

Studies on transmission of leishmaniasis and mechanisms of parasite persistence in the liver

(リーシュマニア症の伝播および原虫の肝臓内存続機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

Leishmaniasis is a zoonotic protozoan disease caused by the genus *Leishmania* species. Parasites are transmitted by the bite of female phlebotomine sand flies. The increase in risk factors for leishmaniasis is worldwide. Some risk factors are due to natural environmental changes, which may cause changes in the distribution and feeding behaviour of sand fly vectors. Others are the man-made changes such as migration and deforestation, or changes in the human host's susceptibility to infection such as immunosuppression.

In chapter I, the identification of phlebotomine sand fly species and their blood meals in the endemic areas of cutaneous leishmaniasis in Pakistan was studied. PCR-restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of the insect 18S ribosomal RNA gene was developed to distinguish the *Phlebotomus* and *Sergentomyia* species. The female sand flies identified were *P. papatasi* (7.4%), *P. alexandri*-like sandflies (3.4%), *S. clydei*/*S. ghesquierei*/*S. magna* (68.6%), *S. dubia* (17.1%) and *S. dentata* (3.4%). Amplification and sequencing of the vertebrate cytochrome *b* gene in blood-fed sand flies revealed that *P. papatasi* fed on cattle and wild rat whereas *P. alexandri*-like specimens fed on human, cattle, goat and dog. Although *Sergentomyia* species are generally known to feed on cold-blooded animals, *S. clydei*, *S. dubia*, and *S. ghesquierei* preferred humans, cattle, goat, sheep, buffalo, dog, donkey, wild rat and Indian gerbil. The epidemiological significance of the zoophilic feeding of various host species by phlebotomine sand flies in Pakistan is further required to study for better understanding the zoonotic transmission of sand fly-borne pathogens and for appropriate management of the vectors.

In chapter II, the study is aimed to improve the understanding of mechanisms of hepatic *L. donovani* persistence in an immunocompromised condition using alymphoplastic *aly/aly* mice. Hepatic parasite burden, granuloma formation, expression of cytokine/chemokine mRNA and induction of regulatory T cells (Tregs) for up to 7 months after intravenous inoculation with *L. donovani* promastigotes were determined. While control *aly/+* mice resolved the infection by 8 weeks post infection (WPI), *aly/aly* mice showed long-term hepatic parasite persistence in the chronic phase of infection, which was associated with the delayed and impaired granuloma maturation. Although hepatic CD4⁺Foxp3⁺ but not CD8⁺Foxp3⁺ T cells were detected in both strains of mice, the number of CD4⁺Foxp3⁺ T cells and expression of *Foxp3* mRNA were significantly increased in *aly/aly* mice. Immunohistochemical analysis demonstrated the presence of Foxp3⁺ T cells in *L. donovani*-induced hepatic granulomas and perivascular neo-lymphoid aggregates. Laser microdissection and quantitative RT-PCR of mature granulomas revealed that the increase in the *Foxp3* mRNA level at 12 WPI was correlated to the increased mRNA level of *IL-10* more than *TGF-β*, suggesting that the impairment of granuloma maturation was mediated by the immunosuppressive IL-10. Furthermore, the treatment of infected *aly/aly* mice with anti-CD25 or anti-FR4 mAb resulted in significant reductions in both hepatic Foxp3⁺ cells and parasite burden. This study offered a novel insight into the involvement of Tregs in hepatic *L. donovani* persistence in an immunodeficient condition. The manipulation of Tregs may provide a promising immunotherapeutic strategy for visceral leishmaniasis.

学位論文審査の要旨

主査	教授	片倉	賢
副査	教授	杉本	千尋
副査	教授	大橋	和彦
副査	准教授	加藤	大智

学位論文題名

Studies on transmission of leishmaniasis and mechanisms of parasite persistence in the liver

(リーシュマニア症の伝播および原虫の肝臓内存続機構に関する研究)

リーシュマニア症はリーシュマニア属原虫による人獣共通寄生虫症であり、サシチョウバエが媒介する。本症の分布は拡大しており、気候変動や動物相の変化がサシチョウバエの分布や吸血行動に影響を与えていると考えられている。宿主側要因としては栄養不良、ヒト免疫不全ウイルス感染、臓器移植者への免疫抑制剤の投与などによる病原体に対する人の感受性の変化がある。

第1章においては、リーシュマニア症の伝播に関する研究として、パキスタン南部の皮膚リーシュマニア症の新しい流行地におけるサシチョウバエの分布と吸血源動物の調査を行った。サシチョウバエの分類にあたっては分子生物学的手法を取り入れ、個体別にDNAを抽出後、18S rRNA遺伝子をPCR法で増幅し、制限酵素断片多型解析とシーケンス解析を行った。その結果、雌のサシチョウバエ175匹のうち、7.4%が*Phlebotomus papatasi*、3.4%が*P. alexandri*近縁種、68.6%が*Sergentomyia clydei*/*S. ghesquierei*/*S. magna*のいずれか、17.1%が*S. dubia*、そして3.4%が*S. dentata*であった。さらに、肉眼的に吸血が確認された28個体について、脊椎動物のミトコンドリア・シトクロームb遺伝子をPCR法で増幅しシーケンス解析を行った。その結果、*P. papatasi*は牛と野ネズミから、*P. alexandri*近縁種は人、牛、山羊、犬から吸血していることが判明した。一方、*Sergentomyia*属サシチョウバエは一般に爬虫類などの変温動物を吸血するとされており、*S. dubia*と*S. dentata*は爬虫類を吸血していた。しかし、*S. clydei*、*S. dubia*、*S. ghesquierei*は人、牛、山羊、羊、水牛、ロバ、野ネズミ、インドスナネズミを吸血していることが明らかとなった。今回の調査では、これらのサシチョウバエからリーシュマニアDNAは検出されなかったが、本調査地の皮膚リーシュマニア症の主要種が*Leishmania major*であり、*P. papatasi*はそのベクターとして知られていることから、パキスタンの新流行地においては人、動物、*L. major*そして*P. papatasi*によるリーシュマニア症の伝播サイクルが成立しているものと考えられた。また、*Phlebotomus*属と*Sergentomyia*属のどちらのサシチョウバエも人を含めた複数の哺乳動物を吸血していたことから、サシチョウバエ媒介性疾病のさらなる調査とベクター対策の必要性が示された。

第2章においては、免疫不全宿主におけるリーシュマニア原虫の臓器内存続機構に

関する解析を行った。本研究では、2次リンパ組織の役割を検討するために、遺伝的にリンパ節を欠損している *aly/aly* マウスに *L. donovani* を感染させたのち、慢性期の感染7ヶ月後まで肝臓内原虫数、肝臓内肉芽腫形成、Th1およびTh2関連サイトカインとケモカインのmRNA発現量およびCD4⁺Foxp3⁺制御性T細胞(Treg)の動態について経時的に解析した。その結果、対照の *aly/+* マウスでは肝臓内原虫が感染8週目までに排除されたのに対して、*aly/aly* マウスでは感染7ヶ月後でも肝臓内原虫の存続が確認された。肝臓内Tregの出現数と *Foxp3* 遺伝子の発現量は *aly/aly* マウスで有意に増加していた。免疫組織学的解析から、肝臓内肉芽腫内には原虫感染細胞、Foxp3⁺T細胞、Foxp3⁻T細胞が存在することが明らかとなった。また、肉芽腫組織をレーザーマイクロダイセクション法で回収し、抑制性サイトカインのmRNA発現量を測定したところ、*Foxp3* 遺伝子のmRNA発現量は *TGF-β* よりも *IL-10* mRNA発現量と相関した。さらに、感染 *aly/aly* マウスにTregの機能を抑制する抗CD25抗体や抗FR4抗体を投与したところ、肝臓内原虫数は有意に減少した。このことから、免疫不全 *aly/aly* マウスの内臓リーシュマニア症においては、制御性T細胞がIL-10を介して肝臓内原虫を制御している可能性が示された。

本研究は、パキスタンの皮膚リーシュマニア症の新流行地におけるベクターに関する有用な情報を提供した。また、免疫不全宿主におけるリーシュマニア原虫の肝臓内存続における制御性T細胞の関与を明示し、内臓リーシュマニア症に対する新規治療法開発に向けての有用な情報を提供した。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者SARUDA TIWANANTHAGORN君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。