

令和元年6月20日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17570

研究課題名(和文)トキソプラズマの脳指向的な体内伝播を制御する原虫因子と宿主因子の相互作用

研究課題名(英文) Host-parasite interaction controlling brain-tropic migration of *Toxoplasma gondii*

研究代表者

梅田 剛佑 (Umeda, Kousuke)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・特任研究員

研究者番号：20792443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマが中枢神経系へ体内伝播するメカニズムの解明を目的に、宿主の生体防御機構と原虫因子との相互作用の研究を実施した。原虫由来サイクロフィリン18 (TgCyp18) に注目した解析を行った結果、マウスへの感染時、TgCyp18が免疫細胞による炎症性サイトカインの産生へ作用し、感染局所から全身への感染拡大に関与する可能性が示された。またトキソプラズマに対する免疫関連受容体 (TLR2、CCR5、CXCR3) と初代培養脳細胞との関係について遺伝子発現変動解析を実施し、脳細胞においてもこれらの受容体が炎症反応関連の遺伝子発現を一定程度制御していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染局所から全身を経て中枢神経系へ至るトキソプラズマの体内伝播過程は、その生活史として興味深いだけでなく、トキソプラズマ症への対策にもつながる重要な標的である。一方で本原虫の体内伝播に関する知見は限られており、本研究によりTgCyp18が感染局所から全身への感染拡大に関与する可能性が示されたことは、原虫と宿主の間の分子ネットワークの一端を明らかにする成果である。また炎症に関わる受容体について、脳細胞においても遺伝子発現に対する一定の役割が見られたことは、原虫が中枢神経系へ移動した後の感染維持メカニズムに関する知見につながり、関連する薬剤の開発など、応用研究的な発展も期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the mechanisms of brain-tropic migration of *Toxoplasma gondii* and investigated the interaction between host defense mechanisms and parasite-derived proteins. We focused on *T. gondii* cyclophilin 18 (TgCyp18) because of previous reports on its effect on host immune responses. During infection of *T. gondii* in mice, it was suggested that TgCyp18 affected the production of inflammatory cytokines and contributed to the migration of parasites from a local infection site to the whole body. In addition, transcriptomic analysis was performed on immune-related receptors (i.e. TLR2, CCR5, CXCR3) in primary brain cells during *T. gondii* infection. The result showed that these receptors regulated the expression of inflammatory genes during *T. gondii* infection in brain cells to some extent.

研究分野：寄生虫学

キーワード：Toxoplasma gondii 生体防御 体内伝播 中枢神経系

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

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマはネコ科動物を終宿主とし、ヒトを含む多くの恒温動物を中間宿主とする病原性原虫である。世界人口の3割が感染していると言われ、健康な成人の多くは感染しても無症状に終わるが、胎児・幼児や AIDS 患者、免疫抑制状態にある場合には脳炎や神経系疾患等、深刻な症状を引き起こすことから、対策が強く望まれる日和見病原体である。

本原虫は中間宿主内ではタキゾイト(急性感染ステージ)あるいはブラディゾイト(慢性感染ステージ)として存在する。タキゾイトは様々な種類の有核細胞の細胞質内に寄生し急激に増殖するが、ほとんどは宿主免疫の活性化後に排除される。しかし、免疫系が強くは働けない脳や筋肉に到達した場合、排除されずにブラディゾイトに変態し、シストを形成して慢性感染を続ける。したがって、トキソプラズマが中間宿主内で生き残るためには、初期感染部位(主に腸管)から体内伝播により脳や筋肉まで感染を拡大する必要がある。このためのメカニズムとして、本原虫は「トロイの木馬」のように宿主の自然免疫細胞を体内伝播のためのベクターおよび隠れ蓑として利用することが知られており、感染細胞の移動に伴って局所から全身へと感染を拡大し、血液脳関門をも通過することが報告されている(Lachenmaier et al. 2011, PMID21106256)。

体内伝播の分子機構について、Maら(2014, PMID25225460)は、原虫が免疫細胞を「ハイジャック」する際、GRA6 というタンパク質が宿主の転写因子を活性化し、ケモカインを感染局所で誘導して好中球を呼び寄せ、感染拡大に寄与することを報告した。また本原虫の感染は神経伝達物質でもある GABA の産生を樹状細胞に促し、細胞膜上の GABA 受容体を刺激して細胞の運動性を亢進することもわかっている(Fuks et al. 2012, PMID23236276)。しかし、乗っ取られた感染細胞がどのようにして次の行き先を決定していくのかについてはあまり研究が進んでいない。感染細胞の臓器指向性に関連する研究としては、Dadimoghaddamら(2014, PMID25063280)は、マウスの腹腔内への注射後、24 時間以内に脳を含む様々な臓器へ感染が移行することを報告している。

2. 研究の目的

本研究では、原虫感染細胞が一定の指向性を持って慢性感染部位まで到達するという仮説を立て、ケモカイン受容体 CC-chemokine receptor 5 (CCR5) を介して炎症性サイトカインであるインターロイキン 12 (IL-12) の産生を誘導することが報告されている原虫由来サイクロフィリン 18 (TgCyp18) に特に注目した解析を実施した(Aliberti et al., 2003, PMID12665855)。所属研究室ではこれまで組換え TgCyp18 が CCR5 依存的にマウスマクロファージ (MΦ) による IL-12 や一酸化窒素 (NO) の産生を誘導すること、感染部位へ MΦ を動員すること、また CCR5 非依存的に MΦ や T 細胞の増殖を促進することなどを報告しており(Ibrahim et al., 2009, PMID19564392; 2010, PMID20660134) TgCyp18 が原虫と宿主との相互作用に一定の役割を持つことが示唆されていた。さらに、トキソプラズマ感染時、マウス脳組織のトランスクリプトームにおいて原虫の寄生量が免疫関連遺伝子の発現と正の相関を示すことを報告しており、そのデータの中で CCR5 のリガンドの発現上昇も捉えられていた(Tanaka et al., 2013, PMID23856619)。これらを考慮し、本研究では TgCyp18、および原虫感染への反応に関連した受容体群に注目した解析を実施し、トキソプラズマの病原性や宿主免疫との相互作用、さらに原虫の体内移動との関与を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では TgCyp18 に関して主に遺伝子改変原虫を用いた解析を実施した。Pru 株をもとにノックアウト (CypKO) およびコンプリメント (CypComp) 原虫を作製し、TgCyp18 の *in vitro*・*in vivo* における性状解析を実施した。*In vitro* では原虫の基本的な性状として、まず Vero 細胞を用い、原虫の細胞への侵入率・侵入後の増殖率を間接蛍光抗体法を用いたアッセイにより測定した。また、HFF 細胞への感染下において、pH あるいはニトロプルシドナトリウム (SNP) 刺激によるブラディゾイトへのステージ転換誘導試験を実施した。また、Pru または CypKO を感染させた MΦ をサンプルとした RNA-seq データを利用し、原虫および宿主側の遺伝子発現を Pru と CypKO とで比較し、発現変動遺伝子を抽出した。さらに、TgCyp18 の欠損がサイトカイン産生に与える影響を調べるため、マウス腹腔 MΦ にタキゾイトを感染させ、ELISA によりサイトカイン産生を測定した。*In vivo* についても TgCyp18 の欠損とマウスに対する病原性との関連を調べるため、各株原虫のタキゾイトを腹腔内接種し、生存率、体重変動およびクリニカルスコアを記録した。急性期の炎症反応との関係を調べるため、タキゾイトを腹腔内接種し、5 日後に腹水・腹腔浸潤細胞・脾臓・脳を回収、サイトカイン産生・原虫感染量・mRNA 発現量を調べた。さらに、FLAG タグ付き TgCyp18 を強制発現させた HEK293T 細胞を試料として共免疫沈降を実施し、プロテオーム解析により TgCyp18 に特異的に結合すると考えられる宿主タンパク質を同定した。得られた候補タンパク質について、ウェスタンブロットングにより TgCyp18 強制発現系での結合の確認を行い、また間接蛍光抗体法により原虫感染細胞における局在を調べた。

また、原虫感染への反応に関与することが報告されている受容体である CCR5 や Toll like receptor 2 (TLR2)、CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) に関し、各ノックアウトマウスの胎仔脳から分化誘導した初代培養脳細胞における原虫感染時のトランスクリプトームデータを

利用した遺伝子発現解析を実施した。野生型細胞において感染により発現が変動した遺伝子を抽出し、さらに各受容体の欠損によって変動の程度が有意に影響を受けた遺伝子を選抜、これらを各受容体依存的な発現変動遺伝子と定義した。このような遺伝子に関して GO 解析と KEGG パスウェイ解析を行い、どのような機能や経路に関わる遺伝子が各受容体に依存して発現変動していたのか推定を行った。

4. 研究成果

In vitro における原虫の宿主細胞への侵入率・侵入後の増殖率、またブラディゾイトへの変態率には TgCyp18 の欠損による影響は認められず、TgCyp18 が原虫の通常の増殖・生活サイクルにおいては特に作用していないことが示唆された。MΦ 感染時のトランスクリプトーム解析の結果、CypKO で Pru より発現の変動が見られた遺伝子は TgCyp18 を除くと 2 つ (いずれも hypothetical protein) が低下していたのみであり、この 2 つについても逆転写定量 PCR (RT-qPCR) を用いた解析では発現低下は確認されなかった。したがって、TgCyp18 は原虫自身の遺伝子発現・細胞機能には特に影響していないことが示唆された。一方宿主側に関しては、非感染と比較して発現が変動した遺伝子には Pru 感染・PruΔCyp 感染とも免疫関連、あるいは転写・翻訳関連の GO を持つものが多く見られた。さらに、個々の遺伝子について見ると、PruKO 感染では IL-12 のほか、原虫への攻撃に関わる一酸化窒素合成酵素、GBP (p65 guanylate-binding protein) といった免疫関連遺伝子の発現が Pru 感染よりも上昇していた。これは TgCyp18 の欠損により原虫が免疫による攻撃を受けやすくなった可能性を示唆している。TgCyp18 が IL-12 の産生を誘導するとする過去の報告とは一致しないものの、組換えタンパク質を利用し宿主細胞の外側から作用させた場合と、遺伝子改変原虫を利用し内側から作用させた場合との違いで現れる影響の違いが生じた可能性が考えられた。MΦ からのサイトカイン産生を測定した ELISA 結果では原虫株間で IL-12p40 サブユニット、および IL-6 の産生に有意な差は見られなかった。トランスクリプトーム解析での IL-12p40 遺伝子 (*Il12b*) の発現量差も Pru と CypKO との間では 2 倍程度であったことから、タンパク質レベルでの検出可能な違いには至らなかったと考えられる。

また、マウスへの in vivo 感染実験では、生存率、体重変動およびクリニカルスコアに関して TgCyp18 の欠損による有意な影響は観察されなかった。一方、タキゾイト感染 5 日後のサンプルでは、有意ではなかったものの腹水中の IL-12p40 産生量が CypKO で低下傾向にあり、腹腔浸潤細胞および脾臓における原虫量も低下傾向にあった。In vitro での MΦ の感染実験では差が見られなかったことも考慮すると、単独の細胞種への影響よりも、免疫細胞集団に対してより大きな影響を与えている可能性が考えられた。

プロテオーム解析の結果、TgCyp18 と結合する宿主タンパク質の候補として、HYOU1、BiP といったヒートショックプロテインファミリー、PDIA4、PDIA6 といったプロテインジスルフィドイソメラーゼファミリーのタンパク質が同定された。これらはいずれも小胞体に局在する分子シャペロン複合体を構成する因子であることから、TgCyp18 の作用がタンパク質フォールディングに対する作用を介したものである可能性が示唆された。間接蛍光抗体法により原虫感染細胞における局在を調べたところ、寄生胞内のタキゾイトとの共局在が TgCyp18 の欠損とは関係なく観察された。このような局在が安定的に見られるものであるのか確認するとともに、TgCyp18 の作用と実際に関係するのか解析を今後も継続予定である。

TLR2 や CCR5 に関するトランスクリプトーム解析では、まず TLR2 に依存して発現の上昇・低下した遺伝子がアストロサイト (AS) で 387・26、ミクログリア (MG) で 322・513、ニューロン (Neu) で 292・39 であった。一方 CCR5 に依存して上昇・低下した遺伝子は AS で 172・5、MG で 196・106、Neu で 15・1 であった。CCR5 では発現変動遺伝子の数が少ないだけでなく、発現変動の程度も TLR2 よりも小さかった。上昇していた遺伝子についてはサイトカイン・サイトカイン受容体相互作用のほか、NF- κ B シグナリング経路、ケモカインシグナリング経路などといった免疫にかかわる経路に発現変動遺伝子が多く見られた。一方低下していた遺伝子では、MG でのみ細胞周期に関わる遺伝子が有意に多く見られた。TLR2 欠損マウスに関するトランスクリプトーム解析では、野生型のみで発現が変動していた遺伝子、すなわち TLR2 に依存して発現の上昇・低下した遺伝子が Neu では 385・158、AS では 611・163、MG では 777・1207、MΦ では 1105・1274 と、Neu では他の細胞種に比べ TLR2 依存性の遺伝子の数が少なかった。また GO 解析では AS・MG ともに免疫応答に関連した GO が上位を占めたが、Neu では上位に免疫関連は少なくなり、代謝関連の GO が多く見られるようになった。また MG と MΦ では、TLR2 に依存して発現が上昇・低下した遺伝子のうち、共通するものは 124・311 のみと少なかった。この結果から TLR2 が少なくとも遺伝子発現レベルでは脳細胞においてもトキソプラズマに対する生体防御反応に非常に大きな影響を持つことが示された。また、CCR5 については TLR2 とよく似た経路を駆動するものの、各遺伝子の発現に対する影響は TLR2 よりもかなり小さいものであることも示された。さらに CXCR3 に関する発現変動解析では、CXCR3 に依存して発現の上昇・低下した遺伝子は AS で 95・1、MG で 113・183、Neu で 299・251 であった。これらの発現変動遺伝子数は TLR2 や CCR5 と比較して概ね少なかった。CXCR3 の欠損によって原虫感染時の発現上昇が抑制された遺伝子としては、AS では iNOS や GBP といった抗原虫作用を持つ遺伝子が、MG では IL12b や IL6、CXCL1 といったサイトカイン・ケモカイン遺伝子が上位に見られた。GO 解析・KEGG パス

ウェイ解析でもやはり AS では免疫関連、MG では炎症反応関連の機能が CXCR3 の欠損による影響を受けたことが示唆された。また、CXCR3 に関してはオスマウスから単離した腹腔 MΦ に対する *in vitro* 感染実験を実施したが、IL-12p40 および IL-6 の産生に CXCR3 の欠損による影響は見られなかった。その一方、胎仔脳から分化誘導した AS や MG では、CXCR3 の欠損時の IL-12p40 および IL-6 の発現低下がタンパク質レベルでも確認された。一方、オスマウスから単離した M で CXCR3 の欠損の影響が見られなかった点については CXCR3 遺伝子が X 染色体上に存在するため、欠損時の影響はメスマウスでより大きい可能性があり、解析を継続して実施する予定である。いずれの受容体に関しても MG において炎症反応に関わる遺伝子群に変動が見られたことから、過剰な炎症反応によるグリア結節の形成や、神経障害にこれらの遺伝子が関与している可能性が示唆された。

以上のように、トキソプラズマの感染による炎症反応、およびそれに続く原虫の体内での移動、さらに中枢神経系到達後の宿主細胞への影響に関して、分子生物学的な視点から一定の知見を得ることができたものと考えている。一方で原虫の体内での移動にはまだ多くの分子が関与すると考えられ、今後も継続的な研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Umeda K, Tanaka S, Ihara F, Yamagishi J, Suzuki Y, Nishikawa Y. (2017) Transcriptional profiling of Toll-like receptor 2-deficient primary murine brain cells during *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS One*, 12(11): e0187703, DOI: 10.1371/journal.pone.0187703

〔学会発表〕(計 8 件)

1. ○梅田剛佑・寺江千裕・猪原史成・西川義文 *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18 第 88 回日本寄生虫学会大会 演題番号 2019 年 3 月 長崎
2. 梅田剛佑・小林薫・猪原史成・田中沙智・山岸潤也・鈴木穰・西川義文 トキソプラズマ感染時の Toll-like receptor 2 および CC chemokine receptor 5 の機能解析 -マウス初代脳細胞のトランスクリプトームから- 第 161 回日本獣医学会学術集会 演題番号 CS1-2 2018 年 9 月 つくば
3. ○Umeda K, Kobayashi K, Ihara F, Tanaka S, Yamagishi J, Suzuki Y, Nishikawa Y, Transcriptomics reveals roles of Toll-like receptor 2 and CC chemokine receptor 5 against *Toxoplasma gondii* infection in primary mouse brain cells. 14th International Congress of Parasitology (ICOPA2018), EXCO, Daegu, South Korea, August, 2018
4. ○梅田剛佑・小林薫・猪原史成・田中沙智・山岸潤也・鈴木穰・西川義文 マウス初代脳細胞におけるトキソプラズマ感染への CCR5 依存的応答に関するトランスクリプトーム解析 第 87 回日本寄生虫学会大会 演題番号 2C-11 2018 年 3 月 東京
5. 猪原史成・田中沙智・西村麻紀・梅田剛佑・西川義文 トキソプラズマ慢性感染期の脳病態と宿主の行動変化における Toll-like receptor 2 の関与 第 87 回日本寄生虫学会大会 演題番号 2C-10 2018 年 3 月 東京
6. ○梅田剛佑・猪原史成・西川義文 トキソプラズマのサイクロフィリン 18 が宿主・寄生虫相互作用において果たす機能 第 63 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 講演番号 24 2017 年 10 月 札幌
7. 檜森 結羽, 猪原 史成, 梅田 剛佑, 西川 義文 *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) デンシグラニユル蛋白 7 (GRA7) による宿主細胞内制御機構の解明 第 63 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 講演番号 25 2017 年 10 月 札幌
8. ○梅田剛佑・猪原史成・田中沙智・山岸潤也・鈴木穰・西川義文 *Toxoplasma gondii* 感染下における Toll-like receptor 2 欠損マウス脳細胞のトランスクリプトーム解析 第 86 回日本寄生虫学会大会 講演番号 2C-20 2017 年 5 月

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西川義文

ローマ字氏名：Nishikawa Yoshifumi

所属研究機関名：帯広畜産大学

部局名：原虫病研究センター

職名：教授

研究者番号(8桁): 90431395

研究協力者氏名：二瓶浩一

ローマ字氏名：Nihei Koichi

所属研究機関名：公益財団法人微生物化学研究会
部局名：微生物化学研究所
研究者番号（8桁）：40373344

研究協力者氏名：猪原史成
ローマ字氏名：Fumiaki Ihara
所属研究機関名：帯広畜産大学
部局名：原虫病研究センター
研究者番号（8桁）：00800773

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。