

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19590424
 研究課題名（和文） トキソプラズマ毒性分子が誘導する宿主アナフィラキシー死における TLR 関与
 研究課題名（英文） TLR involvement in anaphylactic death of host caused by *Toxoplasma gondii* -derived virulent molecule
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：青才文江（Fumie Aosai）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：80150316

研究成果の概要：本研究では、免疫不全宿主の死亡直前に発現が急増するトキソプラズマ急増虫体特異的ストレス蛋白 HSP70 (*T.g.*HSP70) によって、感染宿主がアナフィラキシー死に陥ることを発見し、宿主の感染死メカニズムを分子レベルで始めて解明した。本アナフィラキシーは I 型アレルギーではなく、血小板活性化因子 (PAF) を介して惹起される汎血管内凝固機転によることを明らかにし、PAF 発現に対する interferon- gamma (IFN- γ) 機能、エフェクター解析、Toll 様リセプター (TLR) と下流関連シグナルの解析を行い、国際誌 (*Int. Immunol.*, *Microbiol. Immunol.*) に論文を発表した。さらに、皮膚樹状細胞を標的とした *in vivo* *T.g.*HSP70 遺伝子ワクチンにより、アナフィラキシーに対する防御応答誘導に成功し国際誌 (*Vaccine.*) に投稿中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：トキソプラズマ、TLR

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞内寄生原虫トキソプラズマの病原性および宿主生体防御反応の解析を進め、トキソプラズマ感染における病態像が、原虫株による病原性の違いのみならず、宿主

の免疫遺伝因子により統御されることを明らかにし、これ迄、トキソプラズマ急増虫体による宿主細胞の直接破壊や宿主に感染細胞特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されることを報告にしてきた。しかし一方で、感染感

受性臓器においても炎症現場や壊死巣にトキソプラズマがみられない場合が多く、感染による毒性分子の産生や細胞・組織のアポトーシス誘導など他の複数の障害機序も考えられ、その病態形成機序は未だ解明されていない。

そこで、トキソプラズマの病原分子について、トキソプラズマ由来ストレス蛋白 70 (*T.g.*HSP70) の発現が宿主の死亡直前に急激に増加することに注目し、*T.g.*HSP70 を 'danger signal' と名づけてクローニングし、宿主防御免疫に対する *T.g.*HSP70 の役割解析を進めた。その結果、*T.g.*HSP70 が宿主の防御免疫能を強力に抑制する毒性病原分子であることを明らかにし、病態論的意味から、*T.g.*HSP70 を産生する急増虫体を特に強毒性急増虫体として新たに分類した。

一方、病原体認識自然免疫リセプターである TLR の役割解析を進め、*T.g.*HSP70 が TLR2/TLR4 のアゴニストであることを報告してきた。

上述の基盤から、トキソプラズマ感染における宿主感染死機構の分子病態解析を目的として、*T.g.*HSP70 の病原性解析を進め、*T.g.*HSP70 が感染マウスにアナフィラキシー反応を起こして宿主を感染死に導くことを明らかにした。

2. 研究の目的

宿主の感染死の病態の1つが *T.g.*HSP70 によるアナフィラキシー反応の惹起によることを明らかにしたが、これまでに報告されている寄生虫感染に伴うアナフィラキシーが主に IgE を介する I 型アレルギーであるのに対して、*T.g.*HSP70 によるアナフィラキシー反応は B 細胞欠損マウスでもみられ抗体が関与しないこと、IFN- γ 欠損マウスでは起こらず IFN- γ 依存性であること、末梢血に著しい血小板減少がみられ PAF を介すること、を解析してきた。

本研究では、*T.g.*HSP70 による宿主アナフィラキシー死における自然免疫担当分子である TLR とシグナル分子の解析、およびアナフィラキシーに対する樹状細胞(DC)ワクチンの確立を目的とした。

3. 研究の方法

下記の点に焦点を絞り解析した。

1) *T.g.*HSP70 によるアナフィラキシー反応における IFN- γ と PAF の役割解析:

IFN- γ 欠損マウスへの IFN- γ 移入実験により IFN- γ 依存性を証明

PAF-Receptor (PAF-R) および PAF-acetylhydrolase (PAF-AH) mRNA 発現量の経時的定量解析により PAF 産生動態を解

析

野生型(WT) と IFN- γ 欠損マウスの比較により、PAF 発現に対する IFN- γ の機能を解析

2) アナフィラキシー反応のエフェクター解析:

感染 WT マウスの脾細胞から B220⁺, CD90⁺ (CD4⁺, CD8⁺), CD11b⁺, CD11c⁺ 細胞を分離後、分離細胞群を非感染 IFN- γ 欠損マウスへ移入実験することによりエフェクターを解析

エフェクター細胞の IFN- γ 産生を RT-PCR を用いて定量解析

3) *T.g.*HSP70 によるアナフィラキシー反応における TLR と下流シグナル分子の役割解析:

TLR 欠損マウスおよび下流シグナル分子 (MyD88, Trif, MyD88/Trif) 欠損マウスを用い、*T.g.*HSP70 誘導アナフィラキシー反応における TLR と下流シグナル分子の役割を解析

TLR/下流シグナル欠損感染マウス脾細胞を *in vitro* で *T.g.*HSP70 刺激し、cPLA₂ などの PAF 活性化酵素、および、PAF 活性化に関する MAPKs シグナル分子の燐酸化の western blotting 解析することにより、PAF 活性化における TLR と下流シグナル分子の役割を解析

4) トキソプラズマ感染死に対する *T.g.*HSP70 遺伝子ワクチン作用機序の解析:

WT マウスに遺伝子銃を用いて *T.g.*HSP70 遺伝子ワクチンを行い、最終ワクチンの1週後にトキソプラズマを感染させ、感染1週後に *T.g.*HSP70 の腹腔内注射を行って *T.g.*HSP70 刺激後のアナフィラキシーに対するワクチン効果を判定。*T.g.*HSP70 遺伝子ワクチンは1~3回(2週間隔でワクチン効果強化のためのブースト)を行い、最適遺伝子ワクチンプロトコルを決定

*T.g.*HSP70 遺伝子ワクチンによりアナフィラキシーに対してトレランスが誘導されたマウスの脾臓細胞からエフェクター細胞群を分離し、トレランス誘導マウスの IFN- γ および PAF 合性能、炎症性および Th1/Th2 サイトカイン、T 細胞活性化機能を解析

TLR2/TLR4 欠損マウス、MyD88/ Trif および MyD88/Trif ダブル欠損マウスを用いることにより *T.g.*HSP70 ワクチンによるトレランス誘導における TLR と下流シグナル分子の役割を解析

4. 研究成果

1) *T.g.HSP70* によるアナフィラキシー反応における IFN- γ と PAF の役割:

WT マウスでみられる *T.g.HSP70* によるアナフィラキシー反応は、IFN- γ 欠損マウスでは起こらないが、欠損マウスに IFN- γ を移入することにより反応が惹起され、IFN- γ 依存性であることが証明された。

PAF-Receptor (PAF-R) および PAF-acetylhydrolase (PAF-AH) mRNA 発現量の定量解析により、naive マウス・感染のみ・*T.g.HSP70* 腹腔内注射のみのマウスに比べて、感染後に *T.g.HSP70* 注射を行うアナフィラキシー反応誘導マウスでは、極めて著明な PAF-AH mRNA 発現がみられ、*T.g.HSP70* によるアナフィラキシー反応に PAF が関与することが示された。PAF-R の発現量には差がみられなかった。

WT naive マウス・感染のみ・*T.g.HSP70* 腹腔内注射のみのマウスに比べて、感染後 *T.g.HSP70* 注射を行うアナフィラキシー反応マウスでは、異常に高い IFN- γ mRNA 発現がみられ、*T.g.HSP70* によるアナフィラキシー反応に関与することが示された。

2) アナフィラキシー反応のエフェクター解析:

感染 WT マウスの脾細胞から B220⁺, CD90⁺ (CD4⁺, CD8⁺), CD11b⁺, CD11c⁺ 細胞を分画し、非感染 IFN- γ 欠損マウスへ移入実験することによりエフェクターを解析した。B220⁺ 細胞の移入ではアナフィラキシー反応は惹起されず、B 細胞の関与は否定された。一方、CD90⁺ (CD4⁺, CD8⁺), CD11b⁺, CD11c⁺ 細胞分画移入はいずれも反応を惹起し、特に T 細胞群に比べて CD11b⁺, CD11c⁺ 細胞移入により早期にアナフィラキシー死が惹起され、主なエフェクターは CD11b⁺, CD11c⁺ 細胞であることが判明した (図 1)。

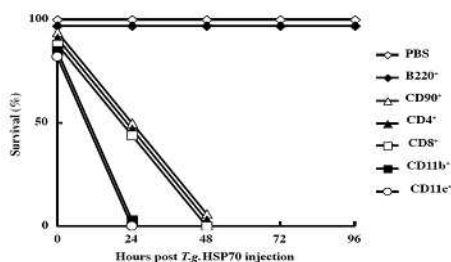


図 1

次に、エフェクター細胞の IFN- γ 発現と PAF-AH mRNA 発現の関連を解析した。感染後 *T.g.HSP70* 注射を行ったマウスの脾臓

細胞を CD90⁺ (CD4⁺, CD8⁺), CD11b⁺, CD11c⁺ 細胞に分画し、IFN- γ と PAF-AH mRNA 発現を解析した結果、いずれの細胞群でも同レベルの IFN- γ 発現が見られ間接的エフェクターであるのに対して、PAF-AH mRNA 発現は CD11b⁺, CD11c⁺ 細胞でのみ亢進しており、PAF 産生の直接的エフェクターは CD11b⁺, CD11c⁺ 細胞であることが確認された (図 2 AB)。

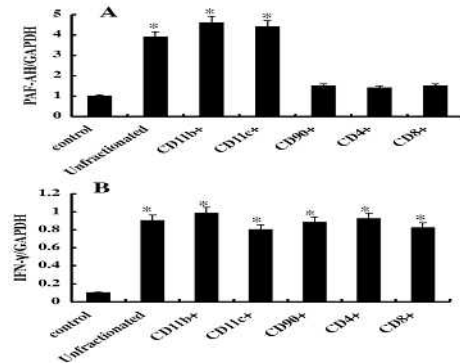


図 2

3) *T.g.HSP70* によるアナフィラキシー反応における TLR と下流シグナル分子の役割解析:

T.g.HSP70 誘導アナフィラキシー反応における TLR と下流シグナル分子の役割を解析した。*T.g.HSP70* がアゴニストである TLR2 と TLR4 の欠損マウスを用いた結果、WT と TLR2 欠損マウスでみられた PAF-AH mRNA 発現増加およびアナフィラキシー反応が TLR4 欠損マウスではみられず、*T.g.HSP70* によるアナフィラキシー反応に TLR4 が関与することが示された (図 3)。

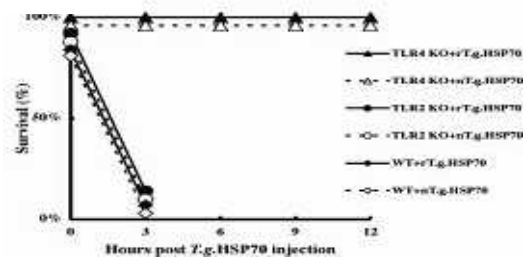


図 3

次に、TLR4 の下流シグナルが MyD88 依存シグナル経路と MyD88 非依存 TRAM/Trif シグナル経路に分けられることから、MyD88 および Trif 欠損マウスを用い、下流シグナル経路を解析した結果、*T.g.HSP70* によるアナフィラキシー反応は

TLR4/MyD88 シグナル経路を介することが明らかになった(図4)

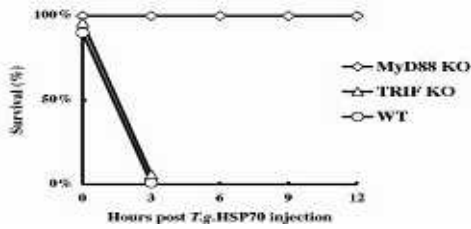


図4

更に、WT, TLR2 あるいは TLR4 欠損感染マウス脾細胞の CD11b⁺ 細胞を in vitro で T.g.HSP70 刺激し、PAF 合成に必須の cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂)、および、cPLA₂ 活性化に関連する MAPKs シグナル分子の磷酸化を western blotting により解析した。cPLA₂, MAPKs (p38, p44/42) 磷酸化は WT と TLR2 欠損マウスでみられたが TLR4 欠損マウスではみられず、さらに、WT と TLR2 欠損マウスでみられた cPLA₂ 磷酸化が p38, p44/42 阻剤により阻止されたことから、T.g.HSP70 による cPLA₂ 活性化には TLR4 を介する MAPKs 経路が必須であることが明らかになった。一方、IFN- γ は TLR2 あるいは TLR4 のどちらか一方の存在で発現されることが示され、図5の、T.g.HSP70 によるアナフィラキシー反応におけるエフェクター細胞内のシグナルモデルを報告した(図5)

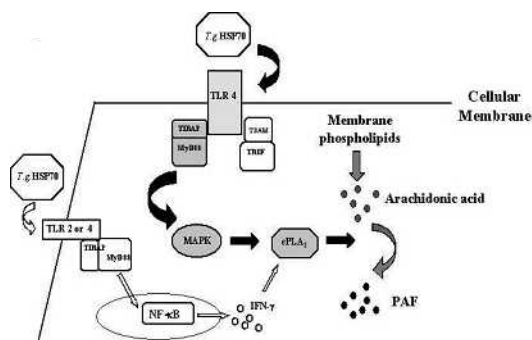


図5

4) トキソプラズマ感染死に対する T.g.HSP70 遺伝子ワクチン作用機序の解析:

既に我々は DC (CD11c⁺ 細胞) を標的

とした T.g.HSP70 遺伝子ワクチンを確立している。そこで、T.g.HSP70 刺激後のアナフィラキシーに対するワクチン効果を解析した。T.g.HSP70 遺伝子ワクチンは1~3回(2週間隔でワクチン効果強化のためのブースト)行い、1回に2 μ g DNA を使用し2回ワクチンを行うプロトコールにより最適ワクチン効果が得られることが明らかとなった(図6)。

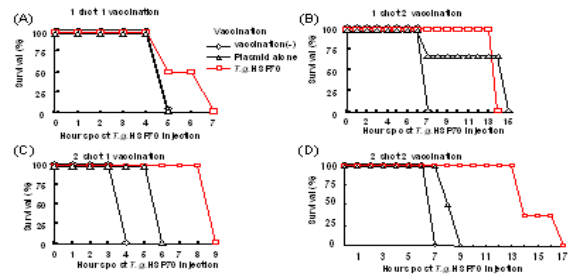


図6

更に、本ワクチンプロトコールにより、アナフィラキシー反応で消失した末梢血小板数に回復傾向がみられた(図7)

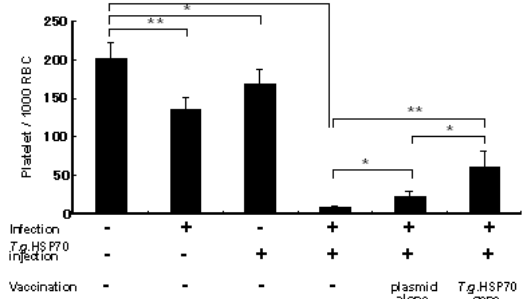
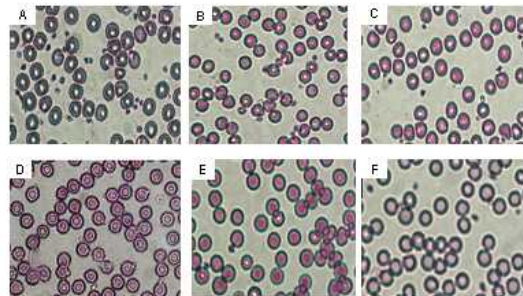


図7

T.g.HSP70 遺伝子ワクチンによりトランスが誘導されたマウスの脾臓細胞(whole および CD11b⁺ エフェクター細胞)の IFN- γ および PAF 発現を解析した結果、T.g.HSP70 遺伝子ワクチンにより PAF 発現が低下し、また、PAF の発現低下が異常な IFN- γ mRNA 発現の正常

化によることが示された(図8、9)

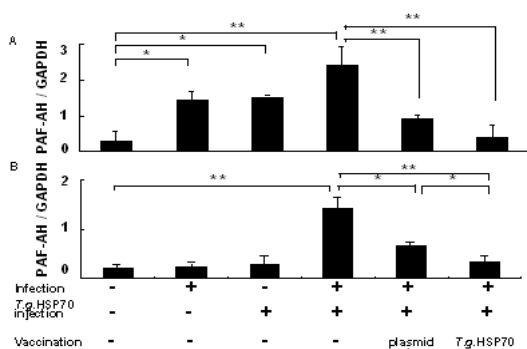


図8

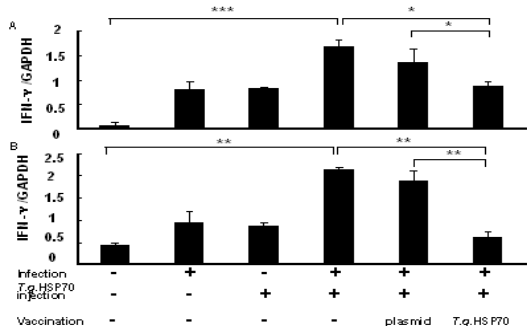


図9

更に、感染慢性期の急性増悪に対するワクチン効果もみられた(図10)。

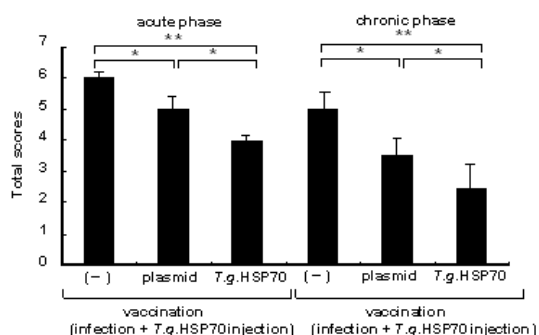


図10

前述の如く、*T.g.HSP70* によるアナフィラキシー反応はTLR4/MyD88シグナル経路を介することから、*T.g.HSP70* 遺伝子ワクチンによるワクチン効果はTLR4/MyD88経路を介すると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4件)

中島秀幸, 中野正大, 矢野明彦, 青才文江 母親の馬肉生食が感染原因と考えられた重症先天性トキソプラズマ症の1男児例 小児科臨床 2009 印刷中. 査読: 無.

Fang H, Mun H-S, Kikumura A, Sayama Y, Norose K, Yano A, Aosai F. *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 induces lethal anaphylactic reaction through activation of cytosolic phospholipase A₂ and platelet-activating factor via Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88. Microbiol. Immunol. 52: 366-374, 2008. 査読: 有.

Munakata S, Chen M, Aosai F., Kawaguchi N, Nemoto Y, Norose K, Hattori T, Yano A. The clinical significance of anti-heat shock cognate protein 71 antibody in myasthenia gravis. J. Clin. Neurosci. 15: 158-165, 2008. 査読: 有.

Shiono Y, Mun H-S., He N, Nakazaki Y, Fang H, Furuya M, Aosai F., Yano A. Maternal-fetal transmission of *Toxoplasma gondii* in interferon- γ deficient pregnant mice. Parasitol Int. 56: 141-148, 2007. 査読: 有.

〔学会発表〕(計 7件)

牧野真幸、菊村亮暁、Mohamed Rabie M., Piao Lian-Xun, 矢野明彦、青才文江 *Toxoplasma gondii* HSP70 遺伝子ワクチンにおけるTLR関与と自己抗体産生に対するワクチン効果 第78回日本寄生虫学会大会抄録集p94, 2009年3月28日

菊村亮暁、牧野真幸、岩倉洋一郎、青才文江 トキソプラズマHSP70が誘導する免疫不全宿主の樹状細胞成熟化とT細胞応答 第78回日本寄生虫学会大会抄録集p94, 2009年3月28日

Kikumura A., Fang H., Sayama Y., Makino M., Uemura N., Norose k., Yano A., Aosai F. Protective immunity against *Toxoplasma gondii* heat shock protein70- induced anaphylactic reaction by DNA vaccination. 第38回日本免疫学会総会・学術集会 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 38 (ISSN 0919-1984) 87, 2008年12月1日

Uemura N., Sayama Y., Washino T., Kikumura A., Makino M., Iwakura Y., Aosai F. Th activation by *Toxoplasma gondii* heat shock protein70-stimulated bone-marrow-derived dendritic cells from WT and IFN- γ KO mice. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 38 (ISSN 0919-1984) 84, 2008 年 12 月 1 日

Fang H., Mun H-S., Kikumura A., Sayama Y., Makino M., Norose K., Yano A., Aosai F. トキソプラズマ感染マウスのトキソプラズマ HSP70 誘導アナフィラキシー反応における TLR4/MyD88 依存性 cPLA₂ / PAF 活性化 第 77 回日本寄生虫学会大会 抄録集 59 2008 年 4 月 3 日

菊村亮暁、房浩、佐山勇輔、文恵聖、牧野真幸、野呂瀬一美、矢野明彦、青才文江 トキソプラズマ感染マウスのトキソプラズマ HSP70 誘導アナフィラキシー死に対するワクチン開発 第 77 回日本寄生虫学会大会 抄録集 59 2008 年 4 月 3 日

佐山 勇輔、菊村 亮暁、房 浩、牧野 真幸、野呂瀬 一美、矢野 明彦、青才 文江 IL-10siRNA によるトキソプラズマ由来 HSP70 による骨髄由来樹状細胞の成熟と IL-12 増強効果 第 77 回日本寄生虫学会大会 抄録集 59 2008 年 4 月 3 日

〔図書〕(計 4 件)

青才文江 バイオメディカルサイエンス研究会編『バイオセーフティーの事典 病原微生物とハザード対策の実際』第 8 章 病原微生物の特性と対策 8-1 原虫 トキソプラズマ』みみずく舎/医学評論社 p 132-133, 2008.

矢野明彦, 青才文江 日本におけるトキソプラズマ症「第 1 章 トキソプラズマ症理解のための基礎編」九州大学出版会 p 1-24, 2007.

矢野明彦, 青才文江 日本におけるトキソプラズマ症「第 2 章 臨床編：先天性トキソプラズマ症」九州大学出版会 p 25-67, 2007.

矢野明彦, 青才文江 日本におけるトキソプラズマ症「第 4 章 トキソプラズマ症の将来に向けた基礎研究」九州大学出版会 p 105-125, 2007.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 2 件)

名称：特許権「重症筋無力症の検査方法及びそのための検査薬」

発明者：矢野明彦
青才文江

権利者：国立大学法人千葉大学

種類：特許権

番号：特許第 4269064 号

取得年月日：2009. 3. 6

国内外の別：国内

名称：特許権「トキソプラズマ症に対する遺伝子ワクチン及びそれを用いたトキソプラズマ症の予防方法」

発明者：矢野明彦

権利者：青才文江

種類：特許権

番号：特許第 4271424 号

取得年月日：2009. 3. 6

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

www.m.chiba-u.ac.jp/class/infection-hostdefense/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青才 文江 (AOSAI FUMIE)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：80150316

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし