

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590512

研究課題名(和文) 原虫由来細胞外ヌクレオチド酵素による宿主免疫調節機構の解析

研究課題名(英文) Immuno-modulator effects of the apyrase derived from *Toxoplasma gondii*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Toxoplasma gondiiが細胞膜表面に発現・分泌するNTPaseが好中球やマスト細胞への影響を、これらの細胞のATPと原虫の精製NTPaseとの共存下での炎症に關与する因子の遺伝子発現を指標に解析した。ATP単独曝露においては、好中球やマスト細胞のTNF- α 、IL-8の遺伝子発現は抑制されたが、NTPaseの共存下ではATPの抑制効果が相殺された。

好中球のecto ATPase分子CD39の遺伝子発現もNTPaseの共存により相殺されコントロールと同等であった。Adenosineの受容体であるAdoRA2aはNTPaseの共存により抑制された。CD73の発現は影響されなかった。

研究成果の概要(英文)：Immuno-modulate effects of *T. gondii* NTPase on neutrophils or mast cells were examined in this research project. When neutrophils or mast cells were exposed with ATP in vitro, gene expressions of TNF- α and IL-8 were down-regulated. However, presence of NTPase with ATP neutralized those effects of down-regulation. Gene expression of CD39 that is as known as ecto ATPase in neutrophil were also decreased. Neutrophils exposed both of ATP and NTPase showed that the equal CD39 expression with control. The mRNA expression of an adenosine receptor, AdoRA2a was down-regulated by NTPase. No effects of ATP or NTPase were observed in CD73 expression. It is suggested that *T. gondii* might use NTPase as an immune-modulator to escape from neutrophils or other immune cells in infection.

研究分野：医歯薬学

キーワード：原虫 免疫調節

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞外 ATP (Extracellular ATP: eATP) は神経系や血管系における細胞間情報伝達に重要であることはよく知られているが、免疫系においても重要な働きをしている可能性が報告されている [Schenk et al. *Sci. Signal.* 1 ra6 (2008), Atarashi et al. *Nature* 455: 808-812 (2008)]。定常状態の細胞質内 (cytosolic) には 3-10 mM の ATP が存在する。自己免疫や細菌などの病原体が組織に侵入することにより傷害された細胞から放出された多量の ATP は周囲の細胞にとって eATP となる。多量の eATP は免疫系細胞のみならず、上皮細胞にも発現しているプリン作動性受容体 (purinergic receptor) を数 10 秒以内に活性化させ、IL-1 β などの炎症性サイトカイン産生を引き起こす。また eATP は、好酸球や好中球、未成熟樹状細胞に対し直接細胞遊走効果も示す。これらのことから、eATP は自己免疫疾患や sepsis を増悪させている原因の一つと考えられている。一方、定常状態の細胞質内 (cytosolic) の ATP 濃度は 3-10 mM であるが、eATP 濃度は ~10nM であり細胞の内側と外側で 10⁶-fold の濃度勾配が形成されている [Trautmann. *Sci. Signal.* 2 pe6 (2009)]。eATP 濃度が 10nM に維持されているのは apyrase または ecto-ATPases と呼ばれていた細胞外酵素 ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase/CD39) family が、細胞外遊出 ATP を ADP, AMP に分解することによる。

E-NTPDase/CD39 分子は、植物から細菌、原虫や線虫、哺乳動物にわたって共通の構造・機能が保存されていることが近年報告されている [Robson et al. *Purine. Signal.* 2: 409-430. (2006)]。

(2) トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*: T.g) は細胞内寄生原虫で、その急増虫体は宿主のマクロファージ (M ϕ) に感染して増殖する。この急増虫体には総タンパク量の 3% を占める Nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) が発現しており、この NTPase は遺伝子解析から CD39 family 分子であることが分かっている [Nakaar et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92 :229-239. (1998)]。

2. 研究の目的

トキソプラズマ原虫が持つ NTPase の機能、特に宿主免疫に与える影響についての解析はなされていないことから、原虫の侵入・増殖に伴い破壊された組織や細胞から放出される細胞外 ATP を NTPase が分解することで、感染・増殖時に起こる ATP が誘引となり起こす好中球などの炎症反応や免疫応答の調節を行う可能性について解析しすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) トキソプラズマ NTPase 特異的モノク

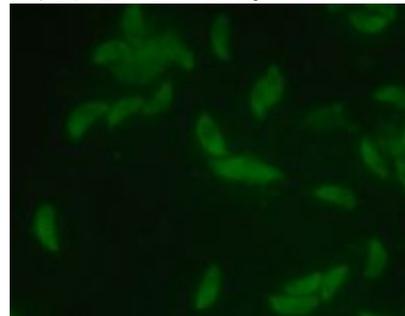
ローナル抗体を用いて NTPase の局在を蛍光顕微鏡による観察と免疫電子顕微鏡像で解析した。

(2) 培養した虫体から NTPase を抗体を用いた Affinity-column で精製した。また、細胞が eATP に対してどのように応答するかについて、1 μ M レチノイン (All-Trans Retinoic Acid: ATRA) 存在下で培養し好中球様に分化させた HL60 細胞に 10 μ M, 100 μ M, 1 mM ATP を添加させ、1 時間後と 4 時間後の炎症に関わる遺伝子の発現について real-time PCR を用いて調べた。

(3) eATP 曝露により分化 HL60 細胞の TNF- α , IL-6 の発現に変化が観察されたことから、分化 HL60 やヒト好中球を 0.1 mM ATP, adenosine, ATP + 精製 NTPase で曝露し、10 分後、30 分後における炎症性サイトカインおよび、purinergic receptors である CD39, Adenosine Receptor 2a (AdoRA2a) の遺伝子発現を解析した。

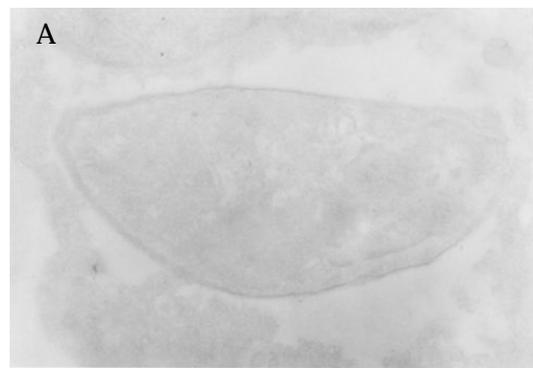
4. 研究成果

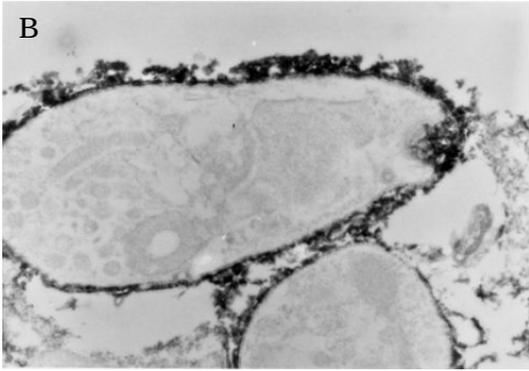
(1) 蛍光抗体を用いた原虫における NTPase の局在は虫体膜全体に蛍光が観察された (図 1)。一方、コントロール抗体では蛍光は観察されなかった。



(図 1: 抗 NTPase モノクローナル抗体による NTPase の局在)

免疫染色した透過電子顕微鏡像では、虫体の外膜表面に強い免疫染色がみられており、コントロールの A と比べて、外膜表面に NTPase 分子が発現していることが明らかになった (図 2B)。

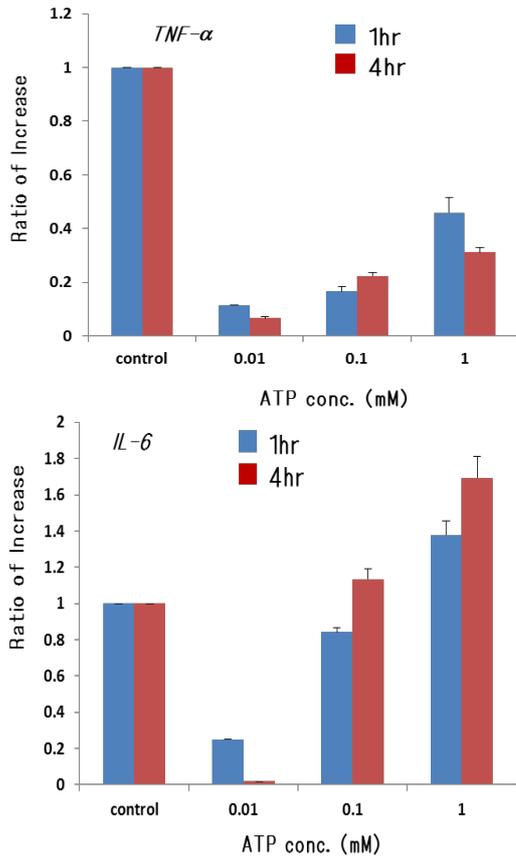




(図2：透過免疫電顕による NTPase の外膜表面発現)

(2)好中球様分化 HL60 細胞を 0.01, 0.1, 1 mM の eATP に曝露させた時の炎症性サイトカインである TNF- α と IL-6 の遺伝子発現を real-time PCR 法で解析した結果、TNF- α はいずれの eATP 濃度においても発現が抑制されていた(図3)。

IL-6 は 10 μ M の eATP 曝露で著しい発現抑制が見られたが、100 μ M ではほぼコントロールと同程度(1時間曝露)または、1.2倍程度(4時間曝露)発現が増強していた。1 mM eATP 曝露では、曝露時間の長さに関わらず IL-6 遺伝子の発現が増強しており(図3) eATP 曝露による遺伝子発現の影響はサイトカインにより異なることが明らかになった。



(図3：分化 HL60 細胞を各濃度の eATP 曝露 1hr, 4hr 後の TNF- α , IL-6 遺伝子発現)

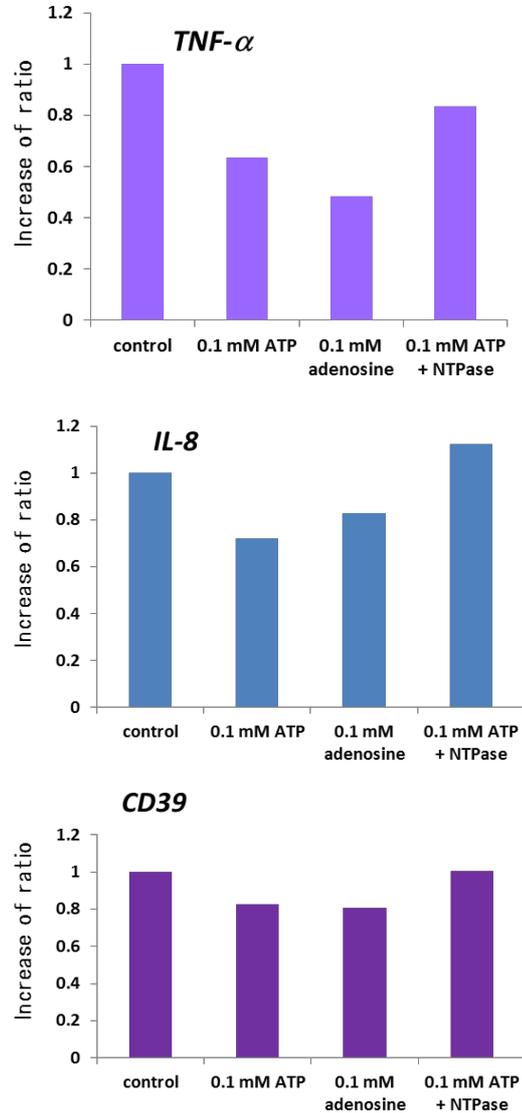
ATP 非存在下で発現している遺伝子量を 1 として倍率で示した。

(3) 好中球は自然免疫と炎症反応における重要なエフェクター細胞であり、*T.g* 感染においても炎症に関与している。健康人の末梢血好中球を 0.1 mM ATP, adenosine, ATP + NTPase の存在下で 10 分培養した時の遺伝子発現変化を解析した。その結果、ATP 曝露においては、分化 HL60 細胞と同様に TNF- α , IL-8 の遺伝子発現は抑制されたが、NTPase の共存により、ATP の抑制効果が相殺されていた。

好中球の ecto ATPase 分子である CD39 の遺伝子発現も ATP 曝露では抑制されていたが、NTPase の共存により相殺され、コントロールと同等であった。

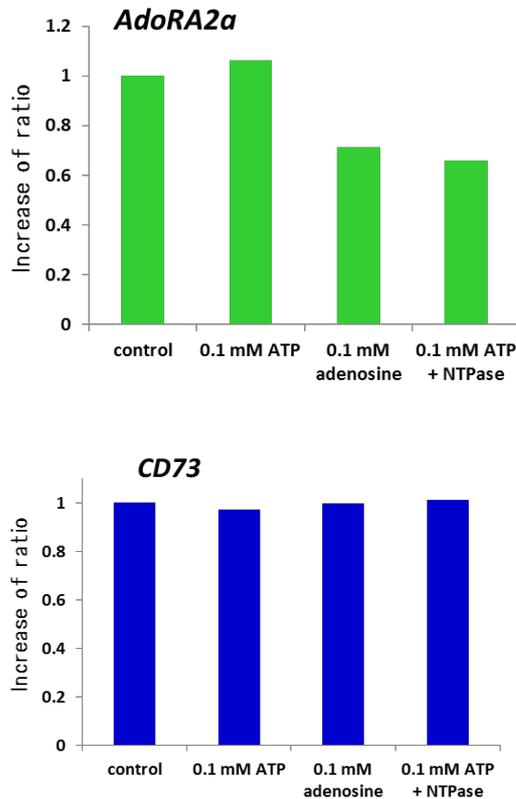
一方、Adenosine の受容体である AdoRA2a の発現は NTPase の共存により抑制された(図4)。

CD73 の発現については影響を与えなかった。



(図4：好中球を 0.1 mM ATP, Adenosine, ATP + NTPase に 10 分曝露後の遺伝子発現)

(図 4 続き)



(4) 生体の細胞にとって ATP は炎症亢進因子であり、恒常性維持のために細胞はその表面に発現している CD39, CD73 などが作用して ATP を分解している [Trautmann. *Sci. Signal.* 2 pe6 (2009)]. 原虫感染時には感染細胞の破壊時に細胞質内にある ~0.1 mM の ATP が放出され、これに生体も原虫も曝露される。また細胞内寄生である本病原体は寄生・生存のための Parasitophorous vacuole を形成するまでの間にも高濃度の ATP に曝される可能性が考えられる。しかし、本原虫は体表面に CD39 に相同性が高く、ATP 分解能を持つ NTPase を発現し、虫体外に分泌することで、ATP の効果を相殺させることで免疫細胞の応答を攪乱している可能性が示唆された。

本原虫以外の原虫や細菌においても様々な免疫回避機構や免疫調節 (Immuno-modulator) 作用が報告されている。

本原虫は細胞内寄生が免疫細胞からの回避の主な機構であると考えられているが、そのみならず、この NTPase が炎症性亢進因子を分解することで宿主細胞の免疫応答に影響を与える Immuno-modulator である可能性が示唆された。

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 7 件)

Ueda T., Akuta T., Kikuchi-Ueda T., Imaizumi K., Ono Y. Improving the soluble expression and purification of recombinant human stem cell factor (SCF) in endotoxin-free *Escherichia coli* by disulfide shuffling with persulfide. *Protein Expression and Purification*, 査読有、vol. 120, 2016, pp99-105. DOI:10.1016/j.pep.2015.12.015

Mu X., Nakano R., Nakano A., Ubagai T., Kikuchi-Ueda T., Tansho-Nagakawa S., Kikuchi H., Kamoshida G., Endo S., Yano H., Ono Y. Loop-mediated isothermal amplification: Rapid and sensitive detection of the antibiotic resistance gene *ISAbal-bla_{OXA-51-like}* in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiological Methods*, 査読有、vol. 121, 2016, pp36-40. DOI:10.1016/j.mimet.2015.12.011

Kamoshida G., Kikuchi-Ueda T., Tansho-Nagakawa S., Nakano R., Nakano A., Kikuchi H., Ubagai T., Ono Y. *Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). *Journal of Infection and Chemotherapy*, 査読有、vol. 21, 2015, pp43-49. DOI:10.1016/j.jiac.2014.08.032

Akuta T., Kikuchi-Ueda T., Imaizumi K., Oshikane H., Nakaki T., Okada Y., Sultana S., Kobayashi K., Kiyokawa N., Ono Y. Expression of bioactive soluble human stem cell factor (SCF) from recombinant *Escherichia coli* by coproduction of thioredoxin and efficient purification using arginine in affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*, 査読有、vol. 105, 2015, pp1-7. DOI:10.1016/j.pep.2014.09.015

Mu X., Ubagai T., Kikuchi-Ueda T., Tansho-Nagakawa S., Nakano R., Kikuchi H., Ono Y. Effects of Erythromycin and Rifampicin on immunomodulatory gene expression and cellular function in human polymorphonuclear leukocytes. *Chemotherapy*, 査読有、vol. 59, 2013, pp395-401. DOI:10.1159/000358818

Nakano R., Okamoto R., Nakano A., Nagano N., Abe M., Tansho-Nagakawa S., Ubagai T., Kikuchi-Ueda T., Koshio O., Kikuchi H., Ono Y. Rapid assay for detecting *gyrA* and *parC* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae*. *Journal*

of Microbiological Methods, 査読有、vol. 94, 2013, pp213-216.
DOI: 10.1016.j.mimet.2013.06.019

Kikuchi-Ueda T., Ubagai T., Ono Y.
Priming effects of tumor necrosis factor- α on production of reactive oxygen species during *Toxoplasma gondii* stimulation and receptor gene expression in differentiated HL-60 cells. Journal of Infection and Chemotherapy, 査読有、vol. 19, 2013, pp1053-1064.
DOI: 10.1007/s10156-013-0619-4

〔学会発表〕(計 10 件)

上田たかね、祖母井庸之、鴨志田 剛、永川 茂、西田 智、海野雄加、佐藤 義則、斧 康雄
Acinetobacter baumannii 刺激に対するマスト細胞と好中球の炎症反応に関わる遺伝子の応答(2016年4月)第90回日本感染症学会総会：仙台国際センター(宮城・仙台市青葉区青葉山)

上田たかね、祖母井庸之、鴨志田 剛、永川 茂、中野竜一、中野章代、斧 康雄
グラム陰性菌 *Acinetobacter baumannii* と緑膿菌由来 LPS のヒトマスト細胞への影響(2016年3月)第89回日本細菌学会総会：大阪国際交流センター(大阪・大阪市天王寺区上本町)

上田たかね、祖母井庸之、鴨志田 剛、永川 茂、斧 康雄
Acinetobacter baumannii 由来 LPS のヒトマスト細胞への影響(2015年10月)第64回日本感染症学会東日本地方会学術集会：ロイトン札幌(北海道・札幌市中央区北1条)

上田たかね、祖母井庸之、鴨志田 剛、中野竜一、永川 茂、斧 康雄
Acinetobacter baumannii LPS に対するヒト由来マスト細胞の応答(2015年4月)第89回日本感染症学会総会：国立京都国際会館(京都・左京区宝ヶ池)

上田たかね、祖母井庸之、中野竜一、永川 茂、中野章代、斧 康雄
Acinetobacter baumannii 感染に対するヒト由来マスト細胞の応答(2015年3月)第88回日本細菌学会総会：長良川国際会議場(岐阜・岐阜市長良福光)

上田たかね
Acinetobacter baumannii induces pro-inflammatory cytokine release from mast cells. (2014年12月)第43回日本免疫学会総会：国立京都国際会館(京都・左京区宝ヶ池)

上田たかね、祖母井庸之、中野竜一、中野章代、鴨志田 剛、永川 茂、彦坂 健児、斧 康雄
ヒト由来マスト細胞株の *Acinetobacter* 生菌及び LPS に対する応答(2014年10月)第63回日本感染症学会東日本地方会学術集会：東京ドームホテル(東京・文京区後楽)

上田たかね、祖母井庸之、中野竜一、鴨志田 剛、丹生 茂、菊地弘敏、斧 康雄
Acinetobacter baumannii に対するヒト由来マスト細胞株の応答(2)(2014年6月)第88回日本感染症学会総会：ヒルトン福岡シーホーク(福岡・福岡市中央区地行浜)

上田たかね、祖母井庸之、永川 茂、菊地弘敏、中野 竜一、鴨志田 剛、中野 章代、斧 康雄
分化 HL60 での TNF- α priming による CD11b 発現変化(2013年10月)第62回日本感染症学会東日本地方会学術集会：東京ドームホテル(東京・文京区後楽)

上田たかね、祖母井庸之、中野 竜一、丹生 茂、菊地弘敏、斧 康雄
Acinetobacter baumannii に対するヒト由来マスト細胞株の応答(2013年6月)第61回日本感染症学会総会：パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市西区)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

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

祖母井 庸之 (UBAGAI, Tsuneyuki)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：10311416

菊地 弘敏 (KIKUCHI, Hirotoshi)
帝京大学・医学部・准教授
研究者番号：80338681

(3)連携研究者

()

研究者番号：