

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689029

研究課題名(和文) 宿主 原虫間相互作用解析による新規自然免疫現象の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel innate immune system by analysis of host-parasite interaction

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) 21,100,000円、(間接経費) 6,330,000円

研究成果の概要(和文)：GBPは非常に相同性の高い113個からなるファミリーを形成しており、マウスにおいては6個と7個がそれぞれ3番と5番染色体に分かれて並んで存在している。3番染色体にあるGBP(GBPchr3)を染色体工学で欠損させたマウスを作製し、細胞内寄生性病原体の一つである寄生虫(原虫)「トキソプラズマ」に対する宿主応答を解析した。野生型マウスと比較して、GBPchr3欠損マウス及び細胞はトキソプラズマ感染に対する感受性が高まっていた。このことから、GBPはIFN-γ 依存的に誘導され病原性寄生虫トキソプラズマに対する防御因子として機能することが判明した。

研究成果の概要(英文)：Interferon-g (IFN-g) is essential for host defense against intracellular pathogens. Stimulation of innate immune cells by IFN-g up-regulates ~2000 effector genes such as immunity-related GTPases including p65 guanylate-binding protein (GBP) family genes. We show that a cluster of GBP genes is required for host cellular immunity against the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. We generated mice deficient for all six GBP genes located on chromosome 3 by targeted chromosome engineering. Mice lacking Gbpchr3 were highly susceptible to *T. gondii* infection, resulting in increased parasite burden in immune organs. Furthermore, Gbpchr3-deleted macrophages were defective in IFN-g-mediated suppression of *T. gondii* intracellular growth. In addition, some members of Gbpchr3 restored the protective response against *T. gondii* in Gbpchr3-deleted cells. Thus, Gbpchr3 redundantly play a pivotal role in anti-*T. gondii* host defense by controlling IFN-g-mediated cellular innate immunity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：インターフェロン 自然免疫 トキソプラズマ原虫

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ原虫はネコを終宿主とする病原性微生物である。中間宿主はヒトを含むほぼ全ての恒温動物であり、ヒトに限っていえば全世界人口のうちの約3分の1(数十億人)が感染し、我国だけでも数千万人に感染していることが試算されている。健常人では一過性の発熱などを除いてほとんど症状がないことからトキソプラズマ原虫は日和見病原体として扱われているが、エイズ患者・抗癌剤投与された患者などの免疫不全者においてはトキソプラズマ脳症を引き起こし、さらに妊婦が妊娠初期に初感染であった場合その胎児にトキソプラズマ原虫が母体の胎盤を介して感染し流産したり、あるいは新生児が水頭症に罹患した状態で生まれてくるなど非常に予後不良な疾患を引き起こす重要病原体である。また、最近統合失調症の発病にもトキソプラズマ原虫の感染の有無が関与しているケースがあると報告されている。

トキソプラズマ原虫はマラリア症の原因病原体であるマラリア原虫などと同じ孢子虫類原虫に分類され、宿主の細胞の中でのみ増殖可能な偏性細胞内寄生生物である。感染可能な細胞の種類はすべての有核の細胞であり、赤血球あるいは肝臓細胞のみにしか感染できないマラリア原虫とは比較にならないぐらいの多数の細胞系譜がトキソプラズマ原虫の標的細胞となることから、数十億人に上る感染者がいる原因の一つであると考えられる。トキソプラズマ原虫はその三日月形の先端部に存在する複合体(アピカルコンプレックス)を用いて標的細胞に密着後、能動的に速やかに細胞内に侵入し、ロプトリーと呼ばれる分泌小器官から様々な分子を宿主細胞室内に放出することが判明した。

2. 研究の目的

トキソプラズマ原虫の遺伝子型につ

いてはヨーロッパ及び北米地域において以前から精力的に研究されており、その結果トキソプラズマ原虫はI型、II型、III型という3つの主要な型に分類されることが分かっている。それぞれの遺伝子型を持つ原虫の病原性については、マウスにおける感染実験からI型原虫は 10^0 (つまり、原虫1個)感染すればマウスを殺すことが可能であるのに対し、II型とIII型原虫のLD50はそれぞれ 10^3 と 10^5 であり、従ってI型原虫の病原性はマウスにおいて著しく高いことが報告されていた。II型原虫とIII型原虫を使った順遺伝学的解析によりその原因の候補分子としてロプトリーに存在するリン酸化酵素であるROP18が挙げられたが、ROP18がI型トキソプラズマ原虫の特徴である高病原性を決定する因子であるかどうかは不明であったことから、ROP18の役割を検討した。

また、トキソプラズマは細胞に感染した時に、「寄生胞」と呼ばれる細胞内小器官を形成し、その中で宿主から栄養分を摂取することで効率的に増殖することがわかっている。それに対して、我々宿主はインターフェロン(IFN)というT細胞やナチュラルキラー細胞などの免疫細胞から主に分泌されるタンパク質を使って寄生胞内のトキソプラズマを破壊することがトキソプラズマ症の発病を防ぐのに重要であるということが約30年前から示唆されていた。しかし、IFN自身には病原体を直接破壊するような構造はなく、従ってどのようにしてIFNがトキソプラズマを破壊しているのかについてのメカニズムは長い間不明のままであった。

我々のグループはIFNがマクロファージや線維芽細胞などの自然免疫担当細胞に作用して、約2000種類のエフェクター分子群の遺伝子発現を誘導することに着目した。

中にはトキソプラズマの寄生胞の周辺に集まってくる GBP (p65 GTP分解酵素) と呼ばれる 13 個のファミリー分子群から形成されるエフェクター分子群があり、宿主の抗トキソプラズマ免疫応答に何らかの役割を果たしていることが考えられた。通常、ある特定の遺伝子の役割を調べたいという場合には一つの遺伝子を欠損させたマウスを作成して検討しますが、GBP の場合はそれぞれの遺伝子の相同性が非常に高く (つまり、よく似ているため) 一つの遺伝子を欠損させても非常に良く似た別の GBP ファミリー分子がその機能を補う (相補する) ことが予想された。

3 . 研究の方法

研究グループはまず ROP18 が I 型トキソプラズマ原虫の高病原性を規定するかどうかを検討する目的で、ROP18 欠損原虫を遺伝子ノックアウト法により作成した。ROP18 欠損 I 型原虫は、野生型 I 型原虫に比べて病原性が著しく低下したことから ROP18 が I 型トキソプラズマ原虫の高病原性を決定する病原性因子であることが分かった。次に、ROP18 のどの領域が病原性に重要かということを調べる目的で、ROP18 の N 末端部位を欠損する変異体を ROP18 欠損原虫に発現させ病原性を検討したところ、野生型 (完全長) ROP18 を発現させた原虫に比べて、病原性の回復が不十分であったことから ROP18 の N 末端が ROP18 の高病原性に重要であることが分かった。

ROP18 のファミリー分子である ROP16 は同様に宿主細胞に打ち込まれ、自然免疫系担当細胞では免疫抑制能を有する転写因子である Stat3 という宿主因子と結合することを我々の研究グループが以前に報告していた。そこで ROP18 についてもその N 末端部位に結合する宿主因子が存在するのではないかと考え、ROP18 の結合分子を探索した結果、小胞体ストレスセンサーの一つで

あり転写因子でもある ATF6 が ROP18 の宿主因子として同定された。さらに、ROP18 存在下では ATF6 がプロテアソーム依存的な蛋白質分解を受けることで、ATF6 依存的な遺伝子発現を抑制することを見出しました。また ROP18 はリン酸化酵素ですが、そのリン酸化酵素活性が ATF6 の蛋白質分解に必須であること及び I 型トキソプラズマ原虫の病原性に必須であることも明らかにした。

しかしながら、ATF6 がどのような機能を持っているためにトキソプラズマ原虫高病原性因子 ROP18 に標的とされているかについては不明であった。そこで ATF6 の生理的機能を明らかにするために ATF6 欠損マウスを遺伝子ノックアウト法により作成し検討した。その結果、ATF6 欠損マウスは野生型マウスに比較して ROP18 欠損原虫感染に対して感受性が著しく高まることから、ATF6 が原虫に対する免疫機能を有することが示唆された。さらに ATF6 欠損マウスでは原虫排除に重要な免疫システムである I 型免疫応答の一部に機能不全があることを見出した。

について、我々の研究グループでは GBP ファミリー分子が 6 個と 7 個に分かれて異なる染色体上の非常に狭い領域に隣り合って存在することを利用して、染色体工学的手法を用いて 3 番染色体上に存在する全ての GBP (6 個) の GBP ファミリー分子を欠損するマウス (GBPchr3 欠損マウス) の作製し解析した。

GBPchr3 欠損マウスと野生型マウスにトキソプラズマを感染させ生存率を測定した所、GBPchr3 欠損マウスはトキソプラズマ感染に対して非常に弱くなっていることが分かった。また感染マウス内でのトキソプラズマの感染拡大を、トキソプラズマから出る発光を指標に生体イメージング装置を

使って検討したところ、GBPchr3 欠損マウス内では野生型マウスと比べて劇的にトキソプラズマが増殖していることが分かった。次にトキソプラズマが生体内で感染している細胞であるマクロファージと呼ばれる自然免疫細胞を単離して、トキソプラズマを感染させその増殖を検討した。IFN γ で野生型マクロファージを処理すると濃度依存的にトキソプラズマの増殖が抑制されますが、GBPchr3 欠損マクロファージではIFN γ によるトキソプラズマの増殖を野生型細胞と比較して抑制できないことを見出した。このことから、IFN γ によって誘導される GBPchr3 は自然免疫細胞マクロファージ内でトキソプラズマ増殖を妨げることが、生体レベルでのトキソプラズマに対する感染防御反応に重要であることが分かった。

では、GBPを欠損したマクロファージでは何故トキソプラズマの増殖を抑制できないのでしょうか？その問題を解決するために研究グループは電子顕微鏡を使って、感染細胞内でのトキソプラズマの状態を検討した。その結果、IFN γ で刺激した野生型マクロファージ内ではトキソプラズマの寄生胞の膜が激しく波打ち、その構造が著しく破壊されていた。一方、GBPchr3 欠損マクロファージ内ではIFN γ 処理をしてもそのような寄生胞膜の構造変化は認められなかった。このことから、GBPはマクロファージ内でトキソプラズマの寄生胞の膜構造を破壊する機能があることが分かった。

ではどのようにしてGBPはトキソプラズマの寄生胞膜を破壊することができるのでしょうか？以前から寄生胞膜の破壊についての機能が示唆されていたGBPとは別のファミリー分子群であるp47 GTP分解酵素（IRG）の動態について、野生型及びGBPchr3 欠損マクロファージで比較した。

すると、野生型細胞ではIRGがトキソプラズマに蓄積するのに対して、GBPchr3 欠損マクロファージではIRGの蓄積が著しく減少していることが分かった。またGBPとIRGの局在について野生型マクロファージ内で検討したところどちらもトキソプラズマに蓄積し、さらにGBPはIRGに結合していることも分かった。これらのことから、GBPはIRGをトキソプラズマに蓄積させることでその寄生胞膜を破壊し増殖を阻害していることが示唆された。

4．研究成果

これらの結果から、I型トキソプラズマ原虫はROP18を感染細胞に分泌しATF6を標的として分解することでその機能不全を誘導し宿主免疫応答を抑制するために高病原性であることが明らかとなった。

今回の研究により、IFN γ によって誘導される抗トキソプラズマ感染防御機構にGBPが重要な役割を果たしていることを明らかにした。このことから、人為的にGBPの機能を高めることにより、我が国で症例報告が急増しているトキソプラズマ症に対する新たな治療戦略を提供できることが期待できる。

寄生胞はトキソプラズマに限らずマラリア原虫においても形成されることを考えると、GBPがマラリア原虫感染防御に関与する可能性は非常に高く、マラリア症の発病におけるGBPの役割の解明は最も重要な今後の研究課題です。またGBPは様々な癌において高い発現が認められることが多数報告されており、感染下ではない異常な状態でのGBPの存在が引き起こす疾患の病理機構の解明に、研究グループが染色体工学により作り出したGBP欠損マウスが非常に有用であると考えられる。

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)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

□ Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Ma JS, Kamiyama N, Matsuura Y, Pann-Ghill S, Hayashi M, Ebisu S, Takeda K, Akira S, **Yamamoto M**. Role of the mouse and human autophagy proteins in IFN- γ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* (2014) 192: 3328-3335. 査読・有 doi: 10.4049/jimmunol.1302822.

□ **Yamamoto M**, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, Kamiyama N, Saiga H, Ohshima J, Sasai M, Kayama H, Okamoto T, Huang DS, Soldati-Favre D, Horie K, Takeda J, Takeda K. A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity* (2012) 37:302-313. 査読・有

□ **Yamamoto M**, Ma JS, Mueller C, Kamiyama N, Saiga H, Kubo E, Kimura T, Okamoto T, Okuyama M, Kayama H, Nagamune K, Takashima S, Matsuura Y, Soldati-Favre D, Takeda K. ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. *J Exp Med.* (2011) 208:1533-1546. 査読・有 doi: 10.4161/viru.3.1.18340.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. **山本雅裕**、大嶋淳、馬知秀、笹井美和、李英愛 「IFN- γ 依存的抗トキソプラズマ応答におけるオートファジー蛋白質の役割」 第82回日本寄生虫学会大会 (愛媛大学 城北キャンパス、愛媛、平成26年3月27日-28日、2014)
2. Ohshima J, Lee Y, Ma JS, Sasai M, **Yamamoto M**. 「Role of the mouse and human autophagy proteins in IFN- γ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*」 第7回寄生

虫感染免疫研究会 (ベストウエスタンホテル高山、岐阜、平成26年3月6-7日、2014)

3. **Yamamoto M** 「Selective and Strain-specific NFAT4 activation by a *Toxoplasma gondii* polymorphic Dense Granule Protein GRA6」 International Symposium TCUID2013 Toward Comprehensive Understanding of Immune Dynamism (Suita, Osaka, Japan, November 18-20, 2013)
4. **Yamamoto M** 「A protozoan parasite *Toxoplasma gondii* manipulates host cell functions by effector molecules」 The XIVth International Congress of Protistology, Symposium 7 (Vancouver, Canada, July 28-Aug 2, 2013)
5. **Yamamoto M** 「Immunological interface between host and a protozoan parasite *Toxoplasma gondii*」 FORUM GRADUATE SCHOOLS INFECTION & IMMUNITY BIOLOGIE-MEDECINE (Geneva, Switzerland, June 28, 2013)
6. **山本雅裕**、大嶋淳、馬知秀、神山長慶、竹田潔 「インターフェロン誘導性遺伝子群 GBP の抗トキソプラズマ自然免疫における役割の解明」 第82回日本寄生虫学会大会 (東京医科歯科大学 湯島キャンパス、東京、平成25年3月29日-31日、2013)
7. **山本雅裕**、馬知秀、大嶋淳、笹井美和 「A Cluster of IFN- γ -inducible p65 GTPases Plays a Critical role in the Host Defense against *Toxoplasma gondii*」 第6回寄生虫感染免疫研究会 (大分大学・医学部、大分、平成25年3月8-9日、2013)
8. **Yamamoto M** 「Role of GBPs in innate host defense against an intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*」 第41回日本免疫学会総会・学術集会 (神戸国際会議場、神戸、兵庫、December 5th-7th, 2012)
9. **Yamamoto M** 「Essential role of interferon- γ -inducible p65 GTPases in host cellular innate immunity against *Toxoplasma gondii*」 The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Awaji Yumebutai International

Conference Center on Awaji Island,
Hyogo, Japan, September 11th-14th, 2012)

10. **Yamamoto M**, Okuyama M, Ma JS, Kamiyama N, Ohshima J, Soldati-Favre D, Takeda J, Takeda K. 「 Critical function of a Cluster of IFN- γ -inducible p65 GTPases in Host Defense Against *Toxoplasma gondii* 」 WHIP 2012 16th Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA, April 22-25, 2012)
11. **Masahiro Yamamoto** 「 A *Toxoplasma* virulence factor ROP18 disrupts a host innate and adaptive immune linkage 」 The Second CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology “ Regulation of Immune Responses in Health and Diseases (Osaka University, Osaka, Japan, December 4-6, 2011)
12. **Masahiro Yamamoto** 「 A mechanism of innate immune evasion by a protozoan parasite 」 SRC Mini Symposium II “ Immune Regulation & Immune Evasion ” (UNIST, Ulsan, Koera, October 18, 2011)
13. **Masahiro Yamamoto**, Naganori Kamiyama, Ji Su Ma, Christina Mueller, Dominique Soldati-Favre, Kiyoshi Takeda. 「 Targeted disruption of an ATF6 -dependent host type I immunity by a *Toxoplasma* virulence factor ROP18 」 IUMS2011 XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan, September 6-10, 2011)
14. **Yamamoto M**, Ma JS, Muller C, Kamiyama N, Soldati-Favre D, Takeda K. 「 ATF6 β is a Host Cellular Target of the *Toxoplasma* Virulence factor ROP18 」 WHIP 2011 15th Annual Woods Hole ImmunoParasitology Conference (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA, April 17-20, 2011)

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