



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Molecular and cell biological studies on the cyst formation of Trichinella 1) Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with Trichinella spiralis 2) Differences and similarities of nurse cells in cysts of Trichinella spiralis and T. pseudospiralis(内容の要旨(Summary))
Author(s)	BOONMARS, THIDARUT
Report No.(Doctoral Degree)	博士(医学)甲 第595号
Issue Date	2005-03-25
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/14502

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)	BOONMARS THIDARUT (タイ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 595号
学位授与日付	平成 17年 3月 25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Molecular and cell biological studies on the cyst formation of <i>Trichinella</i>
	1) Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with <i>Trichinella spiralis</i>
	2) Differences and similarities of nurse cells in cysts of <i>Trichinella spiralis</i> and <i>T. pseudospiralis</i>
審査委員	(主査) 教授 高橋 優三 (副査) 教授 高見 剛 教授 中島 茂

論文内容の要旨

序文

寄生性線虫である旋毛虫は、宿主の筋肉細胞をナース細胞に変異させ、嚢を形成し、長期にわたって嚢内のナース細胞で寄生を続けるが、このナース細胞は形態的にも機能的にも筋肉細胞とは全く異なっている。最終分化細胞であるはずの筋肉細胞を他の細胞に変異させる機序は、不明のままである。また、旋毛虫には、*Trichinella spiralis*のように典型的な嚢壁形成を行う種と*T. pseudospiralis*のように嚢壁形成が不完全な種が存在し、その差は両者の旋毛虫の分泌物の差によるものと考えられるが、嚢壁形成に至る機序も不詳のままである。本研究ではこの筋肉細胞の変異機構を解明するために、感染筋肉細胞の嚢形成(ナース細胞)に至る形態変化を追跡すると共に、組織化学的な検討を行い変異細胞の特徴を明らかにし、アポトーシスの関与を関連遺伝子の発現で探った。

材料と方法

T. spiralis および *T. pseudospiralis* を経口的にマウスに感染させ、経時的に骨格筋を採取した。形態観察のために、感染筋肉サンプルを固定、抱埋し、光学顕微鏡用切片にはHE染色、電子顕微鏡切片にはウランおよびレイノルドの二重染色を行った。

感染細胞のアルカリフォスファターゼ (ALP) およびアシッドフォスファターゼ (ACP) の活性を検出するために、サンプルの凍結切片標本を作製し、ALP活性は基質として5-bromo-4-chloro (3 indolyl) (10-toluidine) salt および Nitroblue tetrazolium を、また ACP 活性は Naphthol ASBI phosphatase-pararosaniline を用い、組織化学染色を行った。デスミンおよびケラチンの組織内分布については、市販抗体を用いて、感染筋肉の凍結切片標本に間接免疫染色を行い検討した。

アポトーシス関連因子 (BAX, Apaf-1, Caspase 9 および PKB) に対する市販抗体を用いて、感染筋肉の凍結切片標本の間接免疫染色を行った。

Laser capture microdissection を用い凍結切片サンプルからナース細胞を採取し、また同じ切片より等量の正常筋肉細胞をコントロールとして採取した。以上のサンプルおよび経時的に採取した筋肉サンプルより全 RNA を抽出し、Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads (Amersham Pharmacia Biotech) により cDNA を合成した。その後、BAX, Apaf-1, Caspase 9 および PKB に特異的なプライマーを用い PCR を行った。それぞれの特異バンドの濃度を測定し、相対濃度を求めて発現量とした。

結果

T. spiralis 感染による最初の変化は、ミトコンドリアの膨化・消失である。さらに sarcomere 構造の消失後には、小型のミトコンドリアが新たに出現した。嚢が形成される時期には、感染筋肉由来のナース細胞質は、分裂・

増殖した衛星細胞由来の細胞質と融合した。

*T. pseudospiralis*の感染筋肉でも衛星細胞が分裂・増殖し、衛星細胞由来のナース細胞に誤分化するが、感染筋肉由来のナース細胞と融合しないまま留まっていた。

組織化学的には、*T. spiralis*感染では、ACPが陽性を示す塩基好性の感染筋肉由来の細胞が最初に出現、やがて縮小するが、その後ALPが陽性である酸好性の衛星細胞由来の細胞質が囊内の周辺部に出現する。アスマインの発現は塩基好性の細胞質で減少したが、酸好性の細胞質では増加した。セラチンは、どちらの細胞質にも検出されなかった。

一方、*T. pseudospiralis*感染細胞では、初期のACP活性は弱く、後に強くなるが、*T. spiralis*感染細胞に比べて弱かった。ALP活性は初期で弱く、その後強くなった。

BAX, Apaf-1, Caspase 9およびPKBの各遺伝子発現レベルは、対照の正常筋肉に比べ、感染筋肉細胞の方が高かった。*T. spiralis*感染細胞では、BAXおよびApaf-1の発現は感染初期より増加し、囊の形成が完成する感染後18日がピークで、感染後53日には対照と同程度まで低下したが、Caspase 9およびPKBの発現はBAXおよびApaf-1より遅れて増加し始めた。BAX, Apaf-1およびCaspase 9等の蛋白の局在について検索したところ、感染初期から塩基好性の感染筋肉由来の細胞に発現していた。PKBは酸好性の衛星細胞由来の細胞質で発現していた。

結語

旋毛虫 (*T. spiralis*) に感染した筋肉細胞は塩基好性の細胞質 (ナース細胞) に変異するが、この細胞質は形態的にアポトーシスの機序と判断できる特徴をもって死滅する。やがて筋肉細胞の傷害に対応して衛星細胞の分裂が起こるが、これは筋肉細胞に分化せず、酸好性の細胞質 (ナース細胞) に誤分化した。前者の細胞質ではアシッドフォスファターゼ活性が高く、アポトーシス促進因子が囊の形成の時期に合わせて発現されていた。後者の細胞質ではアルカリフォスファターゼ活性が高く、抗アポトーシス因子が発現されていた。感染後時間が経つにつれ、前者の細胞質が減少し、徐々に後者の細胞質に置き換わった。以上のごとく、*T. spiralis*の囊形成には、アポトーシスの機序が関与している事が明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

申請者 BOONMARS THIDARUTは、旋毛虫感染によって起こる筋肉内の囊形成について、筋肉細胞の変異(ナース細胞形成)に重点を置き、形態(電子顕微鏡, 光学顕微鏡)的、組織化学(酵素化学, 免疫組織化学)的、分子生物学(遺伝子発現)的に分析した。その結果ナース細胞形成は、筋肉細胞の変異とアポトーシスによる細胞の死滅と、衛星細胞の誤分化と抗アポトーシス因子による細胞の延命によるものであることを明らかにした。この結果は、古典的に知られていた囊形成の機序を分子レベルで解明したものであり、寄生虫学の発展に少なからず寄与するものである。

[主論文公表誌]

Molecular and cell biological studies on the cyst formation of *Trichinella*

- 1) Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*.
Parasitology 128, 323-332 (2004)
- 2) Differences and similarities of nurse cells in cysts of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*.
J Helminthol 78, 7-16 (2004)