

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：10105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880006

研究課題名(和文)トキソプラズマ感染における中枢神経系障害の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of Central Nervous System Dysfunction in Toxoplasma gondii Infection

研究代表者

田中 沙智(TANAKA, Sachi)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・研究員

研究者番号：90633032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマは細胞内寄生性原虫であり、トキソプラズマ感染時における中枢神経系障害の発症の詳細なメカニズムについてはほとんど知られていない。そこで本研究では、トキソプラズマ感染における神経系障害の発症機序について、遺伝子・細胞レベルで明らかにすることを目的とした。トキソプラズマ感染時の脳内の遺伝子発現の変化を網羅的に解析したところ、免疫反応や抗原提示に関わる遺伝子発現が増加し、神経系に関わる遺伝子発現が低下することが示された。また、神経系細胞の初代培養系を確立し、トキソプラズマに感染したマイクログリアから神経系機能に影響を及ぼすサイトカインや神経障害を促す物質が高産生されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that invades a wide range of vertebrate host cells. Chronic infections with T. gondii become established in the tissues of the central nervous system where the parasites may directly or indirectly modulate neuronal function. However, the mechanisms of T. gondii-induced neuronal disorder remain unclear. The objective of this study is to elucidate the molecular and cellular mechanisms of neuronal disorder during T. gondii infection. In this study, host gene expression in mouse brain following infection with T. gondii was analyzed by RNA-seq. As a result, the up-regulated genes were primarily involved in host immune responses and cell activation. In contrast, genes that had a negative correlation with parasite numbers were predicted to be involved in neurological function. In addition, primary culture system of murine microglia was established, and cytokines and nitric oxide were produced in microglia against T. gondii infection.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：トキソプラズマ 原虫感染症 中枢神経系

1. 研究開始当初の背景

(1)トキソプラズマは、ネコ科動物を終宿主とし、ヒトを含めた他の動物を中間宿主とする細胞内寄生性原虫であり、我が国においてブタ、ヒツジなど産業動物のトキソプラズマ感染症は届出伝染病に指定されている。

(2)妊娠中にトキソプラズマに感染したブタやヒツジでは流・死産が見られることから、その経済的な損失は大きいとされている。また、感染動物の生肉の摂取はヒトへの感染源となることから、食肉衛生上の問題としても重要である。一方、ヒトにおいては、妊婦が初感染した場合、流・死産や新生児の水頭症・脈絡網膜炎などの先天性感染症を引き起こす。また、宿主の免疫反応が正常の場合、トキソプラズマが感染してもほとんど症状を呈さないが、HIV感染者や免疫抑制剤の投与などで宿主の免疫が抑制状態にあると、リンパ節炎、髄膜脳炎、心筋炎、肺炎、網脈絡膜炎などを発症する(矢野明彦他、日本におけるトキソプラズマ症、2007年)。さらに、宿主の免疫機能の低下により脳組織内に感染・潜伏していたトキソプラズマの活性化でトキソプラズマ脳炎が発症すると考えられている(Porter et al., *New England Journal of Medicine*, 1992)が、その発症の詳細なメカニズムについては知られていない。

(3)マウスなどの実験動物に慢性感染を起こさせると学習能力の低下、記憶の低下、警戒感の希薄などの行動変化が現れることが報告されており(Webster, *Schizophrenia Bulletin*, 2007)、ヒトにおいてもトキソプラズマの慢性感染と、統合失調症などの神経系疾患の発症の関連が示唆されている(Fekadu et al., *Folia parasitologica* 2010)。しかしながら、トキソプラズマ感染時の脳内での免疫応答や中枢神経系障害についてはほとんど知られておらず、神経系障害を引き起こすトキソプラズマ由来の制御因子についても同定には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、トキソプラズマ感染における脳神経系細胞の細胞死を誘導するトキソプラズマ由来制御因子の探索・同定や、宿主側の感染防御機構における神経系や免疫系の重要な因子を調べることにより、トキソプラズマ感染における神経系障害の発症機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)トキソプラズマ感染時の脳内の遺伝子発現の変化を網羅的に解析するために、BALB/cマウスにトキソプラズマ(Type 2: PLK株)を感染させ、感染32日後に脳組織のサンプリングを行い、RNA-seq法によるトランスクリプトーム解析を行った。感染期間中においては、マウスの体重を測定し、行動

観察を行うことで、トキソプラズマ症の発症の有無を記録した。

(2)上記(1)で調製したサンプルをRNA Sample Prep Kitを用いてシーケンズライブラリーを作成し、TruSeq SBS Kit v5-GA(36 cycle)で処理した後、Illumina Genome Analyzer IIxにてシーケンスを行った。得られたリードはマウスゲノムにマッピングし、ミスマッチを除外したリード数から遺伝子発現量を算出し、トキソプラズマを感染させた脳の遺伝子発現量を解析した。

(3)トランスクリプトーム解析に用いたマウス脳の一部を採取し、DNAの抽出を行い、脳内虫体数をリアルタイムPCRにて解析した。

(4)トキソプラズマの感染で有意に発現変化した遺伝子の抽出を行うために、DESeqを用いて統計解析を行った。統計処理は、2倍以上の発現変化でFDRの有意水準を5%とした。また、脳内虫体数に対して遺伝子発現量が正の相関を示す遺伝子と負の相関を示す遺伝子について抽出を行った。さらに、慢性感染の症状が見られたマウスにおける特徴的な遺伝子発現パターンを解析した。

(5)トランスクリプトーム解析で得られた遺伝子発現変化について、細胞生物学的に解析を進めるために、神経系細胞(ニューロン、ミクログリア、アストロサイト)の初代培養系の確立を試みた。

(6)マウスを妊娠させ、胎齢17-18日の胎児の脳細胞を単離し、ミクログリアはGM-CSF添加培地、アストロサイトはG5 supplement添加培地、ニューロンはB-27添加培地にて分化・誘導させた。誘導7~10日後、各種細胞の分化マーカーであるCD11b、GFAP、MAP2の陽性割合を調べ、陽性率が95%以上であることを確認した。各細胞の分化マーカーを95%以上発現する細胞に対して、トキソプラズマ(Type 2: PLK株)あるいは各種遺伝子をノックアウトさせたトキソプラズマを感染させた時のサイトカインや神経障害関連物質について検討を行った。

(7)トキソプラズマ感染における神経障害のメカニズムにおける宿主側の影響を調べるために、種々のノックアウトマウスの胎児から神経系細胞(ニューロン、ミクログリア、アストロサイト)を分化誘導させ、トキソプラズマ(Type 2: PLK株)を感染させた時の機能変化について検討を行った。

(8)野生型のマウスとノックアウトマウスに対してトキソプラズマ(Type 2: PLK株)を感染させ、感染32日後に脳組織のサンプリングを行い、脳内虫体数の定量とシストの数

を病理組織学的に解析した。

4. 研究成果

(1)トキソプラズマを感染させたマウスの脳において、トキソプラズマ感染で有意に増加した遺伝子は 935 個、低下した遺伝子は 12 個であった。感染で 2 倍以上発現が増加した遺伝子の中には、ケモカインやケモカインレセプター、GTPase 関連、MHC クラス II に関連する遺伝子が存在した。また、最も発現低下を示した *Fcrls* は、単球やミクログリアで発現するスカベンジャーレセプターであり、感染でこの遺伝子の発現が低下したことから、単球やミクログリアによるスカベンジャー機能、つまり不要物質の取り込みなどの機能がトキソプラズマの感染で低下する可能性が示唆された。

(2)脳内虫体数と遺伝子発現量の相関を Pearson の相関係数を求めて調べたところ、正の相関を示す遺伝子が 506 個、負の相関を示す遺伝子が 473 個存在した。また、正の相関を示す遺伝子について Gene ontology 解析にてその機能を調べたところ、免疫反応や抗原提示に関与することが示され、負の相関を示す遺伝子では、small GTPase 関連シグナル伝達や小胞輸送などに関与することが示された。Small GTPase は神経突起伸長や軸索の形成に、小胞輸送は神経伝達物質の輸送や放出に関与することが予想されるため、脳内の虫体数が多いほど、神経系に関わる遺伝子発現が低下することが示唆された (図 1)。

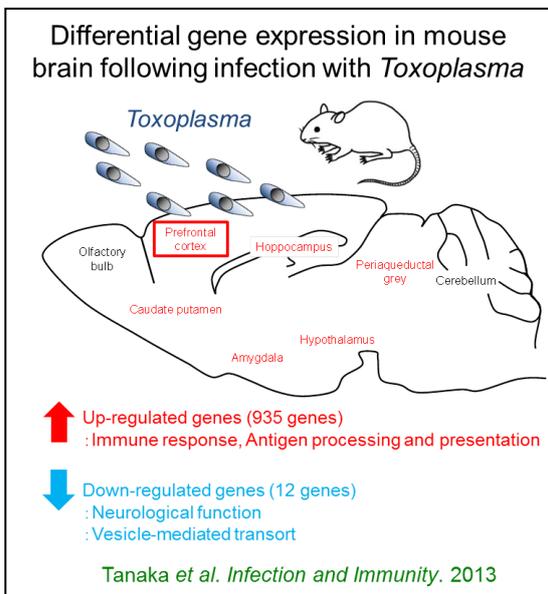


図 1. トキソプラズマを感染させたマウス脳における遺伝子発現の変化

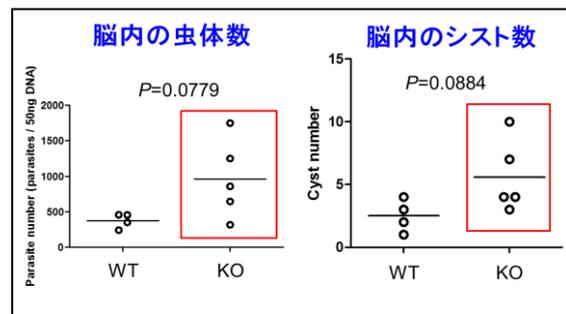
(3)トキソプラズマ症を発症したマウスと発症しなかったマウスでの遺伝子発現の違いについて DESeq で調べたところ、*Irf4* と *Tgfb1* は発症すると発現が増加し、*Egr4* は発症すると発現が低下することが示された。よって、これらの遺伝子がトキソプラズマ症の

発症に関与することが示唆された。

(4)マウス胎児より分化誘導させたニューロン、ミクログリア、アストロサイトに対して、野生型のトキソプラズマ、あるいは遺伝子ノックアウト原虫を感染させたところ、各種神経系細胞の機能に大きな変化は見られなかった。

(5)宿主の遺伝子に着目し、種々のノックアウトマウスの胎児から神経系細胞を単離・分化させ、トキソプラズマ (Type 2 : PLK 株) を感染させたときの機能変化について検討を行ったところ、ある種の遺伝子ノックアウトマウスにおいては、ミクログリアやアストロサイトからのサイトカイン産生が低下し、抗トキソプラズマ作用に関連する免疫応答が低下することが示された。さらに、この遺伝子ノックアウトマウスに PLK 株を感染させた場合、野生型マウスに比べて症状が著しく悪化し、脳内の虫体数、シスト数ともに有意に増加することが示された (図 2)。

図 2. トキソプラズマを感染させたノック



アウトマウスにおける脳内虫体数、シスト数

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tanaka S, Nishimura M, Ihara F, Yamagishi J, Suzuki Y, Nishikawa Y. Transcriptome Analysis of Mouse Brain Infected with *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*. 査読有. 81, 2013. 3609-3619. DOI: 10.1128/IAI.00439-13.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 田中沙智、西村麻紀、猪原史成、山岸潤也、鈴木穰、西川義文、トキソプラズマ感染マウスの脳におけるトランスクリプトーム解析、第 82 回日本獣医学会学術集会、2013 年 3 月 30 日、東京医科歯科大学。
- ② 田中沙智、西村麻紀、猪原史成、山岸潤也、鈴木穰、西川義文、トキソプラズマおよびネオスポラ感染マウスの脳におけるトランスクリプトーム解析、第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 9 月 16

日、岩手大学.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 沙智 (TANAKA, Sachi)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・

研究員

研究者番号：90633032

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし