

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05275

研究課題名(和文)中国のトキソプラズマの系統学及び病原性の解析

研究課題名(英文)Analysis of Chinese Toxoplasma phylogeny and virulence

研究代表者

山本 雅裕 (Yamamoto, Masahiro)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00444521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマは、ヒトでは免疫不全者で脳症や肺炎などを主症状とする致死的な後天性トキソプラズマ症を引き起こす寄生虫である。さらに妊婦が初感染すると胎児がトキソプラズマに感染し流産あるいは感染したまま生まれ、先天性トキソプラズマ症も引き起こす。この病原体は、ヒトにおいては世界人口の約3分の1が感染しているといわれ、我が国でも感染している人は少なくない。アジアにおけるトキソプラズマは、研究が進んでいる欧米各国のトキソプラズマに比べてよく分かっていない。本研究ではアジアの中で比較的トキソプラズマのフィールド研究が進んでいる中国の研究者とともに、中国株の病原性及びゲノム情報を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トキソプラズマは免疫不全のヒトで致死的な病気を引き起こす病原体である。世界人口の3分の1が感染していると言われているが、アジアにおける実態はよくわかっていない。そこで中国の寄生虫学者とともに、中国においてトキソプラズマを分離し、その病原性や病原性因子群の遺伝子多型について検討を行った。その結果、複数の中国分離株が得られ、系統によって病原性が異なることが分かり、さらに病原性が強い方では原虫の増殖やマウス個体レベルでのサイトカインストームが起きることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Toxoplasma gondii is an pathogen causing lethal toxoplasmosis in immunocompromised individuals those suffering from AIDS and being treated by chemotherapy. In addition, this pathogen causes congenital diseases when pregnant women are firstly infected. It is postulated that nearly one-third of world populatin are oppopotunistically infected with T. gondii. Therefore, number of T. gondii-infected Japanese people might be also high. However, how Asian T. gondii including Japanese ones acts remains unclear. Therefore, we have analyzed virulence and whole genome information about Chinese T. gondii in collaboration with Chinese parasitologists.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ 中国 病原性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

病原性原虫「トキソプラズマ」は、特に我々ヒトでは AIDS 患者や化学療法下にある癌患者などの免疫不全者で脳症や肺炎などを主症状とする致死的な後天性トキソプラズマ症を引き起こす寄生虫である。さらに妊婦が初感染すると胎児がトキソプラズマに感染し流産あるいは感染したまま生まれ、新生児で脳の石灰化や網膜の炎症などになる先天性トキソプラズマ症も引き起こし、マスコミ等で取上げられ注目され、その存在が日本社会においても暗い影を落とし始めた。この病原体は、ヒトにおいては世界人口の約 3 分の 1 が感染しているといわれる。我が国でのトキソプラズマ感染率は 20 代で 10%、30 代で 20%、50 代では 40% と、年齢に応じて増加している。トキソプラズマはネコが終宿主であるが、その他の恒温動物が中間宿主となり、従って、家畜であるウシ・ブタ・トリ・ヒツジなどにも感染しており、トキソプラズマが感染した汚染肉を過熱不十分で食することにより、ヒトに経口感染することが主な感染ルートであると考えられる。また、感染性の非常に強いトキソプラズマが終宿主のネコの腸から糞便などと一緒に環境中に放出され、それに汚染した水や野菜を食べることによって、集団感染する例も海外では報告されている。90 年代にトキソプラズマの分子生物学的な手法が米国グループで編み出されて以来、ヒトや家畜などの中に単一集団もしくは複数の集団で存在しているのかについての研究がなされてきた。特に北米や欧州で分離されるトキソプラズマは遺伝子配列から 3 つの遺伝子型 (I 型、II 型、III 型) からなることが米国グループから報告され、その後長くトキソプラズマは I/II/III 型のいずれかに大別されると考えられてきた。しかし 2000 年代に入り、南米でトキソプラズマ症患者あるいは家畜肉などから分離されたトキソプラズマが I、II、III 型のどれに当てはまるのかということが調べられ、その結果、I, II, III 型分類は北米・欧州分離株にはあてはまるものの、南米分離型株はそのいずれでもない非典型な (atypical) 遺伝子型であることが報告された。その後米国グループにより、北中南米やヨーロッパやアフリカなどの国々で分離され、複数の染色体にまたがる各塩基配列マーカーが大規模に調べられ、「現在のトキソプラズマは 6 つのクレード (共通の祖先から派生した全ての子孫により構成される集団) に分けられる」という新たな説が提唱された。

### 2. 研究の目的

一方、アジアにおけるトキソプラズマの性状は米国グループが行っているような世界標準レベルでの解析はされておらず不明である。そこでトキソプラズマの採取が比較的容易な中国においてトキソプラズマを採取し、系統解析及び病原性の解析を行い、アジアのトキソプラズマの性状を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

寧波大学及び安徽医科大学において、中国全土から豚・牛・鳥の生肉を収集した。生肉片を PBS でホモゲナイズ後、ペプシン処理によって消化して調整した懸濁液をマウスの腹腔に投与し、マウスを経時的に観察する。2 週間後に血清を採取し、トキソプラズマの有無について抗体価を測定する。また衰弱し始めたマウスの腹腔から腹腔滲出液を採取し、原虫の虫体の存在は原虫特異的抗体を使用した免疫染色法にて確認した。原虫が分離された場合には、マウスの個体を使った限界希釈を行い逐次株化した。ゲノム DNA を採取し、次世代シーケンサーでゲノム配列を決定した。さらに株化したトキソプラズマ中国株の病原性をマウスで検討した。

### 4. 研究成果

中国株 txCh3 及び txCh6 の分離に成功した。txCh3 と txCh6 の病原性について検討するために、中国株を  $10^0 \sim 10^5$  ずつ野生型の C57BL/6 (B6) マウスの腹腔に感染させ生存率を検討し、LD50 を求め病原性を評価した。対照群として、I 型 (RH 株)、II 型 (Pru 株)、III 型 (CTG 株) を別々に感染させる。LD50 が I 型原虫は  $10^0$  である (高病原性) のに対して、II 型原虫は  $10^3$  (中病原性)、III 型原虫は  $10^5$  (低病原性) であることから、中国分離株の病原性が I/II/III 型と比較してどの程度かを検討したところ、txCh3 株は RH 株と同様に感染後 10 日以内に野生型マウスが死亡した。一方、txCh6 株は Pru 株感染と同様に野生型マウスは死亡せず、インターフェロン (IFN $\gamma$ ) 受容体欠損マウスでのみ病原性が確認された。次にマウスを死亡させる能力のあった txCh3 株については、経時的に血清を採取し TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12、IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$  などの炎症性サイトカインの濃度を計測したところ、感染マウスではサイトカインの過剰産生が起こっていたことから、死亡マウスは免疫の働きすぎ・サイトカインストームによる死因であることが示唆された。また、感染後経時的に腹腔、脾臓やリンパ節を採取して、原虫の存在はゲノム DNA を使用した定量的 PCR を行った結果、txCh3 株原虫の顕著な増殖が認められたことから、サイトカインストームに加えて、主要臓器における原虫数の増加も死亡原因の一つであることが考えられた。txCh3 株の全ゲノム配列を決定し、ROP5、ROP16、ROP17、ROP18、GRA6 などの遺伝子多型を検討した。その結果、これらの遺伝子座に関して txCh3 株は RH 株と同じ遺伝子多型を有していることが分かった。また他の多型遺伝子座については Pru 株や CTG 株と同じものや、そのどれにも当てはまらないものもあったことから、txCh3 株のユニークさも示唆された。今

後、txCh3 株のみならず txCh6 株の免疫学的特性や病原性あるいはゲノム配列を解読し、txCh3 株や標準株との比較を行っていく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 17 件)

- Orimo T, Sasaki I, Hemmi H, Ozasa T, Fukuda-Ohta Y, Ohta T, Morinaka M, Kitauchi M, Yamaguchi T, Sato Y, Tanaka T, Hoshino K, Katayama KI, Fukuda S, Miyake K, **Yamamoto M**, Satoh T, Furukawa K, Kuroda E, Ishii KJ, Takeda K, Kaisho T. Cholera toxin B induces interleukine-1 $\beta$  production from resident peritoneal macrophages through pyrin as well as NLRP3 inflammasome. *Int Immunol*. 査読有, 2019 印刷中  
doi: 10.1093/intimm/dxz004.
- Briard B, Karki R, Malireddi RKS, Bhattacharya A, Place DE, Mavuluri J, Peters JL, Vogel P, **Yamamoto M**, Kanneganti TD. Fungal ligands released by innate immune effectors promote inflammasome activation during *Aspergillus fumigatus* infection. *Nat Microbiol*. 査読有, 2019, Vol.4, No.2, pp.316-327.  
doi: 10.1038/s41564-018-0298-0.
- Kim JK, Kim YS, Lee HM, Jin HS, Neupane C, Kim S, Lee SH, Min JJ, **Sasai M**, Jeong JH, Choe SK, Kim JM, **Yamamoto M**, Choy HE, Park JB, Jo EK. GABAergic signaling linked to autophagy enhances host protection against intracellular bacterial infections. *Nat Commun*. 査読有, 2018 Vol. 9, No. 1, pp. 4184.  
doi: 10.1038/s41467-018-06487-5.
- Bando H, Lee Y, Sakaguchi N, Pradipta A, Ma JS, Tanaka S, Cai Y, Liu J, Shen J, Nishikawa Y, Sasai M, **Yamamoto M**. Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for *Toxoplasma* GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response. *MBio*. 査読有, 2018, Vol. 9, No. 5.  
doi: 10.1128/mBio.01738-18.
- Bando H, Sakaguchi N, Lee Y, Pradipta A, Ma JS, Tanaka S, Lai DH, Liu J, Lun ZR, Nishikawa Y, Sasai M, **Yamamoto M**. *Toxoplasma* Effector TgIST Targets Host IDO1 to Antagonize the IFN- $\gamma$ -Induced Anti-parasitic Response in Human Cells. *Front Immunol*. 査読有, 2018 Vol. 9, pp. 2073.  
doi: 10.3389/fimmu.2018.02073.
- Ingram JP, Tursi S, Zhang T, Guo W, Yin C, A Wynosky-Dolfi M, van der Heijden J, Cai KQ, **Yamamoto M**, Finlay BB, Brodsky IE, Grivennikov SI, Tükel Ç, Balachandran S. A Nonpyroptotic IFN- $\gamma$ -Triggered Cell Death Mechanism in Nonphagocytic Cells Promotes *Salmonella* Clearance In Vivo. *J Immunol*. 査読有, 2018, Vol. 200, No. 10, pp.3626-3634.  
doi: 10.4049/jimmunol.1701386.
- Liu BC, Sarhan J, Panda A, Muendlein HI, Ilyukha V, Coers J, **Yamamoto M**, Isberg RR, Poltorak A. Constitutive Interferon Maintains GBP Expression Required for Release of Bacterial Components Upstream of Pyroptosis and Anti-DNA Responses. *Cell Rep*. 査読有, 2018 Vol. 24, No. 1, pp.155-168.e5.  
doi: 10.1016/j.celrep.2018.06.012.
- Balakrishnan A, Karki R, Berwin B, **Yamamoto M**, Kanneganti TD. Guanylate binding proteins facilitate caspase-11-dependent pyroptosis in response to type 3 secretion system-negative *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Death Discov*. 査読有, 2018, Vol. 5, pp. 3.  
doi: 10.1038/s41420-018-0068-z.
- Ogawa M, Matsuda R, Takada N, Tomokiyo M, Yamamoto S, Shizukusihi S, Yamaji T, Yoshikawa Y, Yoshida M, Tanida I, Koike M, Murai M, Morita H, Takeyama H, Ryo A, Guan JL, **Yamamoto M**, Inoue JI, Yanagawa T, Fukuda M, Kawabe H, Ohnishi M. Molecular mechanisms of *Streptococcus pneumoniae*-targeted autophagy via pneumolysin, Golgi-resident Rab41, and Nedd4-1-mediated K63-linked ubiquitination. *Cell Microbiol*. 査読有, 2018 Vol. 20, pp. e12846.  
doi: 10.1111/cmi.12846.
- Sasai M, Pradipta A, **Yamamoto M**. Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int Immunol*. 査読有, 2018, Vol. 30, pp. 113-119.  
doi: 10.1093/intimm/dxy004.
- Santos JC, Dick MS, Lagrange B, Degrandi D, Pfeffer K, **Yamamoto M**, Meunier E, Pelczar P, Henry T, Broz P. LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *EMBO J*. 査読有, 2018, Vol. 37, No. 6.  
doi: 10.15252/embj.201798089.
- Finethy R, Luoma S, Orench-Rivera N, Feeley EM, Haldar AK, **Yamamoto M**, Kanneganti TD, Kuehn MJ, Coers J. Inflammasome Activation by Bacterial Outer Membrane Vesicles Requires Guanylate Binding Proteins. *MBio*. 査読有, 2017 Vol. 8, No. 5.  
doi: 10.1128/mBio.01188-17.

Wallet P, Benaoudia S, Mosnier A, Lagrange B, Martin A, Lindgren H, Golovliov I, Michal F, Basso P, Djebali S, Provost A, Allatif O, Meunier E, Broz P, **Yamamoto M**, Py BF, Faudry E, Sjöstedt A, Henry T. IFN- $\gamma$  extends the immune functions of Guanylate Binding Proteins to inflammasome-independent antibacterial activities during *Francisella novicida* infection. *PLoS Pathog.* 査読有, 2017 Vol. 13, No. 10, pp. e1006630.  
doi: 10.1371/journal.ppat.1006630.

Chida T, Ito M, Nakashima K, Kanegae Y, Aoshima T, Takabayashi S, Kawata K, Nakagawa Y, **Yamamoto M**, Shimano H, Matsuura T, Kobayashi Y, Suda T, Suzuki T. Critical role of CREBH-mediated induction of TGF- $\beta$ 2 by HCV infection in fibrogenic responses in hepatic stellate cells. *Hepatology.* 査読有, 2017, Vol. 66, No. 5, pp. 1430-1443.  
doi: 10.1002/hep.29319.

Zwack EE, Feeley E, Burton AR, Hu B, **Yamamoto M**, Kanneganti TD, Bliska JB, Coers J, Brodsky IE. Guanylate Binding Proteins regulate inflammasome activation in response to hyper-injected *Yersinia* translocon components. *Infect Immun.* 査読有, 2017, Vol. 85, No. 10. doi: 10.1128/IAI.00778-16.

Biering SB, Choi J, Halstrom RA, Brown HM, Beatty WL, Lee S, McCune BT, Dominici E, Williams LE, Orchard RC, Wilen CB, **Yamamoto M**, Coers J, Taylor GA, Hwang S. Viral Replication Complexes Are Targeted by LC3-Guided Interferon-Inducible GTPases. *Cell Host Microbe.* 査読有, 2017 Vol. 22, pp. 74-85.e7.  
doi: 10.1016/j.chom.2017.06.005.

Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley DM, Yoshimori T, **Yamamoto M**. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat Immunol.* 査読有, 2017, Vol. 18, pp. 899-910.  
doi: 10.1038/ni.3767.

[学会発表](計 17 件)

**山本雅裕**「トキソプラズマの寄生虫免疫学から導かれた意外な創薬ターゲット」新興・再興感染症制御プロジェクト 合同シンポジウム (国立感染症研究所、新宿区、東京、2019年3月18日)

**山本雅裕**「病原性寄生虫トキソプラズマと宿主免疫の攻防」第1回 日本医学会連合 Rising Star リトリート (かずさアカデミアパーク、木更津、千葉、2019年3月4~5日)

**Masahiro Yamamoto**「LC3 and GABARAP subfamilies of mouse ATG8 differentially down-regulate innate immunity」Autophagy: From Model Systems to Therapeutic Opportunities, KEYSTONE SYMPOSIA (Eldorado Hotel, Santa Fe, New Mexico, USA, 2019年2月17-21日)

**Masahiro Yamamoto**「Targeted disruption of IFN- $\gamma$ -induced IDO1-dependent anti-parasitic response in human cells by *Toxoplasma* effector TgIST」The 3<sup>rd</sup> Asian Congress of Protistology & 10<sup>th</sup> Asian Conference of Ciliate Biology & 2<sup>nd</sup> International Symposium on Biodiversity and Evolution of Protozoa (San-Yat Sen University, Guangzhou, China, November 24-26, 2018)

**山本雅裕**「トキソプラズマの宿主免疫返り討ち戦法について」第26回分子寄生虫学ワークショップ/第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 特別企画・免疫 (道後温泉花ゆづき、松山、愛媛、2018年9月19日—22日)

**Masahiro Yamamoto**「Role of cell-intrinsic and innate immunity by interferon-inducible GTPases」The 10<sup>th</sup> Japanese-German Immunology Workshop. Session 3: Uniqueness in the Development and Function of Innate Immunity. (Hotel Ludvig der Bayer, Ettal, Germany, September 6<sup>th</sup>-9<sup>th</sup>, 2018)

**Masahiro Yamamoto**「Host cell-intrinsic host defense and counter defenses against *Toxoplasma*」ICOPA2018 Biology and interaction of host/cell and *Toxoplasma gondii* infection (Exco, Daegu, Korea, August 19-24, 2018)

**山本雅裕**「IFN $\gamma$ による宿主免疫系におけるオートファジー関連分子群の非標準的役割」日本インターフェロン・サイトカイン学会 シンポジウム2「共生と病原微生物研究の最前線」S2-2 (秋葉原コンベンションホール、秋葉原、東京、2018年7月26日-27日)

**山本雅裕**「感染防御免疫系における ATG8 ファミリー分子群の役割」千里ライフサイエンスセミナー M2 オートファジーと疾患 (千里ライフサイエンスセンター 山村雄一記念ライフホール、豊中、大阪、2018年6月26日)

**Masahiro Yamamoto**「Essential role of ATG proteins in cell-autonomous innate immunity to vacuolar pathogens」15<sup>th</sup> International Conference on Innate Immunity, Aegean Conferences (Avra Imperial Hotel, Crete, Greece, June 18-23, 2018)

**Masahiro Yamamoto**「Role of Atg8 in the regulation of NLRP3 inflammasome-mediated

pyroptosis」Australia-Japan Meeting on Cell Death (Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, May 22-23, 2018)

**山本雅裕** 「肝臓機マラリア原虫の文化に重要な宿主因子の探索」第70回日本衛星動物学会大会 大会シンポジウム 蚊とマダニ - 病原体とベクターの生物学— (帯広畜産大学、帯広、北海道、5月12-13日, 2018)

**Masahiro Yamamoto** 「A family member of phospholipase C is required for CD8 T cell-mediated anti-Toxoplasma host defense」WHIP 2018 22<sup>th</sup> Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA, April 15-18, 2018)

**Masahiro Yamamoto** 「Suppression of human IFN- $\gamma$ -mediated anti-parasitic cell-autonomous immunity by a Toxoplasma effector」Cells vs Pathogens: Intrinsic Defenses and Counterdefenses Keystone Symposia (Hyatt Regency Monterey, Monterey, California, USA, March 23-26, 2018)

**山本雅裕** 「抗トキソプラズマ宿主免疫が明らかにした ATG 分子群のオートファジー非依存的役割」2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (神戸、兵庫県、2017 年 12 月 6 日)

**Masahiro Yamamoto** 「Immunoparasitology of Toxoplasma gondii」Keynote lecture-5 ICE on IMERI The 2<sup>nd</sup> International Conference and Exhibition on Indonesian Medical Education and Research Institute (Jakarta, Indonesia, November 7<sup>th</sup>-9<sup>th</sup>, 2017)

**Masahiro Yamamoto** 「A mechanism of interferon- $\gamma$ -induced anti-Toxoplasma gondii host defense」The 7<sup>th</sup> International Symposium on Parasitology (Jiujiang City, Jiangxi Province, China, 13-17 October, 2017)

〔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〕

ホームページ等

<http://immpara.biken.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：笹井 美和

ローマ字氏名：(Sasai, Miwa)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。