

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07083

研究課題名（和文）南米型トリパノソーマ感染による宿主アポトーシスおよびオートファジー抑制機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of inhibitory mechanism of host apoptosis and autophagy by Trypanosoma cruzi infection

研究代表者

嶋田 淳子（SHIMADA, Junko）

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：20211964

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）： これまでにTrypanosoma cruzi 感染細胞では宿主アポトーシスおよびオートファジーが抑制することを明らかにし、今回、感染宿主細胞のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、アポトーシス経路が有意に抑制され、またNF-κB経路が活性化されることがわかった。オートファジー関連遺伝子の変動は少なかったがmTOR経路が活性化されることが示唆された。生化学的解析でもmTORタンパク質の脱リン酸化が起きており、オートファジーが活性化されることが裏付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シャーガス病は我が国には輸入寄生虫症として報告があるが、中南米では700万人以上の感染者がおり、国際協力という観点において重要である。本研究は、トランスクリプトーム解析により原虫感染による宿主遺伝子発現を網羅的に解析し、この中にはかなりのデータが含まれている。アポトーシスやオートファジーに限らず、シャーガス病研究さらには他の感染症研究に役立つ情報が含まれており、学術的に意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）： So far Trypanosoma cruzi inhibits host apoptosis and autophagy. To know the cross talk between apoptosis and autophagy inhibition, the gene expression of host cells infected with T. cruzi was analyzed by transcriptome analysis.

The pathway analysis showed that apoptosis related genes was relatively inhibited at 24 h post infection. NF-κB pathway was activated after infection. While the gene expression of autophagy related genes was not changed except mTOR signaling pathway.

研究分野： 寄生虫学

キーワード： Trypanosoma cruzi アポトーシス オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Trypanosoma cruzi はシャーガス病の病原体として重要であるが、本原虫感染による宿主側の応答については解明されていない点が多く、病態を理解する上で寄生虫と宿主両者を統合的に解析する基盤研究が必要である。我々は、原虫感染による宿主応答および原虫の生き残り戦略について解析し、宿主-寄生虫相互作用を解明していきたいと考えている。これまで *T. cruzi* 感染に対する宿主細胞側の応答として細胞死という観点から解析を行い、感染細胞ではアポトーシスが抑制されることを見出し、また、宿主オートファジーも抑制されることを明らかにした。

2. 研究の目的

これまでに細胞内病原体が宿主アポトーシスやオートファジー機構で排除されることが報告されている。しかし、寄生原虫 *T. cruzi* はこの機構で排除されず、細胞内で分裂・増殖を繰り返し、宿主の排除機構から回避している。そこで、原虫感染による宿主アポトーシスおよびオートファジー関連遺伝子の発現解析を行い、アポトーシス抑制とオートファジー抑制が独立に起きているのかを調べることで、宿主の生体防御反応回避機構を明らかにする。

3. 研究の方法

HT1080 細胞または THP-1 細胞に *T. cruzi* (Tulahuene 株) を感染させ、0、1、3、24 時間後に細胞を回収した。感染細胞から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を行った。得られたデータを CLC Genomic Workbench ソフトウェアにより解析し、遺伝子発現量の差解析、*T. cruzi* 感染細胞における発現変動遺伝子解析、感染による生物学的機能探索、活性化または阻害されているパスウェイ探索を行った。

4. 研究成果

T. cruzi 感染 1、3、24 時間後に宿主細胞から RNA を抽出し、RNA-seq を実施し、40,000,000 リード (総リード数の 90% 以上) がヒトリファレンスゲノムにマップされた。次に、*T. cruzi* 感染によって発現量が変動する遺伝子を同定するために、発現差解析を行った。Control vs. *T. cruzi* 感染 1 時間、Control vs. *T. cruzi* 感染 3 時間、Control vs. *T. cruzi* 感染 24 時間の 3 組み合わせで発現差解析を行い、absolute fold change > 2、かつ p-value ≤ 0.05 の条件を満たす遺伝子を抽出し、ベン図を作製した (図 1)。

T. cruzi 感染 1 時間で 126、*T. cruzi* 感染 3 時間で 181、*T. cruzi* 感染 24 時間で 157 の遺伝子が、Control と比較して発現変動していた。また、20 遺伝子が *T. cruzi* 感染に曝された時間に関わらず共通に発現変動した。*T. cruzi* 感染 1 時間、3 時間、24 時間での発現変動遺伝子は、合計で 354 であった。

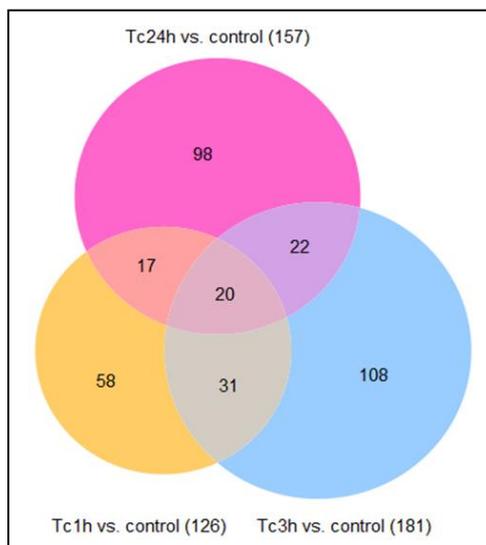


図 1 *T. cruzi* 感染により発現変動した遺伝子数

T. cruzi 感染細胞における発現変動遺伝子が、どのような生物学的機能に関連するののかを明らかにするために、オンラインデータベース DAVID を用いた GO (Gene Ontology) 解析を行った。アノテーションされている発現変動遺伝子数が多い上位 5 つの GO Term を抽出した (図 2)。

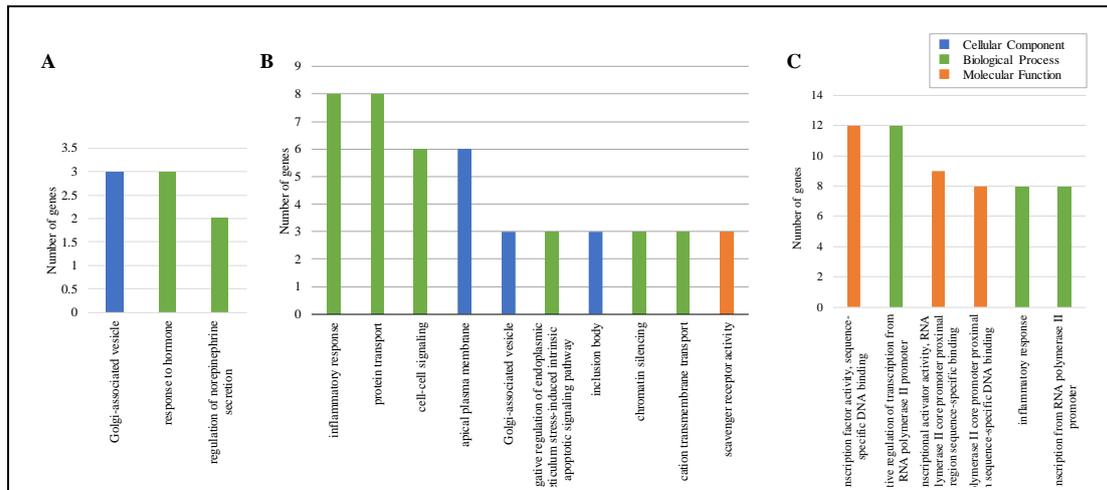


図2 *T. cruzi* 感染による発現変動遺伝子の GO 解析

T. cruzi 感染 1 時間における 126 の発現変動遺伝子を対象とした GO 解析を行ったところ、多くの発現変動遺伝子が関係していた生物学的プロセスはホルモン応答やノルエピネフリン分泌の調節であり、細胞構成要素 (Cellular Component) はゴルジ関連小胞であった (図 6)。

T. cruzi 感染 3 時間における 181 の遺伝子を対象とした GO 解析では、炎症反応やタンパク質輸送プロセス、分子機能としてはスカベンジャー受容体活性化が示された。

T. cruzi 感染 24 時間における 157 の発現変動遺伝子を対象とした GO 解析では RNA ポリメラーゼ II プロモーターからの転写の正の調節や炎症反応が示され、分子機能としては転写因子活性や配列特異的 DNA 結合が挙げられた。原虫感染による発現変動遺伝子は、HT-1080 でも THP-1 細胞でも同様の傾向がみられた。

さらに、*T. cruzi* 感染細胞において活性化または不活性化しているパスウェイや上流制御因子、ネットワークの探索を行うため、パスウェイ解析ソフトウェア Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いた解析を行った。Control vs. *T. cruzi* 感染 1 時間では 393 遺伝子、Control vs. *T. cruzi* 感染 3 時間では 1638 遺伝子、Control vs. *T. cruzi* 感染 24 時間では 1220 遺伝子が解析対象となった。興味深いことに、*T. cruzi* 感染 3 時間では mTOR signaling が阻害されていると予測された。また、*T. cruzi* 感染 24 時間では、細胞周期の G1/S チェックポイントが阻害されていると予測された。

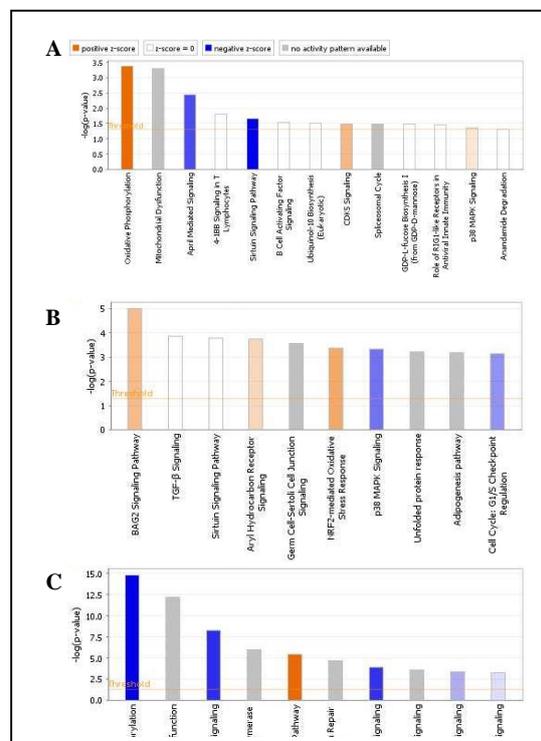


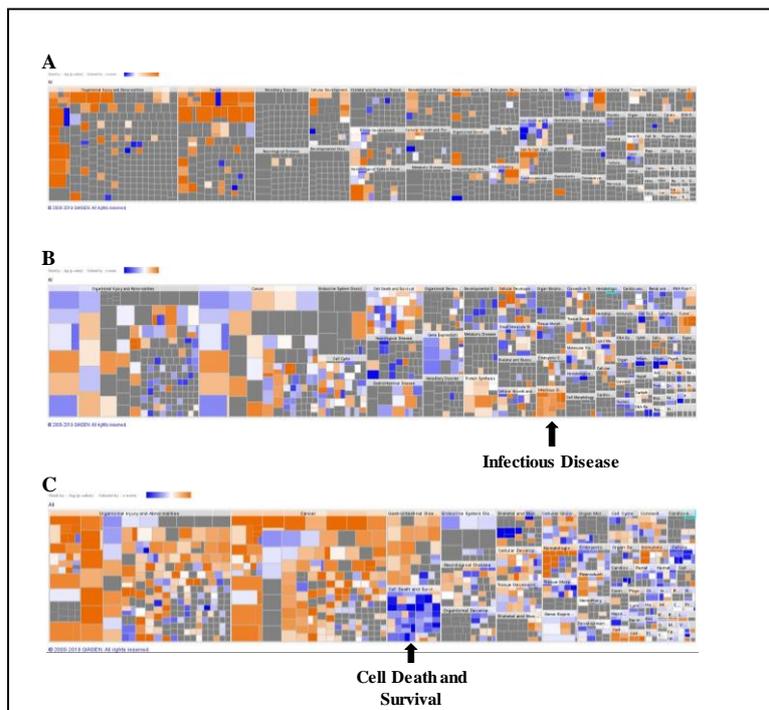
図3 パスウェイ解析結果

A:感染 1h, B:感染 3h, C:感染 9h

T. cruzi 感染細胞で活性化および不活性化している upstream regulator を調べたところ、NF- κ B の活性化に関与する IKBKG とアポトーシス誘導に関与する DAP3 が含まれていた (図4)。一方、Downstream Effects Analysis では、infection、replication、HIV infection など感染に関わる生物学的機能が亢進すると予測された。さらに細分化された機能階層)を確認したところ、ウイルス感染やウイルスの複製に関わる Diseases and Functions Annotation のスコアが特に亢進すると予測された (図4)。*T. cruzi* 感染 24 時間では、Cell Death and Survival に関連する生物学的機能が抑制されると予測された。そこで、Cell Death and Survival の中で中間レベルの機能階層を確認したところ、apoptosis、cell death、necrosis など細胞死に関わる生物学的機能が抑制されると予測された。さらに、心筋細胞を含む筋細胞や消化器系細胞における細胞死に関する Diseases and Functions Annotation のスコアが-2 以下であり、有意に抑制されると予測された (表1、図4)。

表1 *T. cruzi* 感染 24 h 後における細胞死に関わる機能抑制

Annotation	p-value	Activation z-score
Cell death of cardiomyocytes	0.00034	-3.145
Cell death of muscle cells	4.82E-06	-3.123
Apoptosis of muscle cell lines	4.89E-06	-3.118
Necrosis of muscle	4.44E-06	-2.909
Cell death of muscle cell lines	2.05E-06	-2.831
Apoptosis of gastrointestinal cells	0.000014	-2.791
Apoptosis of muscle cells	0.000362	-2.73
Cell death of connective tissue cells	7.46E-06	-2.096



オレンジ：亢進されているパスウェイ

青：抑制されているパスウェイ

図4 パスウェイ解析結果

A:感染 1h, B:感染 3h, C:感染 9h

パスウェイ解析の結果、生体防御、免疫に関わる遺伝子の亢進が明らかとなり、特にウイルス感染の場合と類似したパターンが認められた。*T. cruzi*感染細胞ではIKBKKGが活性化すると予測された。IKBKKGはNF- κ B古典的経路のシグナル伝達に必須であるIKK複合体のサブユニットの1つである。原虫感染細胞ではNF- κ B経路のIKK複合体形成段階まではシグナルが伝わると考えられた。

オートファジーに関しては、オートファジー関連遺伝子の発現変動が少なかった。しかし宿主オートファジー初期過程を負に制御するmTORが阻害されており、オートファジーは活性化されるという結果が得られている。タンパク質レベルでは、オートファジーの初期過程に重要な役割を果たすmTORおよびATG13のリン酸化が起こっており、おそらくオートファジーの初期過程は活性化されると考えられた。また、感染3時間後に、Fasリガンドを介した外因性アポトーシスを誘導するDAP3が不活性化すると予測された。また、24時間後には心筋細胞や消化器系細胞におけるアポトーシス関連パスウェイが顕著に抑制され、これまでの研究を裏付ける結果となった。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 金光萌花、鬼塚陽子、高橋裕子、瀬戸絵理、嶋田淳子
南米型トリパノソーマ感染による宿主オートファジー経路上流の活性化
第65回 北関東医学会
2018年9月26日、群馬大学、群馬
- ② 矢澤祐典、鬼塚陽子、番場みのり、村田涼子、瀬戸絵理、嶋田淳子
バイオイメーjingによる慢性期 Chagas 病の炎症動態解析
第66回 北関東医学会
2019年10月1日、群馬大学、群馬

[産業財産権の名称] (計 1 件)

- ① 産業財産権の名称
新規キノン誘導体およびそれを有効成分とする抗トリパノソーマ剤
産業財産権の種類、番号
特許出願
出願番号：特願2019-213570
出願日：令和元年11月26日
発明者：嶋田淳子、須藤豊

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 淳子 (SHIMADA Junko)
群馬大学・保健学研究科・教授
研究者番号：20211964

(2) 研究分担者

なし

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢澤祐典、鬼塚陽子、番場みのり、村田涼子、瀬戸絵理、嶋田淳子
2. 発表標題 バイオイメージングによる慢性期Chagas病の炎症動態解析
3. 学会等名 第66回北関東医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金光萌花、鬼塚陽子、高橋裕子、瀬戸絵理、嶋田淳子
2. 発表標題 南米型トリパノソーマ感染による宿主オートファジー経路上流の活性化
3. 学会等名 第65回北関東医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
エルサルバドル	教育省科学技術研究センター	エルサルバドル大学	ホセマチアスデルガド大学	他4機関