

令和元年9月3日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15677

研究課題名(和文)トキソプラズマによる「ヒト」自然免疫抑制機構の解析

研究課題名(英文) *Toxoplasma gondii* effectors differentially target host ID01 to antagonize the IFN- γ -induced anti-*T. gondii* response in human cells

研究代表者

伴戸 寛徳 (BANDO, HIRONORI)

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：60724367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマはヒトを含む全ての恒温動物に感染する人畜共通の寄生虫であり、エイズや臓器移植など免疫不全状態になると致死的な症状を引き起こします。また、妊婦が初感染すると流産や新生児の先天性トキソプラズマ症の原因となることが知られています。近年、日本国内でのトキソプラズマ症の症例数は、年々増加しているため、新たなトキソプラズマ対策が必要とされています。これまで多くの研究はモデル生物を用いてきましたが、本研究では、ヒトの細胞を用いることで、ヒトの細胞内でトキソプラズマ感染時に起こる免疫応答と、その免疫応答を回避するためにトキソプラズマが用いている病原性因子を明らかとしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で私たちは、ヒトの細胞で抗トキソプラズマ免疫反応に重要な宿主分子としてID01を同定し、また、実際にトキソプラズマはヒトの細胞では、ID01を抑制する病原因子を利用していることも示しました。この研究成果から、ID01を新たな標的として、その機能を高めることによって新規の治療・予防戦略を提供できることが期待されます。さらに本研究では、トキソプラズマがID01の機能を阻害するために病原因子を利用して産生誘導しているNOの産生を阻害すると、トキソプラズマによる免疫抑制作用を回避できることも示しました。この成果から、NO阻害剤がトキソプラズマ症の新規の治療戦略となることが期待されます。

研究成果の概要(英文)： *Toxoplasma* is an important intracellular pathogen that causes lethal toxoplasmosis in humans and animals. Interferon- γ (IFN- γ) is critical for anti-*T. gondii* responses in both human and mice. Recent studies use the mouse as a model organism and show the relation between host immunity and *T. gondii* virulence in mice. On the other hands, the relation in human is not completely clear. Therefore, we focus on *T. gondii* virulence strategy to resist IFN- γ -induced anti-*T. gondii* responses in human. At first, we showed that IFN- γ -induced tryptophan degradation by indole-2,3-dioxygenase plays an important role in the IFN- γ -induced inhibition of *T. gondii* in various human cell types. Next, we showed the role of *T. gondii* virulence factor TgIST or TgGRA15 to suppress IFN- γ -dependent immunity. Thus, we clear the interaction between *T. gondii* and host immune response in human cells.

研究分野：寄生虫免疫学

キーワード：トキソプラズマ ヒト 病原因子 ID01 TgIST GRA15

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマはヒトを含む全ての恒温動物に感染する人畜共通の寄生虫であり、世界人口の3分の1が感染していると言われている。免疫系が正常である場合、ヒトは感染しても重症化することはほとんど無いが、エイズや臓器移植など免疫不全状態になると致死的な症状を引き起こすことや、妊婦が初感染すると流産や新生児の先天性トキソプラズマ症の原因となることが知られている。近年、日本ではトキソプラズマ症の症例数が年々増加していることが明らかとなっており、新たなトキソプラズマ対策が必要とされている。これまでの多くの研究は、モデル生物であるマウスを使うことで、宿主-トキソプラズマ間相互作用を明らかとしてきた。しかしながら、ヒトではどのような免疫反応が抗トキソプラズマ応答に重要であるか、また、その宿主免疫反応をトキソプラズマはどのように抑制しているのかについては未だ多くが不明だった。

2. 研究の目的

トキソプラズマは宿主免疫系を抑制することで多種多様な細胞に感染し、ヒトを含む多くの生物に不顕性感染することが知られている。これまでの多く研究から、モデル生物であるマウス細胞および生体内における宿主-病原体間相互作用は徐々に明らかとなりつつあるが、ヒトの細胞内における病原体排除機構および免疫回避機構はほとんど明らかとなっていない。そこで本研究では、

(1) ヒトの細胞内においてインターフェロンガンマ (IFN- γ) 依存的な抗トキソプラズマ応答に関与する宿主因子と、その詳細な排除機構の解明を行う。

(2) 宿主免疫の回避機構に関与するエフェクター分子および原虫由来物質の同定とその作用機序の解明を行う。

これらを明らかとすることで、ヒトの細胞内における宿主-病原体相互作用を包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 「ヒトの細胞内において IFN- γ 依存的な抗トキソプラズマ応答に関与する宿主因子と、その詳細な排除機構の解明」を行うために、様々な IFN- γ 誘導性遺伝子を欠損させたヒト細胞を作成し、抗トキソプラズマ応答を比較解析することで、抗トキソプラズマ応答に重要な宿主因子を特定し、その作用機序の解析を行う。

(2) 「宿主免疫の回避機構に関与するエフェクター分子および原虫由来物質の同定とその作用機序の解明」を行うために、既存の病原性関連遺伝子 (GRAs や TgIST) をそれぞれ欠損したトキソプラズマを作製し、(1) で同定した抗トキソプラズマ宿主因子の発現や機能に与える影響を分子生物学的手法により検討する。また、IFN- γ 依存的な抗トキソプラズマ応答を阻害する病原性メカニズムを、単一の細胞内だけではなく、より生体に近い条件であるヒト細胞の共培養も用いて免疫寄生虫学的手法により解析する。

4. 研究成果

(1) 本研究ではまず、既にマウスの細胞において IFN- γ 依存的な抗トキソプラズマ免疫反応に必須の分子として知られている ATG16L1 が、ヒトの細胞 (HAP1 細胞) では宿主免疫反応に関与していないことを明らかと

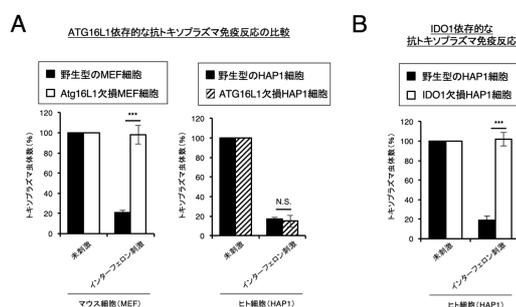


図1 ヒトの細胞では抗トキソプラズマ免疫反応に IDO1 が重要な役割を果たす

した(図 1 A)。そこで次に、IFN- γ 誘導性タンパク質群であり、トキソプラズマの増殖に必須の栄養素を分解する酵素に注目し、これらの分解酵素が抗トキソプラズマ免疫反応に及ぼす影響を解析した。その結果、IDO1 と呼ばれるトリプトファン分解酵素の一つが、ヒトの細胞では IFN- γ 依存的な抗トキソプラズマ免疫反応に重要な役割を果たしていることを明らかとした (図 1B)。さらに、IDO1 はどのような作用機序によって虫体数の減少を引き起こしているかを解析した結果、IDO1 欠損細胞と野生型細胞では、感染後 3 時間、24 時間ともにトキソプラズマに感染している細胞数が同じであり、IDO1 はトキソプラズマの殺傷能には関係無いことが明らかとなった (図 2A, 2B)。一方、感染 24 時間の 1 つの寄生胞の中に存在する虫体数を比較すると、IDO1 欠損細胞では虫体数が増加しており、IDO1 依存的な抗トキソプラズマ免疫反応に伴う虫体数の減少は、トキソプラズマの増殖抑制によるものであることが明らかとなった (図 2C)。

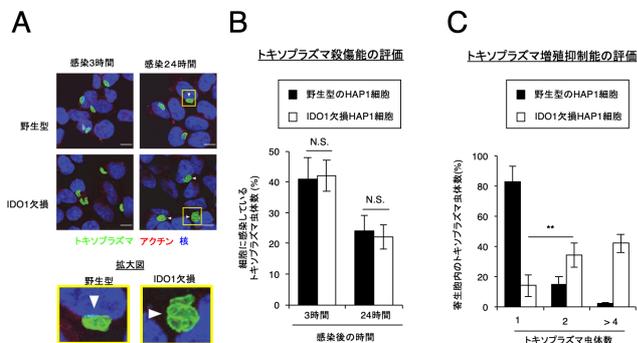


図2 IDO1 はトキソプラズマの殺傷能には関係がなく、増殖抑制に重要な役割を果たす

(2) 次に、IDO1 依存的な宿主免疫の回避機構に関与するトキソプラズマ病原性因子の同定とその作用機序の解明を行なった。トキソプラズマは、様々な病原性因子を分泌して宿主の免疫反応を抑制していることが知られているが、ヒトの細胞ではどのような病原性因子を利用して IDO1 依存的な免疫反応を抑制しているかは不明だった。そこで本研究ではまず、宿主免疫系の活性化に関与する宿主分子 STAT1 の活性化を阻害することで知られているトキソプラズマの病原性因子「TgIST」に着目し、TgIST を欠損したトキソプラズマを作製し、IFN- γ 刺激後の虫体数を野生型のトキソプラズマを感染させた場合と比較した。その結果、TgIST 欠損トキソプラズマは、野生型と比較して虫体数が減少することが明らかとなった (図 3A)。また、STAT1 依存的に発現する宿主分子 IRF1 と IDO1 のタンパク質発現も比較した結果、TgIST 欠損トキソプラズマが感染した細胞では、IRF1 と IDO1 の発現が野生型のトキソプラズマを感染させた場合より強く発現誘導されていることが明らかとなった (図 3B)。これらの結果から、トキソプラズマはヒトの細胞では病原性因子 TgIST を分泌して、STAT1 の活性化を阻害することで IDO1 の発現を抑制していることが明らかとなった。

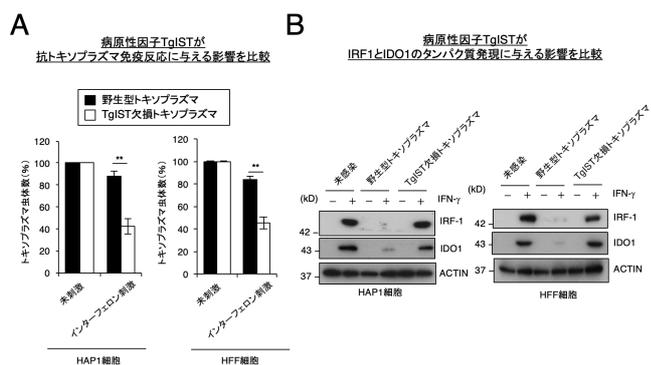


図3 病原性因子 TgIST は STAT1 の活性化を抑制して IDO1 の発現を阻害する

次に、未だ病原性因子としての生理的意義が不明であったトキソプラズマの病原性因子「GRA15」に着目した。まずはじめに、従来の培養法 (単独培養系) によって、ヒトのマクロファージや肝臓細胞に、野生型トキソプラズマまたは GRA15 欠損トキソプラズマを感染させたところ、GRA15 の有無にかかわらずトキソプラズマは IFN- γ 刺激によって増殖が抑制され、GRA15 の役割を見出すことはできなかつた (図 4A)。一般的に、宿主に感染したトキソプラズマは、まずマクロファージに感染することで、様々な臓器へ感染を広げるが知られている。そこで、肝臓

細胞とトキソプラズマに感染したマクロファージを一緒に培養する系（共培養系）で感染実験を行なった。その結果、野生型のトキソプラズマに比べて GRA15 を欠損したトキソプラズマは、IFN- γ 存在下で増殖できないことが明らかとなった（図 4B）。

次に、GRA15 の作用機序の解析を行なった結果、まず感染マクロファージはトキソプラズマの

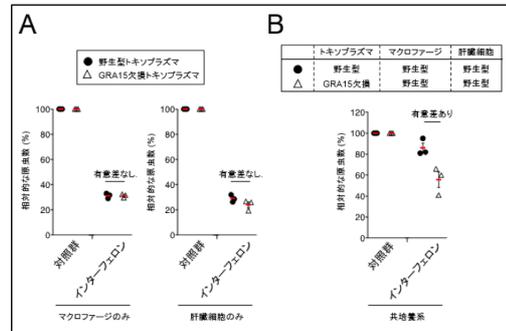


図 4 GRA15 依存的な抗トキソプラズマ免疫応答抑制

GRA15 依存的にインターロイキン (IL-1) と呼ばれるサイトカインを産生し、放出することが明らかとなった（図 5A）。そこで IL-1 を肝臓細胞に作用させたところ IFN- γ と相乗的に働き、肝臓細胞において NO を合成する酵素の一つである誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の発現が上昇し、NO の合成が誘導され（図 5B）、さらにこの NO が、ヒトにおいて抗トキソプラズマ免疫応答に必須の役割をしている IDO1 のタンパク質量が著しく減少させ、免疫応答を抑制していることが明らかとなった（図 5C）。

さらに、iNOS の阻害剤を加えることによって、共培養系における野生型トキソプラズマの増殖を抑制することが明らかとなった（図 5D）。

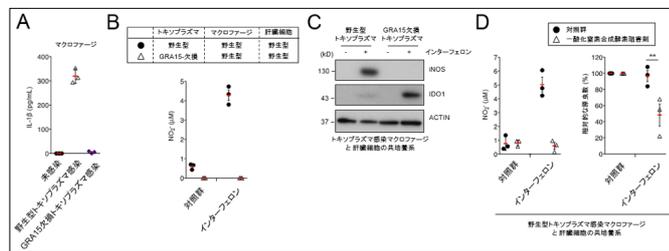


図 5 GRA15 依存的な一酸化窒素の産生と一酸化窒素産生阻害によるトキソプラズマの増殖抑制

以上の結果から、

- ① ヒトの細胞では宿主分子 IDO1 が抗トキソプラズマ免疫反応に重要な役割を果たすこと
- ② IDO1 による抗トキソプラズマ免疫反応の作用機序は増殖抑制であること
- ③ トキソプラズマの病原性因子 TgIST はヒトの細胞では STAT1 の活性化を阻害することで IDO1 の発現を抑制していること
- ④ トキソプラズマの病原性因子 GRA15 はヒトの細胞では iNOS および NO の産生を誘導することで IDO1 の発現を抑制していること

が明らかとなりました。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. **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*. (2018) 9:5 (査読あり)
DOI: 10.1128/mBio.01738-18.
2. **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- γ -Induced Anti-parasitic Response in Human Cells. *Front Immunol*. (2018) 9:2073 (査読あり)
DOI: 10.3389/fimmu.2018.02073.
3. 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*. (2017) 18:899-910. (査読あり)
DOI: 10.1038/ni.3767.

〔学会発表〕（計 4 件）

1. 第 87 回日本寄生虫学会大会 口頭発表 2019 年 3 月

「トキソプラズマ病原性因子 GRA15 による iNOS 依存的な宿主免疫抑制機構の解明」

伴戸 寛徳、Youngae Lee、坂口 直哉、Ariel Pradipta、Ji Su Ma、田中 舜、西川 義文、笹井 美和、山本 雅裕

2. 14th International Congress of Parasitology ICOPA 2018 Oral 2018 年 8 月

“*Toxoplasma gondii* effectors differentially target host IDO1 to antagonize the IFN- γ -induced anti-*T. gondii* response in human cells”

Hironori Bando, Youngae Lee, Naoya Sakaguchi, Ariel Pradipta, Ji Su Ma, Yihong Cai, Jianfa Liu, Jilong Shen, Yoshifumi Nishikawa, Miwa Sasai, Masahiro Yamamoto

3. 第 86 回日本寄生虫学会大会 口頭発表 2018 年 3 月

「トキソプラズマ病原性因子 GRA15 による宿主免疫抑制機構の解明」

伴戸 寛徳、Youngae Lee、坂口 直哉、Ariel Pradipta、Ji Su Ma、西川 義文、笹井 美和、山本 雅裕

4. 第 25 回分子寄生虫学ワークショップ 口頭発表 2017 年 8 月

「ヒト細胞におけるトキソプラズマの宿主免疫回避機構の解明」

伴戸 寛徳、馬 知秀、李 英愛、坂口 直哉、笹井 美和、山本 雅裕

〔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/research/research_10

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/achievement/research/2018/120>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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。