

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21590462

研究課題名（和文）トキソプラズマ HSP70 による樹状細胞ワクチンと IFN- γ ・MyD88 の役割解析研究課題名（英文）Roles of IFN- γ and MyD88 on dendritic cell-vaccine with *T. gondii*-HSP70

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

研究成果の概要（和文）：

トキソプラズマ感染における病態像は原虫株や病原性の違いのみならず、宿主の防御免疫により統御され、FN- γ と MyD88 欠損マウスは弱毒株感染によっても必ず死に至る。本研究では、感染感受性 C57BL/6 背景の IFN- γ および MyD88 欠損マウスを免疫不全モデルマウスに用い、免疫不全宿主の致死性トキソプラズマ症に対するトキソプラズマ HSP70 (*T. g.* HS70) による樹状細胞 (DC) 標的ワクチンの実用化に向け以下の解析を行った。まず、IFN- γ および MyD88 欠損マウス DC が、野生型 (WT) マウス DC と同様に、*T. g.* HS70 刺激により成熟し、syngeneic naïve WT マウスの CD4⁺Th0 細胞を Th1 に誘導することを明らかにした。さらに、DC 標的 *T. g.* HSP70 遺伝子ワクチン後、早期に、所属リンパ節の DC 成熟分化および Th1 防御免疫が誘導され、この応答は TLR4/MyD88 自然免疫シグナルを介することを明らかにし、且つ、TLR4/MyD88 シグナルを介するワクチン効果が慢性期まで持続することを解明し、国際誌に発表した。

研究成果の概要（英文）：

Pathological findings in *Toxoplasma gondii*-infected host are regulated not only by differences in virulence or pathogenicity of *T. gondii* strains but also by genetic protective immunity of hosts. We have reported that FN- γ deficient mice and MyD88 deficient mice succumbed within 7-10 days. In the present study, these murine strains are used as immune-deficient mouse models and have analyzed the effects of *T. gondii*-HSP70 (*T.g.* HS70) gene vaccine targeting peripheral immature dendritic cells (DC). Firstly, DC from both FN- γ and MyD88 deficient mice are capable to differentiate into mature DC by the stimulation with *T.g.* HS70 and successively induce Th1 polarization from Th0 of syngeneic naïve WT mice. Secondary, *T.g.* HS70 gene vaccine succeeds to induce DC maturation and successive Th1 polarization of CD4⁺ T cells in the draining lymph nodes (dLN) maximal at day 5 after the vaccine. Analyses of innate immunity in these events revealed that TLR4/MyD88 signal pathway is involved not only at acute phase but also at chronic phase of vaccine effects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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・HSP70・樹状細胞

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てきた。トキソプラズマは典型的日和見感染病原体であるが、弱毒株のトキソプラズマ感染においても、全身臓器に汎播種性感染をきたし、一週間で必ず死に至る特異的免疫不全マウスが2種類(IFN- γ 欠損マウスとMyD88 欠損マウス)存在することを明らかにし、これらを免疫不全実験モデルマウスとして致死性トキソプラズマ症の病態解析を進めている。

一方、宿主防御免疫を強力に抑制する virulent 分子であるトキソプラズマ HSP70 (Tg.HSP70)が、宿主の抗原提示細胞(APC)による免疫応答の惹起に重要な役割を果たすことを解明してきた。

上述の研究を踏まえ、本研究では、最終課題である、免疫不全宿主に惹起される致死性トキソプラズマ症に対する DC ワクチンに向けて、免疫不全宿主の DC 成熟化と Tg.HSP70 刺激 DC による自己T細胞性免疫応答の解析に着手した。

2. 研究の目的

これまでに、Tg.HSP70 刺激によるヒト monocyte 由来 DC およびマウス骨髄由来 DC の成熟化を明らかにし、成熟 DC のアロ反応性 T 細胞活性化を報告してきたが (Biochem Biophys Res Commun. 322: 899, 2004; Cell Stress Chaperones 11: 13, 2006)、自己 DC による *ex vivo* ワクチン確立には syngeneic DC-T 細胞間における細胞性免疫応答の解析が必須である。

また最近、トキソプラズマ感染感受性の野生型 (WT) C57BL/6 マウスにおいて、Tg.HSP70 刺激により成熟化した骨髄由来 DC が naive マウスの脾臓 CD4⁺T 細胞を Th1 に誘導することを明らかにし、感染急性期および慢性期のマウスの CD4⁺T 細胞の IFN- γ 産生も増加させることを解明した。

そこで、本研究では、WT C57BL/6 マウスとの backcross により WT と同じ遺伝的背景をもつ免疫不全マウス(IFN- γ 欠損マウスとMyD88 欠損マウス)を用い、Tg.HSP70 刺激による免疫不全宿主の DC 成熟化と抗原提示機能、および、自己 T 細胞応答誘導機能を解析すること、を目的とした。

さらに、DC 標的 Tg.HSP70 遺伝子ワクチンの防御免疫誘導惹起に関わる自然免疫の役割を解明した。

3. 研究の方法

下記の点に焦点を絞り解析した。

1) Tg.HSP70 刺激による DC 成熟化における IFN- γ と MyD88 の役割解析:

① IFN- γ 欠損マウスおよび MyD88 欠損マウスの骨髄由来未熟 DC に Tg.HSP70 を加えて *in vitro* 培養し、DC 成熟化を、i) 細胞表面 MHC 分子と抗原提示アクセサリ分子 (CD40, CD80, CD86) の発現増加、および、ii) FITC 標識デキストラン食食機能低下、を FACS 解析

② 上記免疫不全マウスの Tg.HSP70 刺激 DC の IL-12 mRNA 発現解析

2) Tg.HSP70 刺激 DC の Th1/Th2/Th17 誘導における IFN- γ と MyD88 の役割解析:

WT および免疫不全マウスの Tg.HSP70 刺激 DC による、WT、IFN- γ および MyD88 欠損 naive マウス各々の CD4⁺T 細胞の Th 分化誘導能を Th1/Th2/Th17 の代表的サイトカインである IFN- γ /IL-4/IL-17 mRNA 発現により解析

3) Tg.HSP70 DC ワクチン作用機序の解析:

末梢皮膚に存在する未熟 DC を標的として Tg.HSP70 遺伝子ワクチンを接種後、所属リンパ節における DC の成熟化、および、成熟 DC により惹起される Th 分化誘導を CD4⁺T 細胞のサイトカイン発現により real-time PCR を用いて解析

特に、C57BL/6 の遺伝的背景を有する自然免疫レセプター TLR 欠損マウスおよび TLR アダプター分子欠損マウスの導入により、DC 標的 Tg.HSP70 遺伝子ワクチンの防御免疫誘導における自然免疫の役割を解析

4. 研究成果

1) Tg.HSP70 刺激による DC 成熟化における IFN- γ と MyD88 の役割:

IFN- γ 欠損 C57BL/6 マウスの骨髄由来未熟 DC が、WT マウス DC と同様に、Tg.HSP70 刺激により成熟することが、i) DC の形態的变化 (図 1A)、ii) DC 細胞表面 MHC 分子 (I-A^b)・アクセサリ分子 (CD86) の発現増加 (図 1B)、iii) Dextran 抗原取込み低下 (図 1C) から明らかとなった。Tg.HSP70 刺激による IFN- γ 欠損マウス DC の成熟は、Tg.HSP70 刺激による DC 成熟が TLR4 を介し、且つ、その下流シグナルは MyD88 非依存性シグナル経路を介するという我々の報告 (Cell Stress Chaperones 11: 13, 2006) に一致する。

2) **T.g.HSP70** 刺激 DC の Th1/Th2/Th17 誘導における **IFN- γ** と **MyD88** の役割 :

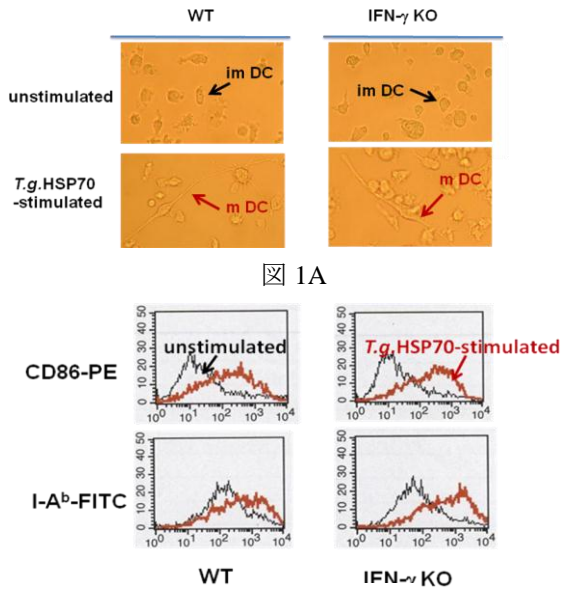


図 1A

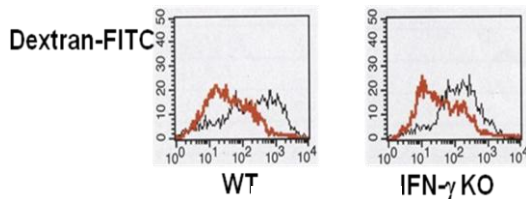


図 1B

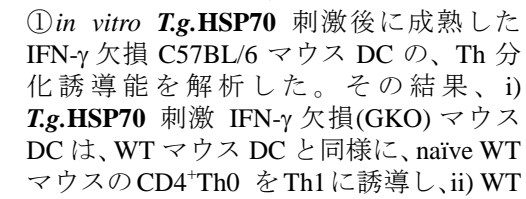


図 1C

① *in vitro* **T.g.HSP70** 刺激後に成熟した IFN- γ 欠損 C57BL/6 マウス DC の、Th 分化誘導能を解析した。その結果、i) **T.g.HSP70** 刺激 IFN- γ 欠損(GKO) マウス DC は、WT マウス DC と同様に、naïve WT マウスの CD4⁺Th0 を Th1 に誘導し、ii) WT マウス DC が誘導しない Th2 も誘導した。また、iii) WT マウス DC も GKO マウス DC も WT と GKO の CD4⁺細胞から Th17 を誘導した (図 2)。

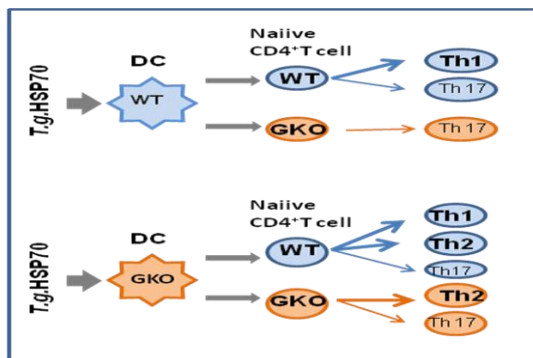


図 2

②次に、*in vitro* **T.g.HSP70** 刺激後に成熟した MyD88 欠損 C57BL/6 マウス DC の、Th 分化誘導能を解析した。その結果、i) **T.g.HSP70** 刺激 MyD88 欠損マウス DC も

WT マウス DC も、WT と MyD88 欠損マウス両者の CD4⁺Th0 を Th1 に誘導し、ii) CD4⁺T 細胞が MyD88 欠損マウスである場合にのみ Th2 が誘導され、Th2 誘導は WT の DC に比べ MyD88 欠損マウス DC でより明らかであった。また、iii) CD4⁺T 細胞が WT マウスである場合にのみ Th17 が誘導された (図 3)。

この結果から、MyD88 が、APC レベル (DC)のみならず、T 細胞レベルにおいても Th 分化に必要であることが明らかとなった。

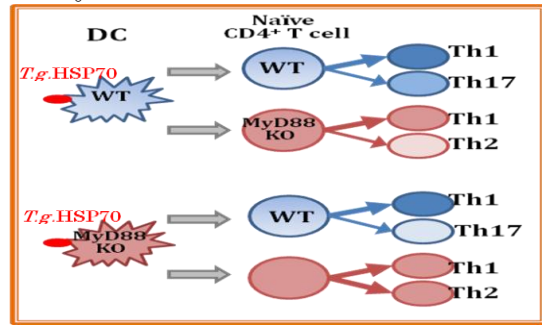
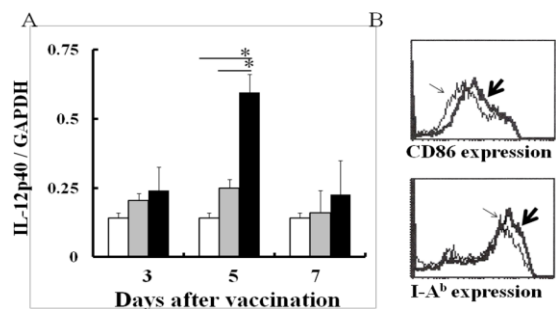


図 3

3) **T.g.HSP70** DC ワクチン作用機序の解析 :

① **T.g.HSP70** 遺伝子ワクチンによる naïve マウス所属リンパ節 DC の活性化

末梢皮膚 DC を標的とした **T.g.HSP70** 遺伝子ワクチンの感染急性期および慢性期におけるワクチン効果を既に報告済みである (Vaccine 2003;21:2852-61)。本研究においてはワクチン作用機序の解析を目的として、WT C57BL/6 マウスに **T.g.HSP70** 遺伝子ワクチンを行い、3,5,7 日後の所属リンパ節 DC (CD11c⁺細胞) を分離した。所属リンパ節 DC に、ワクチン 5 日後を peak とする IL-12 産生がみられ (図 4A)、同時に DC 表面の MHC や CD86 分子の発現増加もあり (図 4B)、DC の *in vivo* 成熟活性化が確認された。



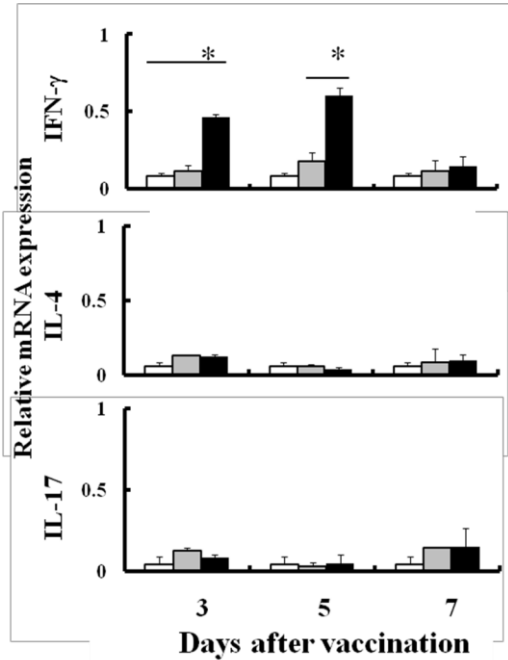
Effect of **T.g.HSP70** gene vaccine on DC activation of WT mouse.
A: unvaccinated (white column) or vaccinated either without (gray column) or with **T.g.HSP70** gene (black column)
B: vaccinated without (thin line) or with **T.g.HSP70** gene (thick line)

図 4

② **T.g.HSP70** 遺伝子ワクチンによる naïve マウス所属リンパ節の Th 分化誘導

T.g.HSP70 遺伝子ワクチン 3,5,7 日後に、

WT C57BL/6 マウス所属リンパ節から CD4⁺ 細胞を分離し、Th 分化誘導能を Th1/Th2/Th17 の代表的サイトカインである IFN- γ /IL-4/IL-17 mRNA 発現により解析した。*T.g.HSP70* ワクチン 5 日後に CD4⁺細胞の最も強い IFN- γ 発現がみられた。IL-4 や IL-17 発現はみられず、*T.g.HSP70* 遺伝子ワクチン後の早期に所属リンパ節で Th1 分化が誘導されていることが明らかになった (図 5)。

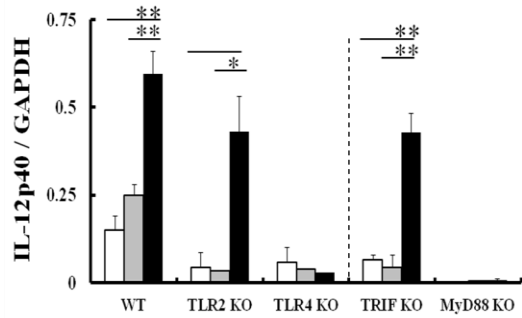


Effect of *T.g.HSP70* gene vaccine on Th polarization at the dLN of WT mouse. Unvaccinated (white column) or vaccinated either without (gray column) or with *T.g.HSP70* gene (black column)

図5

③ *T.g.HSP70* ワクチンが誘導する所属リンパ節 DC 活性化と TLR の関与

T.g.HSP70 は TLR2 および TLR4 のアゴニストであることから、TLR2 および TLR4 欠損マウスを用いて、所属リンパ節 CD11c⁺細胞の IL-12 産生に関わる TLR を解析した。WT と TLR2 欠損マウスでは *T.g.HSP70* 遺伝子ワクチン 5 日後の所属リンパ節 DC に明らかな IL-12 mRNA 発現がみられたが、TLR4 欠損マウスの DC ではみられず、所属リンパ節における DC の IL-12 産生に TLR4 が関与することが明らかとなった (図 7)。TLR4 の下流シグナルには TIRAP-MyD88 経路と TRAM-TRIF 経路の 2 通りの経路があるため、MyD88 欠損マウスと TRIF 欠損マウスを用いて IL-12 産生に関わる細胞内下流シグナル経路を検討した。MyD88 欠損マウス DC では IL-12 産生がみられず、TRIF 欠損マウス DC ではみられることから、ワクチンにより誘導される所属リンパ節 DC の IL-12 産生は TLR4-MyD88 シグナル分子を介することが明らかになった (図 6)。

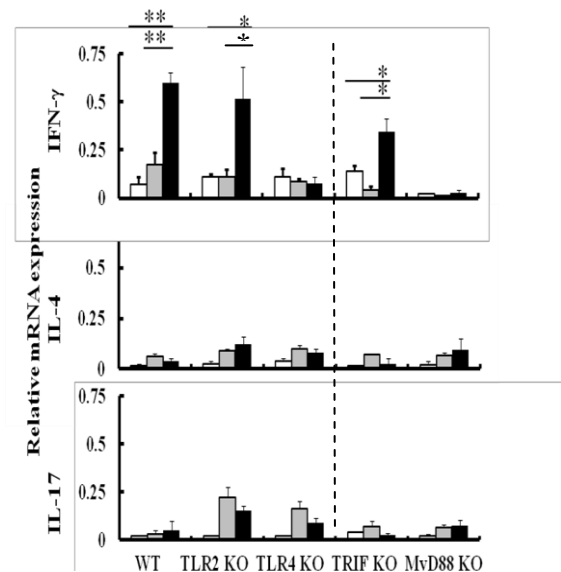


TLR involvement in IL12 production of DC at dLN by *T.g.HSP70* gene vaccine. Unvaccinated (white column) or vaccinated either without (gray column) or with *T.g.HSP70* gene (black column)

図6

④ *T.g.HSP70* 遺伝子ワクチンが誘導する所属リンパ節 Th1 分化誘導と TLR の関与

TLR2 および TLR4 欠損マウスを用い、*T.g.HSP70* 遺伝子ワクチン 5 日後の所属リンパ節 CD4⁺細胞のサイトカイン mRNA 発現により Th 分化を検討した。WT と TLR2 欠損マウスの CD4⁺細胞でみられた *T.g.HSP70* 遺伝子ワクチン後の IFN- γ 発現は、TLR4 欠損マウスの DC ではみられず、ワクチン後の Th 分化における TLR4 関与が示された。また、TLR4 下流シグナルは MyD88 を介することが示された (図 7)。



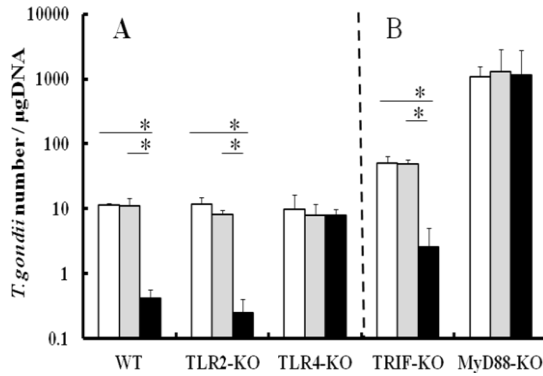
TLR involvement in Th1 induction at the dLN by *T.g.HSP70* gene vaccine. Unvaccinated (white column) or vaccinated either without (gray column) or with *T.g.HSP70* gene (black column)

図7

⑤ 急性期 *T.g.HSP70* 遺伝子ワクチン効果における TLR 関与

T.g.HSP70 遺伝子ワクチン 1 週後に深谷株トキソプラズマ 10 シストを経口感染させ、感染 1 週後(急性期)の腸管膜リンパ節内トキソプラズマ数を定量的競合的 PCR により測

定した。**T.g.HSP70** は TLR2 および TLR4 のアゴニストであるが、**T.g.HSP70** 遺伝子ワクチン効果は 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、急性期遺伝子ワクチン効果に TLR4 が関与することが示された。TLR4 下流シグナルは MyD88 を介し、TLR4/ MyD88 シグナル経路がワクチン効果発現に関与することが示された (図 8)。



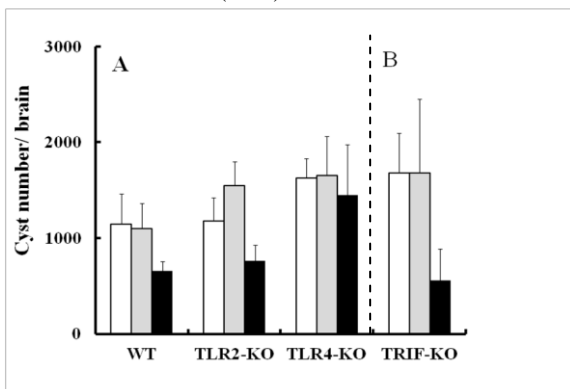
TLR involvement in *T.g.HSP70* gene vaccine effect at an acute phase of *T.gondii* infection. Unvaccinated (white column) or vaccinated either without (gray column) or with *T.g.HSP70* gene (black column)

図8

⑥慢性期 **T.g.HSP70** 遺伝子ワクチン効果における TLR 関与

T.g.HSP70 遺伝子ワクチン効果は12週間以上持続することから、長期ワクチン効果における TLR 関与を検討した。TLR2 および TLR4 欠損はトキソプラズマ感染マウスの生存率には影響を与えないものの、感染6週後のマウス脳内シスト数を測定すると、WT と TLR2 欠損マウスでは **T.g.HSP70** 遺伝子ワクチンによるシスト数減少がみられ、TLR4 欠損マウスではワクチン効果はみられなかった。また、MyD88 はトキソプラズマ感染宿主の防御免疫に必須で、その欠損マウスは遅くとも2週間以内に死亡する。

TRIF 欠損マウスでは慢性期の脳内シスト数においてもワクチン効果がみられ、TLR4/ MyD88 シグナル経路を介したワクチン効果が慢性期におけるまで、継続していることが明らかになった(図9)。



TLR involvement in *T.g.HSP70* gene vaccine effect at a chronic phase of *T.gondii* infection. Unvaccinated (white column) or vaccinated either without (gray column) or with *T.g.HSP70* gene (black column)

図9

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7件)

- ① Washino T, Moroda M, Iwakura Y, Aosai F. *Toxoplasma gondii* infection inhibits Th17-mediated spontaneous development of arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Infect. Immun.* 80; 1437-1444, 2012. 査読：有
- ② Makino M, Uemura N, Moroda M, Kikumura A, Piao LX, Mohamed RM, Aosai F. Innate immunity in DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 gene that induces DC activation and Th1 polarization. *Vaccine* 29: 1899-1905, 2011. 査読：有
- ③ 若林正一郎、中野倫代、外川八英、神戸直智、松江弘之、野呂瀬一美、青才文江 creeping disease-超音波検査が虫体先進部位の同定に有用であった例 皮膚病診療 33:897-900, 2011. 査読：無
- ④ Kikumura A, Fang H, Mun HS, Uemura N, Makino M, Sayama Y, Norose K, Aosai F. Protective immunity against lethal anaphylactic reaction in *Toxoplasma gondii*-infected mice by DNA vaccination with *T.gondii*-derived heat shock protein 70 gene. *Parasitol Int.* 59: 105-111, 2010. 査読：有
- ⑤ 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 小児科診療 73 (6): 1046-1049, 2010. 査読：無
- ⑥ Aosai F, Sayama Y, Uemura N, Kikumura A, Akira S. Innate immunity in *Toxoplasma gondii* heat shock protein 70-stimulated dendritic cell maturation and Th1 polarization. *Curr. Res. in Immunology* 3: 1-15, 2009. 査読：無

[学会発表] (計13件)

- ① 植村紀子、諸田雅央、青才文江 免疫不全宿主における先天性トキソプラズマ症発症機序の解析 第81回日本寄生虫学会大会抄録集 59 2012年3月23日兵庫(西宮)
- ② Moroda M, Iwakura Y, Aosai F. (2011) Roles of IL-17 in protective immunity of *Toxoplasma gondii*-infected mice. 第40回日本免疫学会総会・学術集会 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 40 (ISSN 0919-1984) 101. 2011年11月27日. 千葉(幕張)
- ③ Washino T, Moroda M, Iwakura Y, Aosai F. (2011) *Toxoplasma gondii* infection inhibits Th17-mediated spontaneous

- development of arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 40 (ISSN 0919-1984) 101. 2011 年 11 月 27 日 千葉 (幕張)
- ④ 鷺野巧弥、諸田雅央、岩倉洋一郎、青才文江 *Toxoplasma* 感染は関節リウマチモデルマウスにおいて関節炎を抑制する 第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会 抄録集 71 2011 年 7 月 17 日 東京
- ⑤ 諸田雅央、岩倉洋一郎、青才文江 *Toxoplasma gondii* 感染宿主防御免疫における IL-17 の役割解析 第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会 抄録集 70 2011 年 7 月 17 日 東京
- ⑥ 神白麻衣子、柿内聡志、石藤智子、古本朗嗣、石田正之、土橋佳子、野呂瀬一美、青才文江、堤寛、佐多徹太郎、森本浩之輔、有吉紅也 遅延性再発性トキソプラズマ症の一例 第 85 回日本感染症学会総会 抄録集 170 2011 年 4 月 21 日 東京
- ⑦ 若林正一郎、中野倫代、外川八英、神戸直、松江弘之、青才文江、野呂瀬一美 超音波検査が虫体先進部の検出に有用であった Creeping disease の 1 例 日本皮膚科学会第 834 回東京地方会 2010 年 12 月 18 日 千葉
- ⑧ Fumie Aosai, Masayuki Makino, Masataka Moroda, Noriko Uemura, Akitoshi Kikumura, Akihiko Yano. Innate immunity in *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 gene vaccine-induced T_H1 polarization and vaccine effects against toxoplasmosis 14th ICI, Kobe, Japan, 2010.8.23.
- ⑨ 牧野真幸、植村紀子、菊村亮暁、矢野明彦、青才文江 Innate immunity in *Toxoplasma gondii* HSP70 gene vaccine-induced T_H polarization and *T. gondii* loads at toxoplasmosis. 第 79 回日本寄生虫学会大会 抄録集 84 2010 年 5 月 20 日 旭川
- ⑩ 諸田雅央、植村紀子、佐山勇輔、青才文江 Functional role of MyD88 in T_H polarization by *Toxoplasma gondii* HSP70-stimulated BMDC at both APC and T cell levels. 第 79 回日本寄生虫学会大会 抄録集 84 2010 年 5 月 20 日 旭川
- ⑪ Uemura N, Sayama Y, Makino M, Aosai F (2009). Roles of MyD88 in Th activation by *Toxoplasma gondii* heat shock protein 70-stimulated bone marrow-derived dendritic cells. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 39 (ISSN 0919-1984) 101. 2009 年 12 月 2 日 大阪
- ⑫ Makino M, Kikumura A, Uemura N, Yano A, Aosai F (2009). *Toxoplasma gondii*-HSP70 gene vaccine induces T_H1 polarization in naïve mice and limits *T. gondii* loads at acute and chronic phase of toxoplasmosis via TLR4/MyD88 pathway. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 39 (ISSN 0919-1984) 101. 2009 年 12 月 2 日 大阪
- ⑬ 大封昌子、三枝隆博、小林勝哉、渡邊究、中谷嘉文、野呂瀬一美、青才文江、宮崎之男 脳生検にて確定診断に至った Immunocompetent host 発症トキソプラズマ脳炎の 1 例 第 14 回日本神経感染症学会 2009 年 10 月 16 日 栃木

〔図書〕(計 3 件)

- ① 青才文江 「トキソプラズマ症」今日の治療指針 2013 年版 医学書院 印刷中
- ② 青才文江 「トキソプラズマ感染の予防・疫学と母子感染」母子感染 金原出版 p160-166, 2011
- ③ 青才文江 「トキソプラズマ HSP70 による TLR4 を介した樹状細胞活性化と Th1 細胞の誘導」臨床免疫・アレルギー科学評論社 55 : 35-43, 2011

〔その他〕

ホームページ等
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

岩倉 洋一郎 (IWAKURA YOICHIRO)
東京大学・医学研究院・教授
研究者番号 : 10089120