

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590430

研究課題名（和文） 細胞内寄生原虫感染における炎症反応亢進と感染防御に関わる
マスト細胞機能の解析研究課題名（英文） Detection of TNF- α release from mast cells stimulated with *Toxoplasma gondii*.

研究代表者

上田 たかね (UEDA TAKANE)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：80459312

研究成果の概要（和文）：マスト細胞が細胞内寄生原虫 *Toxoplasma* 刺激に応答するか、TNF- α の産生を指標にマウス骨髄由来マスト細胞を用いて解析した結果、生きた *Toxoplasma gondii* (*T.g*) 増殖虫体で刺激した場合と虫体の粗抽出抗原刺激で BMMC から TNF- α の産生が見られた。またマウス腹腔から得た成熟好中球は、*T.g* 刺激を加えた BMMC で遊走能に増強が見られた。*T.g* 刺激を受けた BMMC では TNF- α の遺伝子発現が刺激後に増強していた。

研究成果の概要（英文）：Bone marrow derived mast cells (BMMCs) from mice were examined for TNF- α release by stimulating with *Toxoplasma gondii* tachyzoites. BMMC stimulated with live tachyzoites of *T.g* (RH) or crude extracts released TNF- α in culture supernatant. TNF- α gene expression was also enhanced after *T.g* stimuli. Activation of neutrophils were observed in the cells stimulated with BMMC primed with *T.g* compared to stimulation with BMMC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：免疫、原虫

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年 Toll-like receptors (TLRs) の発見に端を発し数多くの自然免疫に関わる受容体や分子の存在が明らかになった。マスト細胞は、IgE を介した即時型アレルギー反応を引き起こすエフェクター細胞であり、様々なアレルギー疾患の発症や免疫疾患の病態形成に関わっている。マスト細胞は組織内に定着し既にその細胞内にヒスタミン、ロイコトリエン、Tumor Necrosis Factor (TNF) 等のケミカルメディエーターを蓄えており、外界からの刺激に対しそれらを放出することで応答する。またその局在は、気道や粘膜といった外来からの病原体や異物と接触する器官に

主にみられる。

(2) 寄生虫感染とマスト細胞の関係については、蠕虫感染においては多くの解析がなされてきたが、原虫との関わりについては従来否定的であったが、2006年に Furuta *et al.* (J. Immunol. 177:3294-3302) がマラリア原虫感染のマウスモデルにおいて、マスト細胞が IgE 依存性経路と TLR4 を介した系路で感染防御に関わっていることと、この免疫応答においてマスト細胞からの TNF が重要であることを報告し、マスト細胞が原虫感染においても関与していることが明らかにされた。

2. 研究の目的

細胞内寄生原虫であるトキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*: *T.g*) はマラリアと同じ胞子虫類に属し、わが国において代表的な人獣共通感染症であると同時に AIDS 発症者に重篤な脳症をおこすなど日和見感染症としても重要な原虫である。*T.g* のマウス急性感染においては、全身性の炎症反応がマウスを死亡させている様子が観察されているが、従来は *T.g* の各分離株の遺伝的な virulence の違いによるものと考えられて来た。

本研究では、急性感染時の初感染早期の炎症反応時におけるマスト細胞の関与とマスト細胞由来の TNF が、好中球などに作用し炎症反応惹起に関与する可能性について培養細胞を主に用いて解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マスト細胞欠損マウス (WBB6F1 W/W^v) と野生型マウス (WBB6F1 +/+) に *T.g* RH の急増虫体 (tachyzoites) 1×10^4 を腹腔内に接種し、接種 1 時間後に腹腔内へのマスト細胞滲出について、腹腔洗浄液中の細胞についてトルイジンブルー染色やアルシアンブルー染色を行い確認した。

(2) *T.g* 接種群の野生型マウスの腹腔内には、1 時間後にはマスト細胞が検出され、以後時間の経過とともに、好中球やマクロファージも検出されるが、腹腔洗浄液回収では回収量の差異が大きく定量が難しいため、野生型マウスと同系である C57BL/6 マウスの骨髄細胞に mIL-3 を添加した培養液でマスト細胞へ分化させた骨髄由来マスト細胞 (BMMCs) を用い、*T.g* 刺激によるマスト細胞の応答を TNF- α の産生を指標に解析した。

培養した BMMCs は FACS にてマスト細胞マーカーである *c-kit* の発現を確認して使用した。

TNF- α の産生は ELISA (R&D Systems) で測定し、TNF- α の遺伝子発現については real-time PCR を用いて解析した。

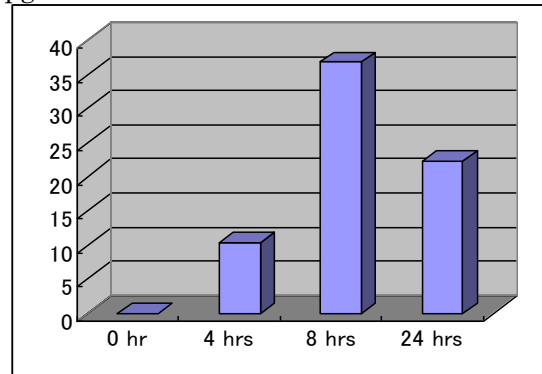
(3) *T.g* に対する BMMCs の遊走能および、*T.g* 刺激をうけた BMMCs への好中球の遊走活性については、Transwell system を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) *T.g* 刺激による BMMC からの TNF- α 放出

BMMC1 細胞に対し急増虫体 2 の比率で共培養した結果、培養 4 時間後の培養上清中に TNF- α が検出された (図 1)。一方で同数のホルマリン固定した急増虫体と共培養した場合には BMMC からの TNF- α の分泌は観察されなかった。

pg/ml



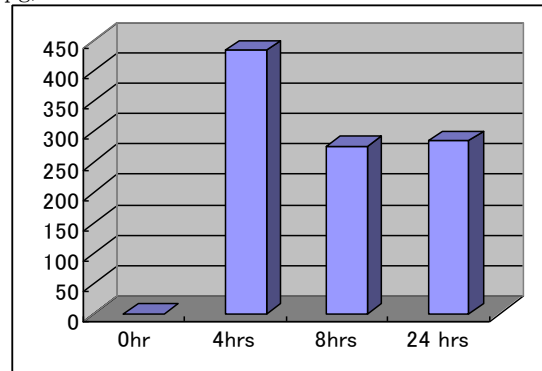
(図 1 : 生きた急増虫体刺激による BMMC からの TNF- α 分泌)

(2) *T.g* の急増虫体を破碎した粗抽出液 (可溶性分泌抗原も含む) $10 \mu\text{g/ml}$ で BMMC を刺激した結果、やはり 4 時間後には TNF- α が検出された。またその量は生きた急増虫体で刺激した場合よりも多かった (図 2)。

大腸菌由来の LPS 刺激でも BMMC からの TNF- α 分泌が観察されていることから、BMMC は虫体から分泌される可溶性因子等の刺激に応答して細胞内に貯留していた TNF- α を放出することが示された。

尚、3 時間以前の反応時間における TNF- α の培養上清中の検出については、同じ条件で生きた急増虫体刺激の場合、検出限界以下であった。

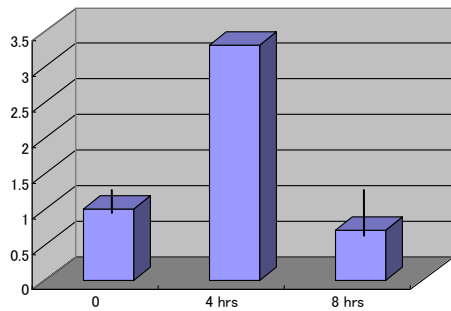
pg/ml



(図 2 : 急増虫体粗抽出液で刺激した時の BMMC の TNF- α 分泌)

(3) *T.g* 刺激が BMMC の TNF- α の遺伝子発現に与える影響を real-time PCR で調べた結果、未刺激時と比べると、BMMC1 に対して急増虫体 2 で刺激した 4 時間後の遺伝子発現は約 3.3 倍であったが、その後の遺伝子発現は抑制されていた (図 3)。

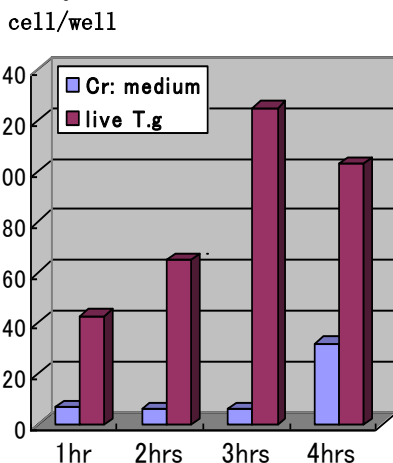
0 時間時に発現している遺伝子量を 1 として倍率で示した。



(図3: 急増虫体刺激によるBMMCのTNF- α 遺伝子発現)

(4) *T.g* 刺激により BMMC から TNF- α がマスト細胞外に放出され、同時に細胞内で TNF- α の遺伝子発現が増強して、外界に放出した分の TNF- α の合成が行われていることがこれまでの結果から示唆された。次にマウスの腹腔内に *T.g* を接種した時に観察されたマスト細胞の滲出が BMMC でも起るかを Transwell system で検証した。

下層に培養液のみと、生きた急増虫体を入れたウェルを用意し、それぞれの上層に BMMC と下層の *T.g* が直接接触しないが、液体部分は浸潤できる小孔膜で分離されたウェルを静置し、BMMC を入れ、1 時間から 4 時間までの間に *T.g* の居る下層への BMMC の移動について下層ウェル中の BMMC 数を算出し解析した結果、BMMC は生きた急増虫体に反応して急増虫体の居る部位に滲出していた。これは *in vitro* 内で BMMC を用いて行ったことであるが、生きた *T.g* 刺激に対して BMMC が応答していることが示唆された (図4)。一方でホルマリン固定した死んだ急増虫体に対しては、培養液のみの対照群に比べて有為差は見られなかった。



(図4: 急増虫体の局在部位へのBMMCの応答)

(5) *T.g* 刺激に応答して活性化した BMMC が好中球に与える影響を Transwell を用いて調

べた。下層ウェルに 2×10^6 cells BMMC を入れて、それぞれ培養液のみ、*T.g* を加えたものを用意し、上層にはマウスの腹腔から採取した好中球を 1×10^5 cells 入れて培養した。1 時間後の下層ウェルに遊走した好中球数を染色後算定した結果、培養液のみのウェルには平均して 50 cells, *T.g* のみのウェルには約 80 cells, BMMC のみのウェルには約 70 cells の好中球が遊走していた。*T.g* と BMMC が共に入れているウェルには約 600 cells の好中球が遊走しており、*T.g* により刺激された BMMC から放出された TNF- α や他のサイトカイン、ケモカインにより好中球が活性化され、遊走因子のある下層ウェルへの移動が観察された。

(6) ヒトの末梢血から分離した好中球や、好中球様に分化させたヒト骨髓由来細胞である HL-60 は TNF- α に 10 分暴露すると直ちに活性化され、活性酸素産生の増強などを示す。また、好中球も HL-60 も血清存在下で生きた *T.g* に対し活性酸素を放出する。

細菌は血清オプソニン化により好中球に貪食されるが、*T.g* は好中球に認識されるものの貪食はされにくい。しかし、*T.g* 刺激によりマスト細胞から TNF- α が放出され、その TNF- α が好中球を活性化し、同時にマクロファージなども活性化される。活性化された好中球やマクロファージは他の炎症性サイトカインやケモカインを放出してさらなる炎症反応を増強させる。

細菌や真菌感染においては、マスト細胞は炎症性メディエーターを放出して感染防御に関与していることが知られているが、*T.g* 刺激に対しても、細菌 LPS 刺激時より量は少ないものの、応答して TNF- α を産生する結果が得られ、炎症反応の起点になる可能性が示唆された。またその産生は、原虫自体よりも、可溶性の分泌抗原も含んだ虫体由来の粗抽出液による刺激で多く観察されたことから、原虫から産生される因子が刺激因子である可能性が示唆された。

本研究で用いた *T.g* 株はマウス体内ではシストを形成せず増殖を続ける強毒株であるため、組織破壊が進み好中球やマクロファージの浸潤が進むとそれらの細胞による炎症が強くなる。今後はマウス体内でシストを形成する弱毒株などによる応答も調べる必要があると考える。

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)

[学会発表] (計3件)

(1) 上田 たかね, 祖母井 庸之,

丹生 茂, 越尾 修, 菊地 弘敏, 斧 康雄
分化 HL-60 細胞の TNF- α に対する応答性
第 57 回日本化学療法学会東日本支部総会
平成 22 年 10 月 22 日 京王プラザホテル
(東京)

(2) 上田 たかね, 祖母井 庸之,
丹生 茂, 越尾 修, 菊地 弘敏, 斧 康雄
原虫感染に対する HL-60 を用いた好中球機
能の解析—第 2 報—
第 84 回日本感染症学会総会
平成 22 年 4 月 5 日 京都国際会館
(京都)

(3) 上田(菊地) たかね, 祖母井 庸之,
丹生 茂, 越尾 修, 菊地 弘敏, 斧 康雄
原虫感染に対する HL-60 用いた好中球機能
解析—第 1 報—
第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術
集会
平成 21 年 10 月 30 日 東京ドームホテル
(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 たかね (KIKUCHI-UEDA TAKANE)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号 : 80459312

(2) 研究分担者

斧 康雄 (ONO YASUO)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号 : 10177272