

- 16) 米本圭吾, 千葉明生, 杉本真也, 斎藤 充, 金城雄樹, 丸毛啓史, 水之江義充. 黄色ブドウ球菌のバイオフィルム・病原性における分泌タンパク質 Eap と細胞壁アンカータンパク質 SasG の多様な機能の解明. 第 41 回日本分子生物学会年会. 横浜, 11 月.
- 17) 金城雄樹. NKT 細胞の α ガラクトシルセラミド類似細菌糖脂質の認識および感染免疫における役割. 第 24 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会. 横浜, 12 月.
- 18) Takatsuka S¹⁾, Hayashizaki K, Ueno K¹⁾ (¹ NIID), Kubo M (Tokyo Univ Sci), Kinjo Y. The critical role of IL-21+ NKT cells in the formation of germinal center B cells by a protein-based pneumococcal vaccine. 第 47 回日本免疫学会学術集会. 福岡, 12 月.
- 19) 金城雄樹. (特別講演 1) 高病原クリプトコックスに対する感染防御機構. 第 2 回東北医真菌研究会. 仙台, 12 月.
- 20) 金城雄樹, 高塚翔吾¹⁾, 川久保俊¹⁾, 林崎浩史, 宮崎義継¹⁾ (¹ 国立感染症研究所). 糖脂質に着目した肺炎球菌感染防御. 第 5 回糖鎖免疫研究会. 東京, 2 月.

熱帯医学講座

講座担当教授：嘉糠 洋陸 衛生動物学・寄生虫学
 教授：石渡 賢治 寄生虫感染と粘膜免疫

教育・研究概要

I. マウスに慢性感染する消化管寄生線虫に対する新しい再感染防御

ヒトの消化管寄生線虫感染モデルとしてマウスの小腸に慢性感染する *Heligmosomoides polygyrus* が利用されている。本線虫は、宿主に飲み込まれた感染幼虫が小腸組織に侵入し筋層で発育後、8日頃に成熟して管腔へ戻り2ヶ月以上寄生する。この感染を駆虫薬投与で終息して4週後に再感染させると、二度目に感染させた *H. polygyrus* は管腔に戻って1週間も経たないうちに宿主免疫によって排除されることから、とくに再感染防御モデルとしてしばしば用いられている。しかしながら、筋層で発育している感染後6日の *H. polygyrus* を初感染と再感染で比較すると、後者で少ないことがわかった。これは、再感染させた感染幼虫が粘膜組織に侵入できない可能性を示している。このことを確認する目的で感染後1日から6日までの感染動態を調べた。その結果、予想外に感染後1日にはほとんどが胃粘膜組織から回収され、2日からは小腸組織を6等分したうちの上部1/6に最も多く存在していた。感染後1日の回収される総数に初感染と再感染で差を認めないが、2日の小腸上部1/6からの回収数に両方で差を認め、6日には有意に再感染で少なかった。これは、再感染時の胃粘膜への侵入によって免疫記憶が刺激され、1日から2日にかけて *H. polygyrus* が胃から小腸上部1/6に移動する際に、粘膜侵入を阻止するという形で再感染防御が起きていると考えられる。この新しい再感染防御に特異性があるのか明らかにできていないが、この機序を明らかにすることによって新しい粘膜防御相を提示できる可能性がある。

II. 改良マゴットセラピー (Maggot Debridement Therapy: MDT) に向けた高機能マゴットの樹立

MDTとは、ヒロズキンバエ幼虫が患者の壊死組織だけを摂食する性質を利用し、人体の難治性創傷

を治療する方法である。MDTは長い歴史を持つが、ヒトの創傷治療に適したマゴットの選抜や解析はこれまでおこなわれていない。そこで本研究ではヒト創傷治療に短期間で高い治療効果を上げるMDTの開発に向け、ヒト壊死組織に適応性の高いマゴット系統の樹立と解析を進めている。これまでに、ヒト遺体から採取した野生由来の新規ヒロズキンバエ系統を複数系統樹立し、治療用標準系統を対照としてデブリードマン能力および創傷再生能力の比較をおこない、系統の評価を実施した。この結果、新規ヒロズキンバエ系統は、治療用標準系統と比較しヒト組織をより多く摂食することから、高いデブリードマン能力をもつと考えられた。また、これら新規系統マゴット外分泌液を培養細胞に添加した群では、標準系統の外分泌液添加群と比較して、細胞増殖がより促進されることも明らかにした。つまり、新規系統は外分泌液による創傷治癒能力がより高い可能性が示唆された。そこで、このような新規系統がもつ高いデブリードマン能力と肉芽形成能を支える分子基盤を明らかにするため、新規系統と治療用標準系統を対象に、RNAシーケンス解析による網羅的遺伝子発現比較解析をおこなった。その結果、新規系統では1,623個の遺伝子が高く発現しており、1,370個の遺伝子発現量は低いことが示された。従って、新規系統は現在の治療用標準系統と異なる遺伝子発現パターンを有することが明らかとなった。今後、本研究で見出された野生由来系統等の解析を進め、効果的なMDTに関与する遺伝的背景とその候補遺伝子が同定できれば、遺伝子改変技術により機能を増強したヒロズキンバエ系統の作出が可能になると期待される。

Ⅲ. 昆虫病原性糸状菌による蚊行動制御メカニズム

デング熱などの感染症は蚊の吸血行動によって媒介される。このため、アフリカなどは蚊の防除を目的としてDDTなどの合成化学殺虫剤の屋内壁への残留噴霧、および殺虫剤練り込み蚊帳法が势力的に実施されている。しかし、これら合成化学殺虫剤に対する蚊の感受性低下や著しい抵抗性の発達が確認されており、従来の化学農薬中心の防除では十分な効果が得られず、薬効の喪失が懸念されている。そこで、生物防除資材であり農業害虫防除の場面で広く利用されてきた真菌などの昆虫寄生菌に注目した。真菌の中には蚊類に寄生し死に至らしめる昆虫寄生菌が存在する。本研究では、昆虫寄生性真菌の一種である *Beauveria bassiana* について、蚊操作性（病原性・行動）について分子生物学的・生化学的解析

を試みた。日本国内および西アフリカのブルキナファソで採集した蚊から分離した昆虫寄生菌をネッタイシマカに感染させ、感染後からの生存率を精査した。その結果、B60-2感染蚊は他の菌株感染蚊と比較して高い致死率を示した。さらにB60-2株の高い病原性因子を明らかにするため、B60-2株とB9-3-1株（病原性の低い菌株）を用いて培養上清中に分泌されるタンパクの比較成分分析を実施することで、B60-2株において特異的に分泌される候補分子を見出した。さらなる解析により、*B. bassiana* 側の病原性因子とその機能の解明により、新規ベクターコントロール法の確立に貢献することが期待される。

Ⅳ. ヤブカにおける吸血行動制御機構

蚊の吸血行動は、感染症の病原体である寄生虫やウイルスがヒトや動物へと伝播する根源の行動である。そのため、吸血行動を司る機構を理解し制御することが望まれる。吸血前に蚊が吸血標的へと誘引される機構の研究は盛んであり、吸血標的が発する熱・二酸化炭素・匂いが大きな役割を果たすことが解明されている。しかし、嗅覚機能を失った蚊や二酸化炭素の認識が不可能な蚊も、標的を認識できることから、これらの要素の相乗効果が示唆されている。このため、現段階では吸血標的に寄らない蚊を人為的に作出することは困難である。そこで本研究では吸血を制御する分子機序の解明を目指すことにより、従来とは異なった作用点で蚊の行動を操作するための基盤を築く。蚊は数分の吸血前後で同じ標的に対して誘因と逃避という真逆の行動を示すため、吸血開始と停止は、標的認識の下層にある誘引と回避のスイッチングと関連していると考えられる。

吸血前後の行動シフトを制御している分子を探索するために、吸血前後で発現が変動している分子をRNAseq解析によって明らかにした。ネッタイシマカの頭部を用いて解析を行ったところ、吸血後に発現変動する分子として、シャペロンタンパク質や自然免疫に関わる分子群が多数得られた。加えて興味深い分子として、味覚制御を行う可能性のある transient receptor potential like (TRPL) と嗅覚制御を行う可能性のある dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 2 (DYRK2) が得られた。現在これら2種の遺伝子に関して、CRISPR/Cas9を用いてネッタイシマカの変異体作製を完了したところである。今後これらの変異体の吸血行動を観察することにより、吸血に与える影響を検証する。また、TRPLは、ショウジョウバエに

において、クスノキ精油であるカンファーによって直接的に活性化されることが報告されていたため、ネッタイシマカ TRPL もカンファーによって活性化されるかを検討した。ネッタイシマカ TRPL を一過的に発現したショウジョウバエ S2 細胞にカンファーを添加してカルシウムイメージングを行ったところ、カンファー添加 5～30 秒後に蛍光の上昇が観察され、ネッタイシマカ TRPL がカンファーに反応していることが判明した。また、吸血促進剤である ATP 緩衝液にカンファーを添加したものをネッタイシマカに擬似的に吸血させたところ、ATP 緩衝液のみを吸血させた際に比べて吸血率が減少した。この際に、溶液に針を刺して味見する過程には異常が観察されなかったため、ネッタイシマカは味覚的にカンファーを忌避していること、さらにその受容には TRPL が関与していることが示唆された。上述の TRPL 変異体にカンファーを疑似吸血させることにより、今後カンファー認識に関わる TRPL の機能も解明する予定である。

「点検・評価」

1. 研究について

講座が対象とする研究領域は、衛生動物学を中心に、原虫学および蠕虫免疫学も加えた陣容になっている。衛生動物学については、病原体媒介節足動物のみならず、創傷治癒等に使用されるウジ虫治療や法昆虫学など Medical Entomology の名にふさわしい研究課題も扱っている。研究対象となる病原体はウイルスから細菌、原虫、蠕虫まで多岐に渡り、中間宿主等も取り揃えていること、感染実験に特化した各種実験室を有していることなどの特色を生かして、各種病原体の生活環全体を俯瞰的に構築できることが最大の強みとなっている。4 年目を迎えた AMED のプロジェクト研究費により、本年度から昆虫生態学のキャリアを有するポスドク研究者 1 名が参画し、衛生動物学の研究遂行体制が強化された。また、新たに 1 名の本学大学院博士課程学生が加入し、若手感染症研究者のリソースとして研鑽を積んでいる。新規研究課題の立ち上げや既存課題の進展に際し、研究材料の導入や技術の習得、共同研究の受入等を躊躇しない姿勢は本年度も堅持され、各研究テーマが十分に深化したと評価する。特筆すべきは、媒介蚊種における CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術が実質化され、病原体・宿主間相互作用や、蚊の神経科学・生理学的特徴などの解析を目指した関連実験の幅が飛躍的に広がったことである。また、十年来共同研究を実施している西アフリカ・ブルキ

ナファソ国において、国立ワガ第一大学に設置した本学サテライトラボを積極的に活用している。これにより、デングウイルス媒介ヤブカを対象にしたゼノモニタリングを実施し、媒介蚊側から流行状況を推測する方法の確立に成功する等、国際共同研究がさらに進展した。また、本学において、節足動物媒介性感染症の国際シンポジウムを開催した。同シンポジウムは本学の支援を受け 5 回目を迎え、最先端研究を実施している衛生動物学者と有機的連携を構築するプラットフォームとして大いに機能している。熱帯医学は寄生虫学・医動物学・感染症学などを内包し、その研究対象も多岐に渡る。当講座は、伝統的に講座構成員が個別の課題に取り組む姿勢を堅持している。感染症が研究対象ゆえ、重要な課題は時々刻々と変化し、また研究そのものの技術革新も進んでいることから、より普遍的で新しい概念を常に模索する姿勢が肝要である。また、突如出現する新興・再興感染症について、社会の公衆衛生学的需要に応え、流動的に対応できる研究実践力を身に付けることが望ましい。

2. 教育について

全教員がコース臨床基礎医学のユニット「寄生虫と感染」の講義と実習、ユニット「感染・免疫テュートリアル」、コース研究室配属を、一部教員がコース臨床基礎医学のユニット「免疫と生体防御」を担当した。寄生虫症自体はマイナーな鑑別疾患でありながら、何れの診療科にも患者が現れる可能性があるステルス型疾患であることから、従来のコアカリキュラムに準拠しつつも医療現場のニーズに則した講義・実習を心掛けた。加えて、寄生虫症等感染症の国内での疾病構造の急激な変化、および国際社会の発展に伴う熱帯由来感染症のボーダーレス化を踏まえ、講義内容および学習順序等の再検討と、実習内容（特にトリパノソーマ症・リーシュマニア症などグローバルな再興感染症に該当する寄生虫症）の追加拡充を実施した。実習では、学生数増への対応と教育効果上昇を指向したグループ別のローテーション型実習に適宜改良を加えて実施した。次年度以降も講義・実習の一部を流動的に扱い、新興・再興寄生虫症に対応可能な医学教育を試みる。また、医学科学生のキャリアパスの多様化に伴い、将来の海外での活動を指向する学生に向けた、講座独自の海外渡航支援を本年度も実施した。コース研究室配属の枠組みを利用し、大学間協定を結んでいる国立ワガ第一大学において、医学科 3 年生 2 名が教員同伴のもと医学研究を約 2 週間実施した。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Kametani Y¹⁾, Yamada Y¹⁾²⁾ (1 Tokai Univ), Takabayashi S³⁾, Kato H³⁾ (3 Hamamatsu Univ Sch Med), Ishiwata K, Watanabe N, Sasaki E²⁾ (2 Central Inst Experimental Animals), Habu S (Juntendo Univ). The response of common marmoset immunity against cedar pollen extract. *BioSci Trends* 2018; 12(1): 94-101.
- 2) Kouguchi H¹⁾, Irie T¹⁾, Matsumoto J (Nihon Univ), Furuoka H (Obihiro Univ Agriculture Veterinary Med), Ishiwata K, Nakao R (Hokkaido Univ), Yagi K¹⁾ (1 Hokkaido Inst Public Health). Gene expression profiles of the small intestinal mucosa of dogs repeatedly infected with the cestode *Echinococcus multilocularis*. *Data Brief* 2018; 17: 180-3.
- 3) Nagashima K¹⁾, Yamano Y¹⁾, Sugimoto S¹⁾, Ishiwata K, Kanuka H, Otsuka H (Yasuda Women's Univ), Matsunami K¹⁾ (1 Hiroshima Univ). Nematocidal compounds of *Peperomia japonica*. *Phytochemistry Lett* 2018; 27: 30-5.
- 4) Tabakawa Y¹⁾, Ohta T¹⁾, Yoshikawa S¹⁾, Robinson EJ (Imperial Coll London), Yamaji K, Ishiwata K, Kawano Y¹⁾, Miyake K¹⁾, Yamanishi Y¹⁾, Ohtsu H (Tekiju Rehabilitation Hosp), Adachi T¹⁾, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H¹⁾ (1 Tokyo Med Dent Univ). Histamine released from skin-infiltrating basophils but not mast cells is crucial for acquired tick resistance in mice. *Front Immunol* 2018; 9: 1540.
- 5) Obata-Ninomiya K¹⁾, Ishiwata K, Nakao H¹⁾, Endo Y¹⁾, Ichikawa T¹⁾, Onodera A¹⁾, Hirahara K¹⁾, Okamoto Y¹⁾, Kanuka H, Nakayama T¹⁾ (1 Chiba Univ). CXCR6⁺ST2⁺ memory T helper 2 cells induces the expression of major basic protein in eosinophils to reduce the fecundity of helminth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(42): E9849-58.
- 6) Kido T, Ishiwata K, Suka M, Yanagisawa H. Inflammatory response under zinc deficiency is exacerbated by dysfunction of the T helper type 2 lymphocyte-M2 macrophage pathway. *Immunology* 2019; 156(4): 356-72. Epub 2019 Jan 21.
- 7) Ote M, Kanuka H. A highly secure method for rearing *Aedes aegypti* mosquitoes. *Trop Med Health* 2018; 46: 16.

II. 総説

- 1) Yamaji K, Aonuma H, Kanuka H. Distribution of tick-borne diseases in Japan: past patterns and implications for the future. *J Infect Chemother* 2018;

24(7): 499-504.

III. 学会発表

- 1) 橋本晃生, 吉田拓磨, 大塚沙緒里, 青沼宏佳, 嘉糠洋陸. ヒロズキンバエ系統改良による新規マゴツセラピー法の開発. 日本昆虫学会第78回大会. 名古屋, 9月.
- 2) Hashimoto K, Aonuma H, Kanuka H. Fly for medicine: a new *Lucilia sericata* strain for maggot debridement therapy. 13th Japanese Drosophila Research Conference (JDRC13). Kyoto, Sept.
- 3) 橋本晃生, 吉田拓磨, 青沼宏佳, 西郷暁生, 杉本紗里, 大塚沙緒里, 岩橋公晴, 宮脇剛司, 嘉糠洋陸. 東京都下のヒロズキンバエ地域個体群におけるヒト組織摂食量変異と大型化. 第6回日本マゴツセラピー症例検討会. 京都, 12月.
- 4) 石渡賢治. (教育講演) 宿主-寄生体相互作用の魅力. 第78回日本寄生虫学会東日本支部大会. 下野, 10月.
- 5) 大手 学, 嘉糠洋陸. ボルバキアによる宿主母性RNAとRNAウイルスの制御. 第63回日本応用動物昆虫学会大会. つくば, 3月.
- 6) Ote M, Kanuka H. Vector control strategies utilizing symbiotic bacteria *Wolbachia*. The 3rd International Joint Symposium Promotion of Infectious Disease Research Cooperation between Africa and Japan toward Science, Technology and Innovation. Accra, Nov.
- 7) Ote M, Minakuchi M, Kanuka H. RNAs as potential targets for *Wolbachia*-mediated phenomena. *Wolbachia* Conference 2018. Salem, June.
- 8) 大手 学, 水口萌子, 嘉糠洋陸. 共生細菌ボルバキアによるヤブカでのRNAウイルス抑制機構. 第53回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 下都賀郡, 6月.
- 9) 高柳咲乃, 岡本直樹¹⁾, 山中直岐¹⁾ (1 カリフォルニア大リバーサイド校), 嘉糠洋陸. Dissecting overwintering mechanism of Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. 第30回高遠シンポジウム. 伊那, 8月.
- 10) 高柳咲乃, 岡本直樹¹⁾, 山中直岐¹⁾ (1 カリフォルニア大リバーサイド校), 嘉糠洋陸. ヒトスジシマカ卵の越冬メカニズムにおける遺伝的基盤の解明. 第6回生態進化発生コロキウム. 東京, 12月.