

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 26年 5月 30日

採択番号 25-共同-9			
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	次世代シーケンサーを用いたトキソプラズマ感染脳細胞におけるトランスクリプトーム		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	すずき ゆたか 鈴木 穰	東京大学・新領域創成科学研究科・教授	
研究分担者			
研究期間	平成 25年 4月 1日 ~ 平成 26年 3月 31日		
目的・趣旨	<p>トキソプラズマは細胞内寄生性原虫であり、慢性感染時には脳内に存在することが知られている。脳内でトキソプラズマはミクログリア、アストロサイト、ニューロンに感染し、シストを形成して神経系障害を引き起こすことが知られているが、その発症の詳細なメカニズムについては解明されていない。</p> <p>我々はこれまで、トキソプラズマに感染させたマウスの脳のトランスクリプトーム解析を行っている。その結果、トキソプラズマの感染によって、マウス脳内では免疫に関与する遺伝子発現、特にケモカインの発現が増加し、神経系に関わる遺伝子発現が低下するという結果を得ている。しかしながら、トキソプラズマの感染によって遺伝子発現が変化する細胞種の同定はできていない。また、トキソプラズマは宿主細胞の TLR を介して免疫のシグナルを伝えることが報告されているため、トキソプラズマは宿主細胞に発現する TLR やケモカインレセプターを介して、免疫反応を惹起し、神経系機能の変化を及ぼすことが予想される。</p> <p>本研究では、トキソプラズマ感染で引き起こされる神経系障害に関与する宿主因子、原虫因子の機能の解明とその発症メカニズムを明らかにすることを目的とする。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究経過の概要</p>	<p>野生型マウス、TLR2 ノックアウトマウス、CCR5 ノックアウトマウス、および CXCR3 ノックアウトマウスを妊娠させ、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 (PLK 株: Type II) を感染させ、24 時間後、直ちに TRI Reagent で処理し、-80℃で保存した。ここまでの作業は原虫病研究センターで実施した。</p> <p>上記方法で調製したサンプルを東京大学・鈴木研究室に送付し、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 にてシーケンズを行う。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、野生型マウスとノックアウトマウスでの遺伝子発現量の違いを比較した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>神経系の機能や免疫応答を担う種々の宿主転写因子について、野生型マウスとノックアウトマウスでの遺伝子発現量を比較した。感染によって NF-κB 関連遺伝子発現量の顕著な増加がいずれの細胞種においても認められたが、TLR2 ノックアウトマウスにおいては、アストロサイトとミクログリアでは野生型と比較して発現量の増加は低いレベルでしか認められなかった。その他のノックアウトマウスにおいては野生型と同レベルの発現増加を認めた。また、野生型とノックアウトマウスの間で、非感染時における NF-κB 関連遺伝子発現量の変化は認めなかった。NF-κB は一酸化窒素や炎症性サイトカインなどの発現を誘導することで虫体の排除に作用する他にも、多くの神経機能遺伝子の発現量調節も行っている。以上のことから、トキソプラズマ感染による神経系の障害に、TLR2 を介した NF-κB のシグナル経路が重要な役割を担っていることが示唆された。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>【論文発表】 Tanaka S, Nishimura M, Ihara F, Yamagishi J, Suzuki Y, Nishikawa Y. Transcriptome Analysis of Mouse Brain Infected with <i>Toxoplasma gondii</i>. Infect Immun. 2013 Oct;81(10):3609-3619.</p> <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 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, 第 20 回分子寄生虫学ワークショップ, 2012 年, 神戸. 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, 岩手. 3. 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. 感染症若手フォーラム, 2013 年, 北広島. 4. 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 回日本寄生虫学会, 2013 年, 東京.