

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15122

研究課題名(和文)高性能トキソプラズマ癌ワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of the highly efficient Toxoplasma anti-tumor vaccine

研究代表者

山本 雅裕 (Yamamoto, Masahiro)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00444521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、1)インターフェロンガンマ刺激依存的に宿主タンパク質であるp62がトキソプラズマに蓄積すること、2)インターフェロンガンマ刺激依存的にトキソプラズマ不活化ワクチンによるキラーT細胞反応が高まること、3)p62欠損細胞およびマウス個体で、不活化ワクチン投与に対するキラーT細胞活性化が著しく低下することを示しました。本研究成果は、近年我が国においても症例報告が急増しているトキソプラズマ症に対して、p62という新たな分子を標的とした新規のトキソプラズマ不活化ワクチン開発戦略を提供できるものとして大いに期待できます。

研究成果の概要(英文)：Here we show that interferon (IFN-) stimulates ubiquitin and p62 recruitment to *T. gondii* parasitophorous vacuoles (PVs). Some essential autophagy-related proteins, but not all, are required for this recruitment. Regardless of normal IFN- -induced *T. gondii* clearance activity and ubiquitination, p62 deficiency in antigen-presenting cells (APCs) and mice diminishes the robust IFN- -primed activation of CD8(+) T cells that recognize the *T. gondii*-derived antigen secreted into PVs. Because the expression of Atg3 and Irgm1/m3 in APCs is essential for PV disruption, ubiquitin and p62 recruitment, and vacuolar-antigen-specific CD8(+) T cell activation, IFN- -mediated ubiquitination and the subsequent recruitment of p62 to *T. gondii* are specifically required for the acquired immune response after PV disruption by IFN- -inducible GTPases.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ キラーT細胞

1. 研究開始当初の背景

寄生虫「トキソプラズマ」は、世界人口の約3分の1に感染しているとされる日和見病原体の一つです。免疫力が正常なヒトや家畜では問題となることはほとんどないが、免疫力が著しく低下しているエイズ患者、抗癌剤投与下にある者あるいは免疫抑制剤投与下にある臓器移植患者などにおいて、致死的な脳炎や肺炎を引き起こす。さらにトキソプラズマは妊婦が初感染であった場合に胎児に感染してしまい、感染の時期によっては流産・死産あるいは新生児が先天性の水頭症や脳の石灰化を伴ったまま生まれ、重い脳神経精神症状を患ってしまう先天性トキソプラズマ症の原因となる。近年のユッケや生レバー等の肉の生食やジビエ肉の流行など我が国における食の嗜好の変化に伴い、トキソプラズマに汚染された生肉に接する機会の増大により、本邦においても先天性のトキソプラズマ症の報告が増加傾向にあり、社会的な問題となっている。

トキソプラズマ症に対しては、今のところ、ヒトで認可・使用されているワクチンは存在しない。現在、マウスなどの実験動物レベルでは、主要抗原の精製タンパク質を用いた実験的コンポーネントワクチンや、生きたトキソプラズマに放射線を照射し増殖能を失わせた不活化ワクチンの開発に向けた基礎研究が欧米を中心に進んでおり、それらを未感染マウスに投与することによってそれぞれトキソプラズマの抗原に特異的な抗体やキラーT細胞を誘導することが可能となってきた。トキソプラズマの放射線照射不活化ワクチン投与時のキラーT細胞の活性化にあたって、米国のグループの先行研究により、トキソプラズマが宿主細胞内に感染した際に形成する寄生胞の中に分泌するタンパク質が最も優良な抗原となることが示されていたが、寄生胞内に放出されたトキソプラズマ由来のタンパク質がどのようなメカニ

ズムでキラーT細胞の抗原となるのかについては、ほとんど分かっていなかった。

2. 研究の目的

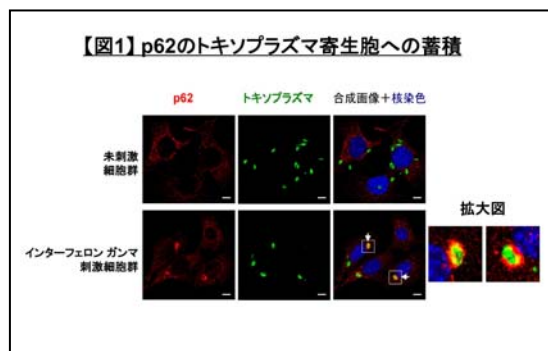
トキソプラズマワクチンのキラーT細胞活性化機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

トキソプラズマの寄生胞に蓄積する分子群を探索し、そのトキソプラズマワクチンによるキラーT細胞の活性化における役割をCRISPRゲノム編集法により作製したマウスと樹状細胞を用いて検討した。

4. 研究成果

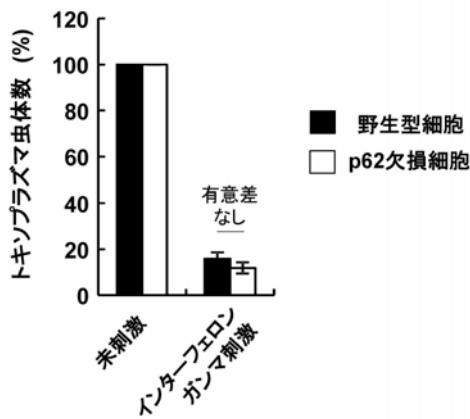
私達の研究グループは、トキソプラズマの寄生胞にインターフェロンガンマ依存的に蓄積する分子群の解析を以前から進めており、これまでにGBPなどの寄生胞破壊因子やRabGD1 α を介した制御機構を報告してきた。その解析の中で、p62（およびユビキチン）と呼ばれる宿主分子群が寄生胞にインターフェロンガンマ刺激依存的に蓄積することも見出していました（図1）。



インターフェロンガンマ刺激によってトキソプラズマの殺傷に関与するGBPやRabGD1 α などと異なり、p62を欠損しても感染細胞内におけるトキソプラズマの数に変化はないことから（図2）、GBPやRabGD1 α などとは異なり、p62は寄生胞に蓄積するにもかかわらずトキソプラズマの殺傷には関与しないことが明らかとなった。

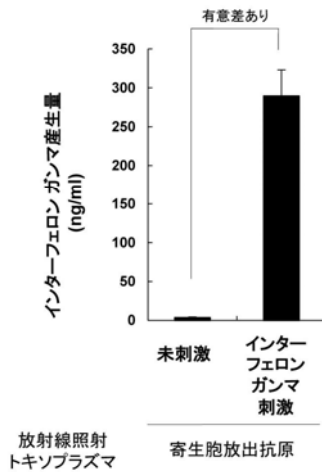
以前に米国グループの先行研究により、寄生胞内に放出されたトキソプラズマ由来の抗原がキラーT細胞の主要抗原になるということから、次に私達はインターフェロン

【図2】トキソプラズマ殺傷能の比較



ガンマ刺激によってトキソプラズマ感染細胞を刺激した時のキラーT細胞の活性化を検討した。その結果、未刺激の感染細胞に比べて、インターフェロンガンマによって刺激した感染細胞では抗原特異的なキラーT細胞の活性が劇的に上昇することを見出した(図3)。

【図3】インターフェロンガンマによる抗原提示能(キラーT細胞活性化能)増加

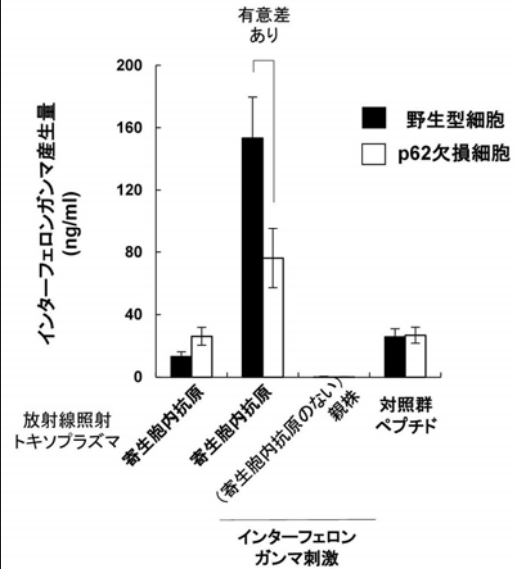


この感染細胞をインターフェロンガンマ刺激したことによるキラーT細胞の激しい活性化は、p62を欠損した感染細胞では有意に低下した(図4)。

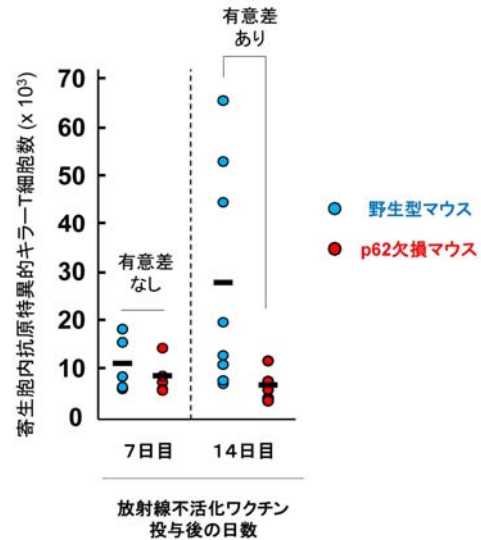
さらに個体レベルでも野生型マウスに比べて、p62欠損マウスではトキソプラズマの放射線不活化ワクチン投与による抗原特

異的なキラーT細胞の数が激減していた(図5)。

【図4】p62欠損抗原提示細胞でのキラーT細胞活性化能の低下

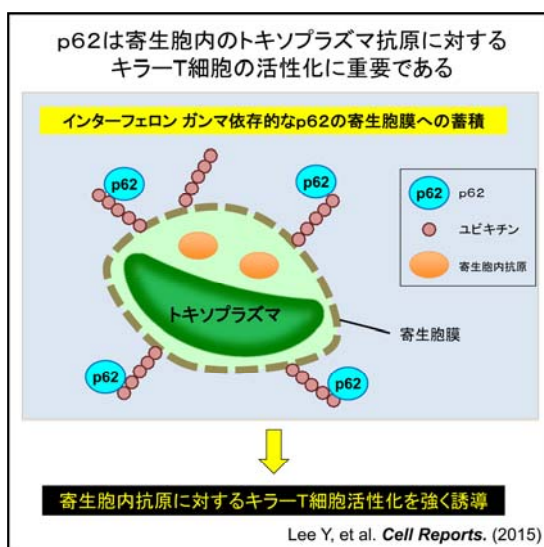


【図5】p62欠損マウスでの不活化ワクチン効果の低下



以上のことから、p62はインターフェロンガンマ刺激に依存してトキソプラズマの寄生胞に蓄積するものの殺傷反応には関与せず、その代わりに、寄生胞内に放出された抗原特異的にキラーT細胞の活性化を担うというこれまでに報告されていないユニ

ークな役割を持っていることが明らかとなった (図6)。



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1件)

Lee Y, Sasai M, Ma J, Sakaguchi N, Ohshima J, Bando H, Saitoh T, Akira S, Yamamoto M. p62 plays a specific role in interferon- γ -induced presentation of a Toxoplasma vacuolar antigen. *Cell Reports*. (2015) 13:223-233.

[学会発表] (計2件)

1. 山本雅裕、李栄愛、笹井美和、馬知秀、伴戸博徳、坂口直哉 「オートファジーアダプター分子 p62 はインターフェロン γ 誘導性のトキソプラズマの寄生胞抗原の提示に特異的に関与する」第85回日本寄生虫学会大会 (宮崎市民プラザ、宮崎、2016年3月19日-20日)
2. Masahiro Yamamoto, Youngae Lee 「p62/Sqstm1 plays a specific role in CD8+ T cell activation by antigen-presenting cells after IFN- γ -induced disruption of the parasitophorous vacuoles of *Toxoplasma gondii*」第9回 寄生虫感染免疫研究会 (鹿児島大学、鹿児島、2016年2月11・12日)

[図書] (計2件)

1. 山本雅裕 「トップランナーに聞く (50) 病原性寄生虫『トキソプラズマ』の医学研究について」最新医学 70:793-799 (2015)
2. 山本雅裕 「IFN- γ 誘導性 GTPase とトキソプラズマ感染」感染・炎症・免疫 45-2:2-9

(2015)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅裕 (YAMAMOTO, Masahiro)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：00444521

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし