

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基板研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590431
 研究課題名（和文） マイクロアレイ解析による細胞内寄生原虫感染時の宿主細胞遺伝子の動態
 研究課題名（英文） Microarray analysis of host gene-expression during intra-cellular nests formation of *Leishmania* amastigotes.
 研究代表者
 三森 龍之（MIMORI TATSUYUKI）
 熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
 研究者番号：00117384

研究成果の概要（和文）：鞭毛虫類であるリーシュマニア原虫とマクロファージ細胞を用いて、経時的に細胞内に侵入、増殖した *Leishmania amazonensis* のアマスティゴート型原虫を、顕微鏡で観察するとともに、宿主細胞の動態解析を cDNA マイクロアレイでおこなった。マウス・マクロファージ細胞株（J774A.1）の未感染細胞、原虫感染初期、感染成立期の感染宿主細胞および、原虫から Total RNA を分離した。それらのサンプルをオリゴマイクロアレイ（Agilent Technologies）（4 X 44K）1 色法を用いて、約 41,252 個のプロープについて、解析した。

研究成果の概要（英文）：

We observed invading amastigote of *Leishmania amazonensis* to macrophage host cells with microscope, and performed the temporary changes of the host cell with cDNA microarray. Total RNA was separated from the non-infected host cell which a mouse macrophage cell strain (J774A.1), infected cells in early stages of protozoan infection, in the infectious formation period, and parasites. Those samples were analyzed about 41,252 probes using the Oligo-microarray system (Agilent Technologies) (4 X 44K) 1 color method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：(1)マイクロアレイ、(2)感染症、(3)シグナル伝達、(4)遺伝子、(5)宿主細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、1983年以来、リーシュマニア症・トリパノソーマ症の感染病態に着手しており、病原株と病変の間の比較解析をおこなってきた。その一連の研究のなかで、様々な異なった病変・病態を示す病原株や治療薬について多数の論文を報告してきた。国内外でも、原虫に対する副作用の少ない優れた治療薬・ワクチンを開発するために、寄生虫の動態や、感染細胞の生理学的な研究が各国でおこなわれてきた。しかしながら、現在でも優れた治療薬の研究報告は少ない状況である。一方、マイクロアレイを使った解析による研究が、近年、原虫の分野でも脚光を浴びるようになってきた (Duncan, 2004; Moore-Lai and Rowland, 2004; Saxena, *et al.*, 2003)。しかしながら、これらの研究アプローチの方法は様々である。我々の今回用いる cDNA マイクロアレイシステムは、「かずさDNA研究所」の研究分担者である古閑ら (Koga *et al.*, 2005; Okazaki *et al.*, 2005) が開発したものであり、今回の研究に非常に適したものである。更に、私の研究室では、多種にわたるリーシュマニア原虫及びトリパノソーマ原虫株を用意する事が可能である。これらの原虫株と培養細胞株を用いて独自のマイクロアレイ解析をおこなうことが可能な研究プロジェクトは他に例を見ないものである。本研究により病原性との関連を明らかにし、その結果を治療薬・ワクチン開発に結びつけることで、当該研究を世界的に見ても非常にレベルの高い研究に位置付けることができると考えられる。

2. 研究の目的

細胞内寄生原虫は、宿主細胞に侵入し増殖するときに、原虫自身が持っている能動的な

細胞進入遺伝子機構と、逆に宿主細胞が持つ貪食機能を利用する受動的な侵入機構を備えている。特に寄生性鞭毛虫類はその種類により、寄生する宿主細胞、またその侵入メカニズムも異なっている。我々は、トリパノソーマ原虫において、原虫の感染時における宿主細胞の基礎的動態をマイクロアレイ解析により明らかにしてきた (Imai, *et al.*, 2005)。

ところで、リーシュマニア原虫は、細網内皮系の細胞に寄生し分裂増殖することが知られている。そこで、今回は、リーシュマニア原虫種とマクロファージ細胞系の細胞である (J774A.1) 株を用いて、41,252 の cDNA マイクロアレイによる解析をおこなう。この結果を、すでに我々が解析しているトリパノソーマ原虫感染時の宿主細胞動態結果と比較し、リーシュマニア原虫が細胞に感染したときの宿主細胞の反応を調べる。

今回は、リーシュマニア原虫株を宿主細胞に感染させ、経時的な宿主細胞の動態をマイクロアレイ解析によりどのような遺伝子が、感染に関わっているかを調べる。

このように、様々な原虫種や異なった宿主細胞を用いて、その宿主細胞の遺伝子の動態を調べることにより、寄生体と宿主細胞の相互関連性を明らかにすることにより、今後の治療・ワクチン製造に結びつけようとするものである。

3. 研究の方法

特に感染力の強いリーシュマニア原虫の (*Leishmania amazonensis*: M2269) 株を中心に実験をおこなった。原虫株は、10% 加 FCS の RPMI 1640 培地にて 27 °C で 4~6 日培養し、プロマスティゴート型原虫型原虫の増殖・培養を試みた。

リーシュマニア原虫感染用の細胞として、マウス・マクロファージ細胞株 (J774A.1) を、5%の炭酸ガスの下で 37℃、10% の FCS を加え RPMI 1640 培地で培養をおこなった。(Marco *et al.*, 2006, Am.J.Trop. Med.Hyg.)

用いたリーシュマニア原虫が皮膚感染型であるため、感染前日34℃へ培養温度を下げ、細胞数が 0.9×10^6 /シャーレに、プロマスティゴート型原虫を 0.8×10^7 (2 ml) を感染させた。感染を経時的にチェックするため、細胞内で増殖したアマスティゴート型原虫を、顕微鏡で観察した。また、感染細胞に含まれるアマスティゴート型原虫の RNA 存在を考慮するために、感染細胞から物理的に細胞を破砕しアマスティゴート型原虫を Percoll (SIGMA) を用いて遠心分離し、アマスティゴート型原虫の単離をおこない、原虫 RNA 抽出用サンプルを作成した。J774A.1 細胞から、ISOGEN (NIPPON GENE) 試薬を用いて、感染5時間後と28時間後に、感染細胞から、Total RNA を分離した。その後、RNeasy を用いて、RNA の精製をおこなった。その後、バイオマトリックス社研究所において、オリゴマイクロアレイ (Agilent Technologies) (4 X 44K) 1色法にて解析を受託研究した。数量化された生のデータは、GeneSpring GX (熊本大学総合研究施設部門で所有) ソフトウェアを使用して、比較解析をおこなった。

比較したサンプル：

No. 1 : マウス・マクロファージ細胞 (J774A.1) を培養し、未感染細胞 (Control) として回収した細胞

No. 2 : *Leishmania* 原虫 (細胞内寄生原虫) を上記細胞に感染させ、5時間後 (初期感染)

の細胞

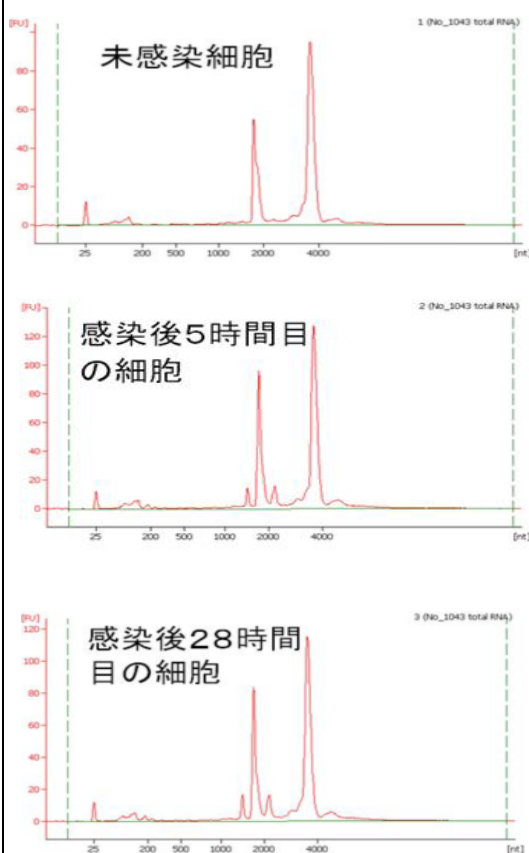
No. 3 : *Leishmania* 原虫 (細胞内寄生原虫) を上記細胞に感染させ、28時間後 (十分に感染) の細胞

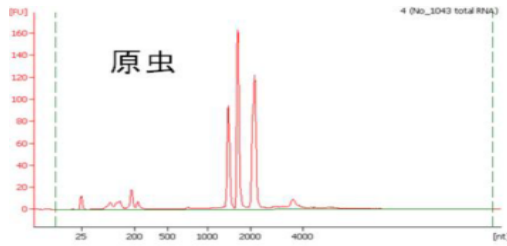
No. 4 : *Leishmania* 原虫 (細胞内寄生原虫: amastigote 型) を上記細胞に感染させ、原虫だけを細胞から Percoll を用いて単離したものと、(感染型: promastigote 型) を混合したものである。

4. 研究成果

顕微鏡による、感染原虫の観察では、すでに、感染5時間後には半数以上の細胞に感染が見られた。28時間後には、ほとんどの細胞が感染していた。

Bioanalyzer を用いた Electropherogram による RNA の品質度：



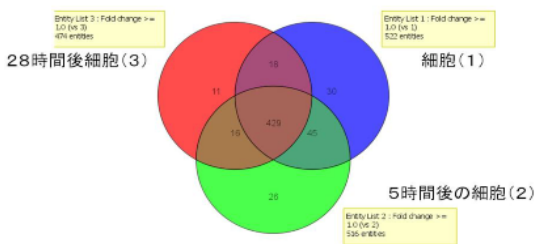


上記4つのグラフのように、高品質のRNAを抽出することが出来た。原虫のRNAはマウスと異なったが感染細胞において、量的にはそれほど多いものではないと考えられた。

次に、原虫由来のシグナルの評価 (Venn Diagram) であるが、

4 1, 2 5 2 マウスでのプローブ中、検出できたもの:

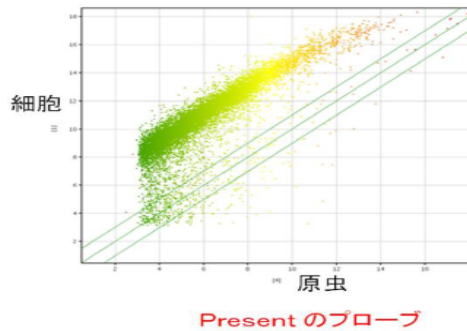
1: 22,035 2: 21,470 3: 21,736
 4: 12,633 であった。このように、原虫での検出プローブは、他の約半数であった。さらに、原虫(4)において Flag が Present であったもので他のサンプルよりシグナルが高かったものについての比較と重なりは 4>1: 522 4>2: 516 4>3: 474 と約 500 程度となった。



次に原虫由来のシグナルの Scatter Plot での評価:

原虫でプローブが Present になったものでも、細胞おける同じプローブの反応が、はるかに強く検出された。

このように、原虫に対するプローブの反応は、全体が、約 20,000 中、約 500 くらいが、考慮される程度のため、今回は、細胞を基準に考えていいものとして、解析を進めた。



Profile Plot での解析:

A) 2 (5hrs) Normalized 値 / 1 (C)
 Normalized 値 >= 2.0 の Entity が、1008
 プローブ数

B) 2 (5hrs) Normalized 値 / 1 (C)
 Normalized 値 <= 0.5 の Entity が、702
 プローブ数

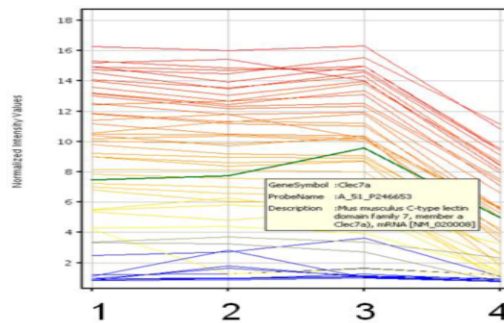
C) 3 (28hrs) Normalized 値 / 1 (C)
 Normalized 値 >= 2.0 の Entity が、780
 プローブ数

D) 3 (28hrs) Normalized 値 / 1 (C)
 Normalized 値 <= 0.5 の Entity が、
 1672 プローブ数となった。

これらの個々のプローブについては、現在検討中である。

Trypanosoma cruzi と線維芽細胞 (NIH 3T3) の系で変化したプローブ 16 種について、今回の系で比較したが、ほとんど今回は変化が認められなかった。

また、貪食作用 (Phagocytosis) に関連するプローブ約 50 についても詳細を検討中である。



貪食作用 (Phagocytosis) に関連するプローブ

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三森 龍之 (MIMORI TATSUYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：00117384

(2) 研究分担者

古閑 比佐志 (KOGA HISASHI) (2007～2008
年度)

かずさDNA研究所・室長

研究者番号：30221237