



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Developmental Biotechnological Studies on the Host Defense Mechanisms in Toxoplasma gondii Infection(内容の要旨)
Author(s)	SENG, SEYHA
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第070号
Issue Date	2000-03-14
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2124

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	SENG SEYHA（カンボジア王国）				
学位の種類	博士（獣医学）				
学位記番号	獣医博甲第70号				
学位授与年月日	平成12年3月14日				
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当				
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻				
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学				
学位論文題目	Developmental Biotechnological Studies on the Host Defense Mechanisms in <i>Toxoplasma gondii</i> Infection				
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授	藤崎	幸藏
	副査	帯広畜産大学	教授	齊藤	篤志
	副査	岩手大学	教授	岡田	幸助
	副査	東京農工大学	教授	金田	義宏
	副査	岐阜大学	教授	平井	克哉
	副査	帯広畜産大学	教授	長澤	秀行

論文の内容の要旨

Toxoplasma gondii (トキソプラズマ原虫) は世界的に広く分布する医学・獣医学上、極めて重要な原虫の一つである。本原虫の生活史の維持と宿主体内における増殖には、細胞への接着・侵入が必要であり、これまでトキソプラズマ原虫からは、5種類の主要表面蛋白質が報告されている。本論文で取り上げた SAG-1 はこの原虫細胞表面蛋白質の一つであるが、そのトキソプラズマ症の病態や免疫機構に果たす役割と機能については、不明の点が多く残されている。一方、遺伝子導入技術は、感染症における特定遺伝子の機能決定や分子機構の解明を図る上で、極めて有用な研究手段として、近年、脚光を浴びているものであるが、原虫分野での研究はほぼ皆無の現状である。したがって、本論文では、SAG-1 機能を分子遺伝学レベルで解明するための発生工学的手法を用いた研究を実施した。

本論文の構成は、(a) 遺伝子導入による SAG-1 発現トランスジェニックマウスの開発、(b) SAG-1 発現トランスジェニックマウスにおけるトキソプラズマ原虫感染症の病態と防御免疫の解析、を主題として4章からなる。

第1章では緒論として、トキソプラズマ原虫および SAG-1 について概説を行うと共に、原虫病分野における過去の発生工学的研究について概観を試みた。

第2章では、トキソプラズマ原虫の SAG-1 遺伝子導入マウスモデルを新規に開発した。このマウスモデルは、前核期のマウス受精卵に SAG-1cDNA を導入して開発した。SAG-1cDNA は、トキソプラズマ原虫 RH 株のタキゾイトから調製した mRNA を RT-PCR

で増幅して作製した。クローニングした cDNA は、その塩基配列と発現蛋白の抗原性を確認後、全身性の発現制御能を有する CAG プロモーターの下流に組み込み、SAG-1 導入遺伝子を作製した。本プロモーター下における導入遺伝子の発現は、哺乳類培養細胞で確認した。導入遺伝子の 3.3 kbp の発現単位は、*Sal* I および *Hind* III サイトの切断によって作製し、マイクロマニピュレーターを用いて体外受精卵の雄性前核内に顕微注入した。体外培養で 2 細胞期に発生した受精卵を偽妊娠雌マウスに移植し、トランスジェニックマウスを得た。トランスジェニックマウス (founder mouse) が得られる成功率はマウス系統によって大きく異なり、BALB/c では 3.1% (1/32)、C57BL/6J では 0.7% (1/127) と、それぞれ 1 匹のトランスジェニックマウスしか得られなかったが、C57BL/6J x C3H/H F1 (B6C3F1) 由来の受精卵では 20% (34/172) にも達した。また、BALB/c と約 50% の B6C3F1 トランスジェニックマウスでは次世代への SAG-1 遺伝子の伝達を確認できたが、C57BL/6J と残りの B6C3F1 では確認できなかった。多数の B6C3F1 founder から選択した 3-57 および 1-54 の 2 系統をトランスジェニックマウスとして最終的に確立し、以後の研究を実施した。導入遺伝子が F1 から F2 マウスへ遺伝する割合は、BALB/c、1-54 および 3-57 で、それぞれ 56、43 および 45% であった。SAG-1 遺伝子の単一部位への組み込みは、³²P 標識 SAG-1 プロンプを用いたサザンブロットによって確認した。SAG-1 mRNA の発現は、1-54 および 3-57 の脳、胸腺、脾臓および肝臓で認められ、その蛋白産物は、ウェスタンブロットによって脳、胸腺、脾臓および肝臓で確認された。しかし、BALB/c の組織では、脳、胸腺、脾臓および肝臓で RT-PCR による SAG-1 mRNA の発現は認められたが、蛋白産物を観察することはできなかった。SAG-1 蛋白の発現を確認できた 9 系統のトランスジェニックマウスについては、合計 3,564 の受精卵を液体窒素に保存した。なお、SAG-1 導入遺伝子は CAG プロモーター下で出生後だけでなく出生前においても発現していると推測され、このことは以下に述べる SAG-1 トランスジェニックマウスが SAG-1 分子に対して免疫寛容 (トレランス) となることの主要理由であると考えられた。

第 3 章においては、第 2 章で開発したトランスジェニックマウスにおけるトキソプラズマ原虫感受性と防御免疫応答について解析した。強毒のトキソプラズマ原虫である RH 株を感染させた場合、感染後 8 日までに SAG-1 トランスジェニックマウス、野生型 (wild type) マウスともに全頭が死亡した。しかし、弱毒のトキソプラズマ原虫である Beverley 株のブラディゾイトを腹腔内接種した場合、感染後 30 日目の生存率は 3-57、1-54 および野生型でそれぞれ 20、25 および 70% であった。また、同弱毒株のシストを腹腔内接種した場合、感染後 30 日目の生存率は 3-57、1-54 および野生型でそれぞれ 13、36 および 80% であった。このことから、3-57 および 1-54 の 2 系統におけるトキソプラズマ原虫に対する感受性には差違は認められないが、両系統の生存率は野生型に比べて著しく低いことが明らかになった。また、感染後 40 日目の生存 3-57 および 1-54 個体で調べた脳内シスト数は、野生型に比べてそれぞれ 4 倍および 2 倍と多かった。Th1 および Th2 各サイトカインの動態について、感染後 12 日間調べた結果、脾細胞が産生する IFN- γ 量は感染後 6 日目に最大となりその後減少したが、SAG-1 トランスジェニックマウスでは感染後 6 および 9 日目の IFN- γ 産生量が、野生型に比べて著しく少なかった。一方、IL-4 産生は、SAG-1 トランスジェニックマウスと野生型の間で、観察期間中、有意差が認められなかった。ラテックス凝集反応 (LAT) で調べたトキソプラズマ原虫に対する血清抗体価は、SAG-1 トランスジェニックマウスが野生型のそれよりも有意に低かった。トキソプラズマ原虫抽出物で免疫した場

合の血清抗体について、SAG-1 組換え体を抗原とする酵素標識免疫吸着法 (ELISA) で調べた結果、野生型マウスでは高い抗 SAG-1 抗体価が認められたが、SAG-1 トランスジェニックマウスでは抗 SAG-1 抗体は観察されなかった。さらに、合成 SAG-1 ポリペプチドで刺激した場合の T 細胞増殖も、野生型でのみ観察され、SAG-1 トランスジェニックマウスでは認められなかった。

第 4 章では、以上の研究に関する総合考察ならびに結語を行った。すなわち、本論文では、トキソプラズマ原虫の SAG-1 を発現するトランスジェニックマウスモデルの開発に成功した。また、この SAG-1 トランスジェニックマウスはトキソプラズマ原虫に対して感受性が増大していることを明らかにした。トランスジェニックマウスでは、Th1 サイトカインの IFN- γ などのトキソプラズマ原虫感染に対する防御に有用に機能する免疫応答の減退が顕著であった。このことにはトランスジェニックマウスにおける SAG-1 分子に対する免疫学的寛容の獲得が強く関わっていると考察した。すなわち、トキソプラズマ原虫感染に対する防御には、トキソプラズマ原虫細胞膜蛋白質である SAG-1 に対する宿主動物の免疫学的応答開始の有無が極めて重要であること、換言すればトランスジェニックマウスは SAG-1 分子寛容状態に陥るために感染後の生残が不可となることを、明らかにした。

以上、本論文は、SAG-1 がトキソプラズマ原虫感染に対する宿主動物の防御に機能する細胞性免疫応答の引き金として、重大な役割を担う蛋白分子であることを証明するとともに、トキソプラズマ症のような先天性感染症が抱える複雑な免疫学的側面に関しても、主要分子やその発現機構の解析解明に有用なマウスモデルの開発が可能であることを実証したものである。

審 査 結 果 の 要 旨

Toxoplasma gondii (トキソプラズマ原虫) は世界的に広く分布する原虫の一つである。人獣共通に先天性に感染して流産の原因となり、また免疫不全個体では致命的な日和見感染症の原因ともなることから、医学・獣医学上、極めて重要な原虫の一つとなっている。トキソプラズマ原虫は、有性および無性生殖期からなる複雑な生活環を有するとともに、非常に広範な種類の哺乳類有核細胞に感染可能である。このことが本原虫の多大な分布・流行を可能にしている。本原虫の生活史の維持と宿主体内における増殖には、細胞への接着・侵入が必要であり、これまでトキソプラズマ原虫からは、5 種類の主要表面蛋白質が報告されている。本論文で取り上げた SAG-1 はこの原虫細胞表面蛋白質の一つである。SAG-1 は、急速分裂増殖発育期であるタキゾイトから検出され、原虫の宿主細胞への接着・侵入と、宿主動物の細胞性免疫の誘起に関与することが示唆されてきた。しかし、最近、別の原虫細胞表面蛋白質についても研究が進展し、SAG-3 が SAG-1 と高い相同性を有し、SAG-1 同様に原虫の宿主細胞への接着・侵入にも関わる可能性が示された。また、SAG-5 や SRS (2, 3, 4) の遺伝子構造は、SAG-1 に類似していることが判明した。したがって、SAG-1 と相同性を有するトキソプラズマ原虫のタキゾイト遺伝子の中に、原虫の細胞感染に重要な機能を果たすものが複数存在している可能性が明らかになってきた。このような状況か

ら、トキソプラズマ原虫由来の蛋白質としては最もよく研究されてきた SAG-1 についても、トキソプラズマ症の病態や免疫機構に果たす役割と機能について、さらに詳細に解明する必要性が生じてきた。一方、遺伝子導入技術は、感染症における特定遺伝子の機能決定や分子機構の解明を図る上で、極めて有用な研究手段として、近年、脚光を浴びている。したがって、本論文ではこのような背景の基に、発生工学的手法を用いた SAG-1 機能の分子遺伝学レベルでの解明のための研究を実施した。本論文の構成は、(a) 遺伝子導入による SAG-1 発現トランスジェニックマウスの開発、(b) SAG-1 発現トランスジェニックマウスにおけるトキソプラズマ原虫感染症の病態と防御免疫の解析、を主題として 4 章からなる。

第 1 章では緒論として、トキソプラズマ原虫および SAG-1 について概説を行うと共に、原虫病分野における過去の発生工学的研究について概観を試みた。

第 2 章では、トキソプラズマ原虫の SAG-1 遺伝子導入マウスモデルを新規に開発した。このマウスモデルは、前核期のマウス受精卵に SAG-1cDNA を導入して開発した。SAG-1cDNA は、トキソプラズマ原虫 RH 株のタキゾイトから調製した mRNA を RT-PCR で増幅して作製した。クローニングした cDNA は、その塩基配列と発現蛋白の抗原性を確認後、全身性の発現制御能を有する CAG プロモーターの下流に組み込み、SAG-1 導入遺伝子を作製した。本プロモーター下における導入遺伝子の発現は、哺乳類培養細胞で確認した。導入遺伝子の 3.3 kbp の発現単位は、Sal I および Hind III サイトの切断によって作製し、マイクロマニピュレーターを用いて体外受精卵の雄性前核内に顕微注入した。体外培養で 2 細胞期に発生した受精卵を偽妊娠雌マウスに移植し、トランスジェニックマウスを得た。トランスジェニックマウス (founder mouse) が得られる成功率はマウス系統によって大きく異なり、BALB/c では 3.1% (1/32)、C57BL/6J では 0.7% (1/127) と、それぞれ 1 匹のトランスジェニックマウスしか得られなかったが、C57BL/6J x C3H/H F1 (B6C3F1) 由来の受精卵では 20% (34/172) にも達した。また、BALB/c と約 50% の B6C3F1 トランスジェニックマウスでは次世代への SAG-1 遺伝子の伝達を確認できたが、C57BL/6J と残りの B6C3F1 では確認できなかった。多数の B6C3F1 founder から選択した 3-57 および 1-54 の 2 系統をトランスジェニックマウスとして最終的に確立し、以後の研究を実施した。導入遺伝子が F1 から F2 マウスへ遺伝する割合は、BALB/c、1-54 および 3-57 で、それぞれ 56、43 および 45% であった。SAG-1 遺伝子の単一部位への組み込みは、³²P 標識 SAG-1 プロンプを用いたサザンブロットによって確認した。SAG-1 mRNA の発現は、1-54 および 3-57 の脳、胸腺、脾臓および肝臓で認められ、その蛋白産物は、ウエスタンブロットによって脳、胸腺、脾臓および肝臓で確認された。しかし、BALB/c の組織では、脳、胸腺、脾臓および肝臓で RT-PCR による SAG-1 mRNA の発現は認められたが、蛋白産物を観察することはできなかった。SAG-1 蛋白の発現を確認できた 9 系統のトランスジェニックマウスについては、合計 3,564 の受精卵を液体窒素に保存した。なお、SAG-1 導入遺伝子は CAG プロモーター下で出生後だけでなく出生前においても発現していると推測され、このことは以下に述べる SAG-1 トランスジェニックマウスが SAG-1 分子に対して免疫寛容 (トレランス) となることの主要理由であると考えられた。

第3章においては、第2章で開発したトランスジェニックマウスにおけるトキソプラズマ原虫感受性と防御免疫応答について解析した。強毒のトキソプラズマ原虫である RH 株を感染させた場合、感染後 8 日までに SAG-1 トランスジェニックマウス、野生型 (wild type) マウスともに全頭が死亡した。しかし、弱毒のトキソプラズマ原虫である Beverley 株のブラディゾイトを腹腔内接種した場合、感染後 30 日目の生存率は 3-57、1-54 および野生型でそれぞれ 20、25 および 70%であった。また、同弱毒株のシストを腹腔内接種した場合、感染後 30 日目の生存率は 3-57、1-54 および野生型でそれぞれ 13、36 および 80%であった。このことから、3-57 および 1-54 の 2 系統におけるトキソプラズマ原虫に対する感受性には差違は認められないが、両系統の生存率は野生型に比べて著しく低いことが明らかになった。また、感染後 40 日目の生存 3-57 および 1-54 個体で調べた脳内シスト数は、野生型に比べてそれぞれ 4 倍および 2 倍と多かった。Th1 および Th2 各サイトカインの動態について、感染後 12 日間調べた結果、脾細胞が産生する IFN- γ 量は感染後 6 日目に最大となりその後減少したが、SAG-1 トランスジェニックマウスでは感染後 6 および 9 日目の IFN- γ 産生量が、野生型に比べて著しく少なかった。一方、IL-4 産生は、SAG-1 トランスジェニックマウスと野生型の間で、観察期間中、有意差が認められなかった。ラテックス凝集反応 (LAT) で調べたトキソプラズマ原虫に対する血清抗体価は、SAG-1 トランスジェニックマウスが野生型のそれよりも有意に低かった。トキソプラズマ原虫抽出物で免疫した場合の血清抗体について、SAG-1 組換え体を抗原とする酵素標識免疫吸着法 (ELISA) で調べた結果、野生型マウスでは高い抗 SAG-1 抗体価が認められたが、SAG-1 トランスジェニックマウスでは抗 SAG-1 抗体は観察されなかった。さらに、合成 SAG-1 ポリペプチドで刺激した場合の T 細胞増殖も、野生型でのみ観察され、SAG-1 トランスジェニックマウスでは認められなかった。

第4章では、以上の研究に関する総合考察ならびに結語を行った。すなわち、本論文では、トキソプラズマ原虫の SAG-1 を発現するトランスジェニックマウスモデルの開発に成功した。また、この SAG-1 トランスジェニックマウスはトキソプラズマ原虫に対して感受性が増大していることを明らかにした。トランスジェニックマウスでは、Th1 サイトカインの IFN- γ などのトキソプラズマ原虫感染に対する防御に有用に機能する免疫応答の減退が顕著であった。このことにはトランスジェニックマウスにおける SAG-1 分子に対する免疫学的寛容の獲得が強く関わっていると考察した。すなわち、トキソプラズマ原虫感染に対する防御には、トキソプラズマ原虫細胞膜蛋白質である SAG-1 に対する宿主動物の免疫学的応答開始の有無が極めて重要であること、換言すればトランスジェニックマウスは SAG-1 分子寛容状態に陥るために感染後の生残が不可となることを、明らかにした。

以上、本論文は、SAG-1 がトキソプラズマ原虫感染に対する宿主動物の防御に機能する細胞性免疫応答の引き金として、重大な役割を担う蛋白分子であることを証明するとともに、トキソプラズマ症のような先天性感染症が抱える複雑な免疫学的側面に関しても、主要分子やその発現機構の解析解明に有用なマウスモデルの開発が可能であることを実証したものである。

以上について、平成12年1月25日に開催された審査委員会において審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Seng, S., Maki, Y., Yokoyama, M., Inoue, N., Igarashi, I., Nagasawa, H., Horiuchi, M., Omata, Y., Saito, A., Suzuki, N. and Toyoda, Y. (1996) Production of transgenic mice carrying p30 gene encoding major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. The Journal of Protozoology Research 6(4): 121-128.
2. Seng, S., Nagasawa, H., Maki, Y., Yokoyama, M., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I., Saito, A., Fujisaki, K., Mikami, T., Suzuki, N. and Toyoda, Y. (1999) Increased susceptibility to *Toxoplasma gondii* infection in SAG-1 transgenic mice. International Journal for Parasitology 29(9): 1433 -1436.
3. Seng, S., Maki, Y., Yokoyama, M., Suzuki, R., Kato, M., Bray, R.T., Lim, C., Zayatiin, B., Kamada, T., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T., Suzuki, N. and Toyoda, Y. (1999) Non-invasive method of identification of SAG-1 transgenic mice by PCR analysis of oral wash cells. The Journal of Protozoology Research 9(1): 10-16.
4. Seng, S., Yokoyama, M., Suzuki, R., Maki, Y., Kato, M., Lim, C., Zayatiin, B., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T., Suzuki, N. and Toyoda, Y. (1999) Parasitology Research (In Press)

既発表学術論文

1. Maki, Y., Seng, S., Kato, M., Hoshi, Y., Igarashi, I., Nagasawa, H., Toyoda, Y. and Suzuki, N. (1996) Sequence analysis of three major antigens (P30, P23 and P22) of virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. The Journal of Protozoology Research 6(3): 83-92.
2. Choi, Y.H., Seng, S. and Toyoda, Y. (1998) Effect of Taurine on *in vitro* fertilization and embryo development of BALB/c mouse strain. Journal of Reproduction and Development 44(1): 29-34.
3. Choi, Y.H., Seng, S., Boonchit, S. and Toyoda, Y. (1998) Capacitation and fertilizing ability of BALB/c mouse spermatozoa collection from different regions of the cauda epididymis. Journal of Reproduction and Development 44(3): 261-266.

4. Igarashi, I., Suzuki, R., Waki, S., Tagawa, Y.I., Seng, S., Tum, S., Omata, Y., Saito, A., Nagasawa, H., Iwakura, Y., Suzuki, N., Mikami, T. and Toyoda, Y. (1999) Roles of CD4⁺ T cells and gamma interferon in protective immunity against *Babesia microti* infection in mice. *Infection and Immunity* 67 (8): 4143-4148.