな治療戦略の開発

主任研究者名 : 渡辺恒二

キーワード : 好中球 (Neutrophil)、赤痢アメーバ症 (amebiasis)、腸内細菌叢 (gut microbiome)、病原体宿主相互作用 (pathogen-host interaction)、病態生理 (pathophysiology)

研究成果 :

赤痢アメーバ症は、*Entamoeba histolytica* によって引き起こされる腸管原虫症である。潜伏性持続感染による国内感染例の急速な増加が報告されると共に、現行治療では救命できない死亡例が多数報告されている。そのような現状を打破するためには、従来の治療ターゲットであった『原虫の増殖機構』以外を標的とした治療戦略の創出が急務である。本研究では、『*E. histolytica* 由来分泌因子による重症化機構』および『腸内細菌による好中球活性化・感染防御機序』を標的にした新たな治療戦略に関する研究を行っている。

1. *E. histolytica* 由来分泌因子を標的にした、新たな診断・治療法創出 (野崎分担、渡辺分担)

実験室 *E. histolytica* 株 (HM-1 株) を用いたエクソゾーム分離技術の確立

本研究では、病原体である *E. histolytica* からの分泌因子に標的を定めた検討を行うため、初年度は、エクソゾームの分離方法の確立を行った。従来、*E. histolytica* の分泌因子はタンパク質を中心とした分子が主と考えられていたが、近年、膜成分に囲まれて、その内部にタンパク質だけでなく、脂質や核酸を含むとされるエクソゾームが、マラリアや *E. histolytica* のような原虫類からも放出されることが分かってきた。一方で、*E. histolytica* 由来のエクソゾームの単離、機能解析は十分に行われていない。来年以降、これらの分離技術を用いて、機能解析を進めて行く予定である。

複数の臨床分離 *E. histolytica* 株を用いた網羅的遺伝子発現調節機構に関する解析

一方、赤痢アメーバ症を引き起こす病原体である *E. histolytica* の網羅的な病原性解析を行うため、臨床検体 (糞便や膿) から無菌培養された『臨床分離 *E. histolytica* 株』を用いて、mRNA (メッセンジャーRNA) 発現解析を行っている。その結果、肝膿瘍発症患者由来の高病原性 *E. histolytica* 株で発現が亢進している 43 遺伝子を同定した。

分泌タンパクを標的とした新たな診断法確立のための研究

また、上記のような病原性解析の他、分泌タンパクを標的とした新たな診断法確立を目指した研究を行っている。標的としては、既に米国の共同研究グループが、その構造を明らかになっているタンパク (非公開) への特異抗体を作成し、病理組織標本の免疫染色の技術を確立した。

2. 腸内細菌叢を介した宿主好中球活性化を標的とした、新たな予防・治療法創出 (渡辺分担)

腸内細菌叢との構成と赤痢アメーバ症重症度の関連性を同定するための、臨床検体を用いた解析

同一患者さんの糞便検体で、無症候性赤痢アメーバ感染時と赤痢アメーバ性腸炎発症時における腸内細菌叢の比較解析を行った。この検討により、赤痢アメーバ感染に対して感染防御に有利に働く腸内細菌叢の候補、4種類の腸内細菌科 (未公表) を特定した。また、複数かつ異なる赤痢アメーバ症の臨床病型を発症した患者さんから得られた糞便検体 (42 検体) を用いた網羅的な腸内細菌叢組成に関する解析を進めている。これらの解析から、『赤痢アメーバ症に対して感染防御に働く腸内細菌』、または『感染に不利に働く腸内細菌』を同定する予定である。

E. histolytica に対する好中球活性を評価するための評価系確立

好中球性自然免疫による抗赤痢アメーバ活性を実験室内で、定量的に評価得るための実験系を確立した。具体的には、宿主由来の細胞 (好中球) と病原体細胞である *E. histolytica* を同じ試験管内で混ぜて反応させた場合にも、それぞれの細胞を蛍光色素による標識で判別可能とし、その生存率と細胞表面抗原の発現を定量的に評価する実験系を確立した。

今後の計画としては、確立した実験系と、臨床検体から推定される「赤痢アメーバ感染に対して感染防御に働く腸内細菌」を用いて、腸内細菌叢による好中球活性化メカニズムを明らかにし、その分子機構を標的にしたプロバイオティクスの開発などを目指す。

Subject No. : 29-2013

Title : Research on analyzing pathogenesis of *Entamoeba histolytica* infection from the analyses of triangle interactions among immune systems, pathogen, and host microbiome.

Researchers : Koji Watanabe (Primary investigator), Tomoyoshi Nozaki (Co-investigator)

Key word : Neutrophil, amebiasis, gut microbiome, pathogen-host interaction, pathophysiology.

Abstract :

Amebiasis is enteric infectious disease, caused by *Entamoeba histolytica*. Increasing number of annual reported cases has been reported in recent two decades, mainly due to sexually transmitted infection. Also, critical severe cases were reported every year. Thus, it is needed for us to develop new strategies for controlling epidemiology and pathophysiology of *E. histolytica* infection. For these purpose, we are investigating the new targets of *E. histolytica* infection; 1. Exacerbation pathway by secreted proteins (or exosome) from *E. histolytica*, and 2. Disease control by gut microbiome via enhancing Neutrophil mediated host protection.

1. Investigation for “Exacerbation pathway by secreted factors from *E. histolytica*”.

For future investigation of secreted factors, including not only proteins but also exosomes, we established the method for isolating *E. histolytica* exosome from culture media of axenic laboratory strain “HM-1:IMSS”. Also, we’ve done the screening of gene expression by transcriptome analysis using *E. histolytica* isolates from clinical specimen. From this transcriptome analysis, we identified 43 genes which are expressed more in virulent strains than that in non-virulent strains. On the other hand, we are trying to develop new diagnostic method which targeting *E. histolytica* specific secreted proteins to establish the diagnostic method of antigen detection in clinical specimen. We already confirmed that detection of one secreted protein is more sensitive and specific than that of *E. histolytica* component protein in tissue histology samples. We will try to develop the diagnostic method of antigen detection in patients’ serum by ELISA next year.

2. Investigation for “Disease control by gut microbiome via enhancing Neutrophil mediated host protection.”

For future investigation of in quantitative Neutrophil protection against *E. histolytica*, we developed in vitro assay for assessing Neutrophil activation to *E. histolytica* by Flowcytometry. In this assay, Neutrophil activation and *E. histolytica* viability in the same tube and compare them before and after mixture of Neutrophils and *E. histolytica* using different fluorescence conjugated antibodies. On the other hand, in order to identify the disease protective gut microbiome during *E. histolytica* infection, we are analyzing the composition of gut microbes in stool collected from patients who developing various clinical forms of *E. histolytica* infection. From the data of one patient who showed various forms of *E. histolytica* infection in the clinical course, we identified 4 protective bacterial species of gut microbiome. Furthermore, we are now analyzing the stool samples collected from 42 different patients for determining “protective gut microbiome” and “exacerbating gut microbiome” during *E. histolytica* infection. Next year, we will try to identify the mechanism of Neutrophil mediated host protection against *E. histolytica* infection by gut microbiomes using “protective gut microbiome” by in vitro Neutrophil activation assay established in this year.

研究の概要

背景：国内赤痢アメーバ症 (*Entamoeba histolytica* 感染症)

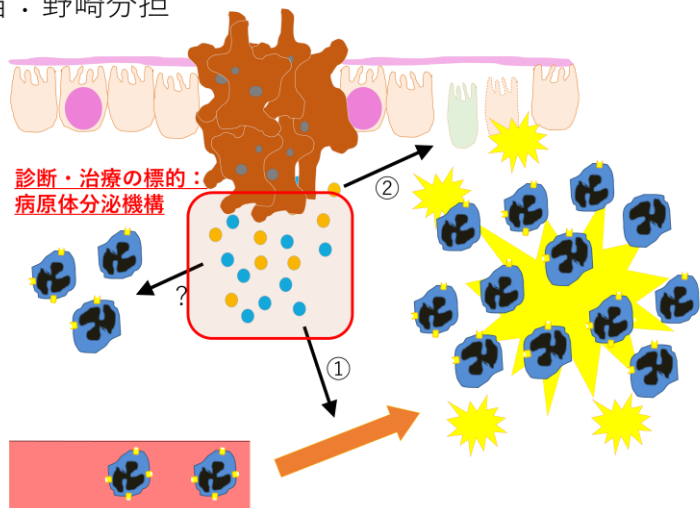
増え続ける症例数、後を絶たない重症死亡症例の報告
⇒従来の抗菌療法とは異なる治療コンセプトの創出が必要

標的と目標：*E. histolytica* の増殖機構以外の予防・治療標的の創出

下図 1. *E. histolytica* 由来分泌因子による重症化機構の解明。標的にした新規診断・治療法の創出

下図 2. 腸内細菌による好中球活性化機構の解明。標的にした予防・治療法の創出

1. *E. histolytica* 感染後期に起こる好中球活性化と組織破壊
主な担当：野崎分担



●過去の研究から明らかになっている事項：*E. histolytica* の分泌因子による好中球の誘導と組織障害

EhMIF などの IL-8 類似物質による好中球の組織への誘導とそれに続く組織内好中球数の増多、過剰な炎症 (図中①部分)

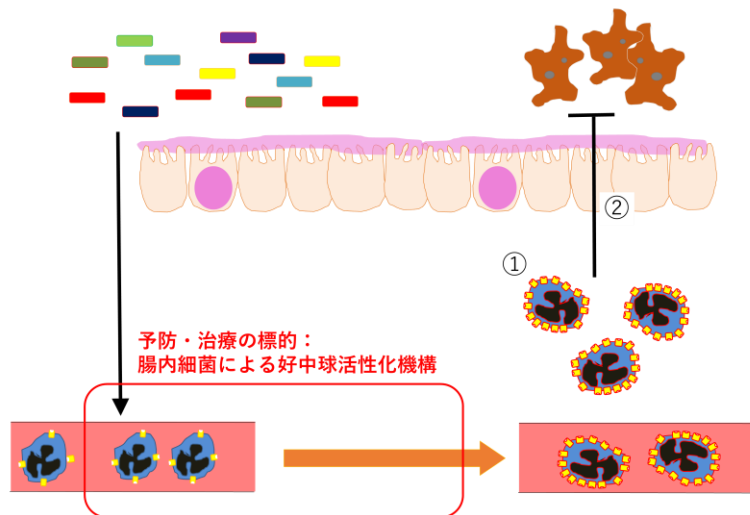
PGE2 様物質-腸管上皮細胞 EP4 レセプターを介した粘膜上皮の tight-junction 脆弱化 (図中②部分)

●研究中に明らかにすべき項目と治療戦略のターゲット (図中赤枠) の創出

これまでに知られている EhMIF や PGE2 様物質以外の *E. histolytica* 由来分泌因子 (エクソゾームなど) の網羅的検索、これらの分泌因子が個々の好中球機能へ与える影響 (主に抗 *E. histolytica* 作用) の解析。

E. histolytica 由来分泌因子の分泌機構もしくは分泌された分子をターゲットにした治療戦略の検証。

2. 腸内細菌による好中球活性化と感染防御能向上
主な担当：渡辺分担



●過去の研究から明らかになっている事項：腸内細菌の刺激による、好中球の活性化 (組織内および血管内)

ケモカインレセプターなどの表面抗原増加 (図中①部分)

ミエロペルオキシダーゼ活性の増加 (図中②部分)

*ただし、好中球の数は増えない。

●研究中に明らかにする事項と治療戦略ターゲット (図中赤枠) の創出

腸内細菌が好中球を活性化する分子機序、そのトリガーとなる腸内細菌由来の分子の同定 (図中?部分)

活性化好中球を介して外来病原体の侵入から宿主を守る、宿主好中球を標的にした治療戦略の検証。

初年度の研究成果

1. *E. histolytica* 由来分泌機構を標的にした研究（担当：野崎）

- ・実験室 *E. histolytica* 株 (HM-1株) を用いたエクソゾーム分離技術の確立：*E. histolytica* 由来分泌因子として、タンパクだけでなくエクソゾームを分離する技術を確認し、分泌因子の網羅的解析の準備を進めた。
- ・臨床分離 *E. histolytica* 株を用いた網羅的な遺伝子発現解析による病原性遺伝子スクリーニング：臨床的に高病原性が判明している *E. histolytica* の遺伝子発現比較解析により、高病原性遺伝子 43 遺伝子を同定した。この中で、分泌因子に関わる遺伝子同定検索を進めている。
- ・分泌タンパクを標的とした新たな診断法検証：赤痢アメーバ症発症患者検体を用いて、分泌タンパクを標的とした診断法の確立を進めている。

2. 腸内細菌叢を介した宿主好中球活性化機構を標的にした研究（担当：渡辺）

- ・臨床検体を用いた腸内細菌叢の解析：同一患者で赤痢アメーバ症の病型が経時的に変化した患者検体の比較検証から、赤痢アメーバ感染に対して感染防御に働く腸内細菌の候補、4 種類の腸内細菌科を特定。複数かつ異なる赤痢アメーバ症の臨床病型を発症した患者検体での腸内細菌叢比較検証は、現在解析中。
- ・*E. histolytica* に対する好中球活性を、試験管内で評価する評価系の確立：宿主由来の細胞 (好中球) と病原体細胞である *E. histolytica* を同じ試験管内で混ぜて反応、それぞれの細胞を蛍光色素による標識で判別可能とし、その生存率と細胞表面抗原の発現を定量的に評価する実験系を確立した。
- ・今後、「赤痢アメーバ感染に対して感染防御に働く腸内細菌」を用いて、腸内細菌叢による好中球活性化メカニズムを明らかにする。

課題番号 : 29指2013

研究課題名 : 宿主好中球活性化機序を標的にした、赤痢アメーバ症に対する新たな治療戦略の開発

分担研究課題名 : 腸内細菌叢による宿主好中球活性化機構をターゲットにした治療戦略に関する研究

主任研究者名 : 渡辺恒二

分担研究者名 : 渡辺恒二

キーワード : 好中球 (Neutrophil)、赤痢アメーバ症 (amebiasis)、腸内細菌叢 (gut microbiome)、病原体宿主相互作用 (pathogen-host interaction)、病態生理 (pathophysiology)

研究成果 :

赤痢アメーバ症の重症度は、宿主遺伝的素因 (宿主因子)、病原体 *E. histolytica* の遺伝的素因 (病原体因子) だけでなく、病原体が生息する腸内環境 (環境因子) によっても影響を受けることが、研究者らの研究によって、明らかにされてきた。特に、研究者らは、腸内細菌の存在が宿主の好中球機能に大きな影響を及ぼすことを、マウスのアメーバ性腸炎モデルで明らかにしている。本分担研究では、宿主の感染防御に好影響を与える腸内細菌を同定し、その防御機構の詳細を明らかにすることを目的としている。具体的には、①赤痢アメーバ感染に対する感染防御に有利に働く腸内細菌の同定すること、②そのような腸内細菌が宿主好中球の活性化・赤痢アメーバ症への感染防御を誘導するための分子学的機序を明らかにすることを目標に、検討を行っている。研究初年度にあたる本年度は、上記目的を達成するために、以下のような研究を行った。

1. 腸内細菌叢との構成と赤痢アメーバ症重症度の関連性を同定するための、臨床検体を用いた解析

同一患者さんの糞便検体で、無症候性赤痢アメーバ感染時と赤痢アメーバ性腸炎発症時における腸内細菌叢の比較解析を行い、赤痢アメーバ感染に対して感染防御に有利に働く腸内細菌叢の候補、4種類の腸内細菌科 (具体的な細菌名などは専門誌への論文投稿中のため未公開) を特定した。一方、同解析の中で、赤痢アメーバ感染に対して感染防御に不利に働く腸内細菌叢の候補、12種類の腸内細菌科 (未公開) の同定にも成功している。一方、上記のような同一患者さんの経時的な腸内細菌叢の変化だけでなく、複数かつ異なる赤痢アメーバ症の臨床病型を発症した患者さんから得られた糞便検体 (42 検体) を用いて、網羅的な腸内細菌叢組成に関する解析も進めている。具体的には、アメーバ感染例から得られた 30 検体 (腸炎 21 件、肝膿瘍 2 件、無症候性感染 7 件)、アメーバ非感染腸管感染症 12 検体を用いた解析を行っており、解析中である。

2. *E. histolytica* に対する好中球活性を評価するための評価系確立

1 年目の本年度は、好中球性自然免疫による抗赤痢アメーバ活性を実験室内で、定量的に評価得するための実験系を確立した。具体的には、宿主由来の細胞 (好中球) と病原体細胞である *E. histolytica* を同じ試験管内で混ぜて反応させた場合にも、それぞれの細胞を特殊な蛍光色素で標識し、Flow Cytometry という特殊な装置により、その生存率と細胞表面抗原の発現による活性化指数を定量的に評価する実験系を確立した。今後の計画としては、これらの実験系を用いて、1. から推定される「赤痢アメーバ感染に対して感染防御に働く腸内細菌」により刺激した好中球の、抗酸化活性や抗アメーバ赤痢活性を評価し、腸内細菌叢による好中球活性化メカニズムを明らかにし、その分子機構を標的にしたプロバイオティクスの開発などを目指す。

3. その他

前述のように、本研究では、腸内細菌叢による宿主免疫特に好中球による感染防御を中心に研究している。一方、病原体である *E. histolytica* が宿主好中球の活性化を引き起こしているという報告も成されている。研究者らは、これまでに集積された技術を活かし、臨床検体 (糞便や膿など) から、*E. histolytica* の無菌培養し、実験室内で継代している。これらの無菌培養された *E. histolytica* 株を用いて、その病原性解析を行っている。中でも、好中球活性に影響を与えることが予測される *E. histolytica* の分泌タンパク (先行特許申請中のため非公開) に関する解析を進め、そのタンパクを標的とした新たな診断・治療法を模索している。本年度、アメリカの研究者と共に先行特許を申請し、来年度は本特許取得を目指して研究を行う予定である。

課題番号：29指2013

研究課題名：宿主好中球活性化機序を標的にした、赤痢アメーバ症に対する新たな治療戦略の開発

分担研究課題名：*Entamoeba histolytica* の病原性機構を中心とした、体内での腸内細菌および宿主免疫との相互作用を解明する研究

主任研究者名：渡辺恒二

分担研究者名：野崎智義

キーワード：

研究成果：

赤痢アメーバが放出する分泌因子、特に微小小胞(細胞外マイクロベシクル)を介して放出される因子による宿主好中球の活性への影響を病原体の側から理解することを目的として、通常は無菌培養条件下で *E. histolytica* 栄養型の放出するエクソソーム(後期エンドソーム由来でエクソサイトーシスにより生じる; 内径 30-50nm) 及びエクトソーム(細胞質由来で細胞膜の出芽により生じる; 100-350nm) の解析を行った。これまでに既に、培養液中に放出される微小小胞の単離のプロトコルを確立した。100kDa カットオフのフィルターで細胞やオルガネラを除去した後、超遠心により簡便に微小少々胞を濃縮する方法を確立した。これまでの解析により、過酸化水素やパラコートなどの酸化ストレスに暴露されると細胞外マイクロベシクルの終了が増えることが観察されており、異なった環境下でのプロファイリングを行っている。また、現在エクソソームの収率を更に向上すプロトコルを検討中である。

更に、エクソソームの膜上で細胞との相互作用やシグナル伝達に関与していることの知られるテトラスパニンの解析を行った。テトラスパニンは4回膜貫通型タンパク質でN及びC末端に細胞質側に向けた短鎖部分、二つの小大の細胞外ループ(EC1 及び EC2 domain; EC2 domain は CCG motif を有する) を有する。最新のゲノム探索では赤痢アメーバのゲノム中には16種類の遺伝子が存在確認した。これらは進化的に3つの群に大別された。興味深いことに、2つのテトラスパニン(EHI_022890 and EHI_174220)は赤痢アメーバミトコンドリアのプロテオームから過去に同定されていた。また、EHI_075690 遺伝子は遺伝的背景が全く同一の(isogenic)株において、発現量が病原性と逆相関していた。以上の16遺伝子のうち系統解析と mRNA の発現レベルに基づいて代表的なものを8選択し、HA 標識を付加したテトラスパニンを発現する *E. histolytica* 形質転換体の作成に成功した。細胞内局在と生理機能を明らかにするために、HA 標識を付加したテトラスパニンを発現する赤痢アメーバを作成し、局在解析を行ったところ、その多く(EHI_022890, EHI_174220, EHI_024370, EHI_075690)が細胞内の既知のエンドソーム、小胞体、ミトコンドリアと異なる未同定の小胞に局在し、これらの小胞が細胞外小胞の形成に関与する可能性が示唆された。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指2013

研究課題名：宿主好中球活性化機序を標的にした、赤痢アメーバ症に対する新たな治療戦略の開発

主任研究者名：渡辺恒二

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Learning from the research on amebiasis and gut microbiome: Is stimulation by gut flora essential for effective neutrophil protection from external pathogens?	Watanabe K, and Petri WA Jr.	Gut Microbes	25:1-5.	2018
A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis.	Shirley DT, Farr L, Watanabe K, Moonah S.	Open Forum Infectious Diseases	5(7)	2018
Entamoeba Species in South Africa: Correlations With the Host Microbiome, Parasite Burdens, and First Description of Entamoeba bangladeshi Outside of Asia.	Ngobeni R, Samie A, Moonah S, Watanabe K, Petri WA Jr, Gilchrist C.	Journal of Infectious Diseases	216(12)	2017

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Seroprevalence of E. histolytica infection among individuals who have tested voluntary counseling and testing for sexual transmitted infections in Japan.	Yanagawa Y, Nagashima M, Shinkai T, Kikuchi Y, Gatanaga H, Oka S, Sadamasu K, and Watanabe K.	ASM microbes	Atlanta, USA	2018年6月
A lineage-specific mitosomal membrane protein possibly involved in vacuole-mitosome contact in Entamoeba histolytica.	Santos HJ, Hanadate Y, Imai K, and Nozaki T.	The U.S. -Japan Cooperative Medical Science Program. The 48th Joint Conference on Parasitic Diseases,	Nagasaki, Japan	2018年2月
Vesicular and lipid trafficking in Entamoeba histolytica.	Nozaki T.	XIVth International Conference of Parasitology	Deagu, Korea	2018年8月
病原性遺伝子解析による赤痢アメーバ重症化機構の解明	柳川泰昭, 渡辺恒二, 津久井久美子, 野崎智義.	第20回白馬シンポジウム	鹿児島, 日本	2018年9月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当無し				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

研究発表及び特許取得報告について

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当無し				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。