

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19153

研究課題名(和文)p62関連オートファジーアダプター分子による感染免疫制御機構の解析

研究課題名(英文)Role of p62-related autophagy adaptor proteins in anti-microbial host defense

研究代表者

李 英愛 (Lee, Youngae)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：60610681

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):本研究で、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し、トキソプラズマ感染細胞では、p62とインターフェロンガンマ依存的にキラーT細胞活性化能が高まり、p62欠損マウス個体で、トキソプラズマ不活化ワクチン投与に対するキラーT細胞活性が著しく低下することを示した。  
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る。

研究成果の概要(英文): We show that interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 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- $\gamma$ -induced *T. gondii* clearance activity and ubiquitination, p62 deficiency in antigen-presenting cells (APCs) and mice diminishes the robust IFN- $\gamma$ -primed activation of CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> T cell activation, IFN- $\gamma$ -mediated ubiquitination and the subsequent recruitment of p62 to *T. gondii* are specifically required for the acquired immune response after PV disruption by IFN- $\gamma$ -inducible GTPases.

研究分野：免疫学

キーワード：オートファジー アダプター 獲得免疫

## 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ある。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、致命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、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的な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りうる。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。トキソプラズマの不活化ワクチンを投与した時のキラーT細胞の活性化では、宿主細胞内に感染した際に形成する寄生胞の中にトキソプラズマが分泌するタンパク質が最も優良な抗原となることが、米国のグループの先行研究により示されていたが、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

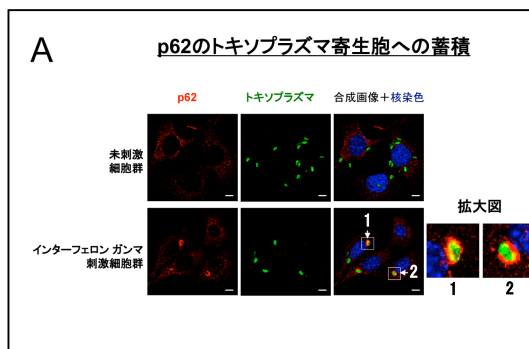
オートファジーのアダプター分子 p62 の他に着目し、このオートファジーアダプター分子が寄生胞に蓄積するのか、そして、寄生胞内に蓄積した抗原の提示に関与するのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

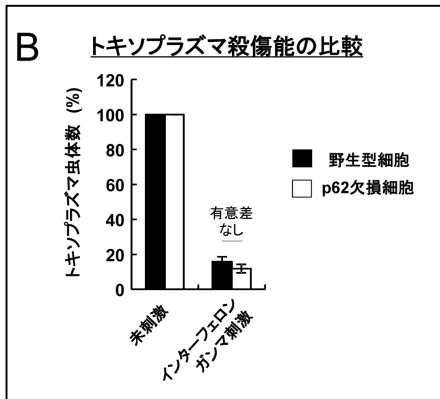
本研究の目的を達成するために、トキソプラズマ原虫をモデル細胞内寄生性病原体として使用して、p62 の寄生胞への動員を制御する分子の同定、p62 の寄生胞へのインターフェロンガンマ誘導性の動員の分子メカニズムの解明、細胞レベルでの p62 の病原体殺傷機構あるいは交差抗原提示における役割の検討、生体レベルでの p62 のトキソプラズマ原虫に対する免疫学的役割の解明を行った。

## 4. 研究成果

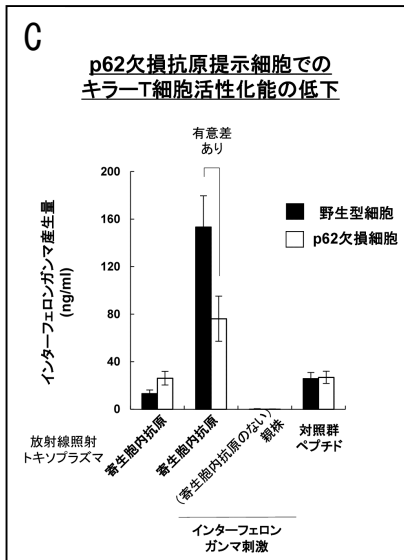
トキソプラズマの寄生胞にインターフェロンガンマ依存的に蓄積する分子群の解析を以前から進めており、これまでにGBPなどの寄生胞破壊因子（2012年7月発表）やRabGD1 $\alpha$ を介した制御機構（2015年8月発表）を報告してきた。その解析の中で、p62（およびユビキチン）と呼ばれる宿主分子群が寄生胞にインターフェロンガンマ刺激依存的に蓄積することも見出していた（下図A）。



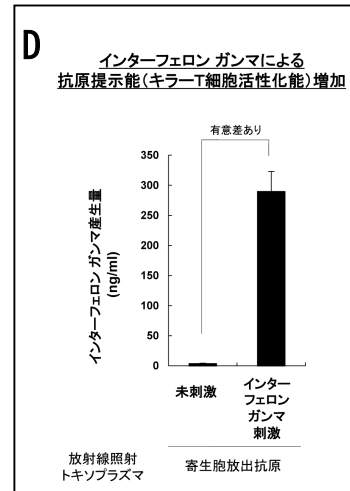
インターフェロン ガンマ刺激によってトキソプラズマの殺傷に関与するGBPやRabGD I αなどと異なり、p62を欠損しても感染細胞内におけるトキソプラズマの数に変化はないことから、GBPやRabGD I αなどとは異なり、p62は寄生胞に蓄積するにもかかわらずトキソプラズマの殺傷には関与しないことが明らかとなった（下図B）。



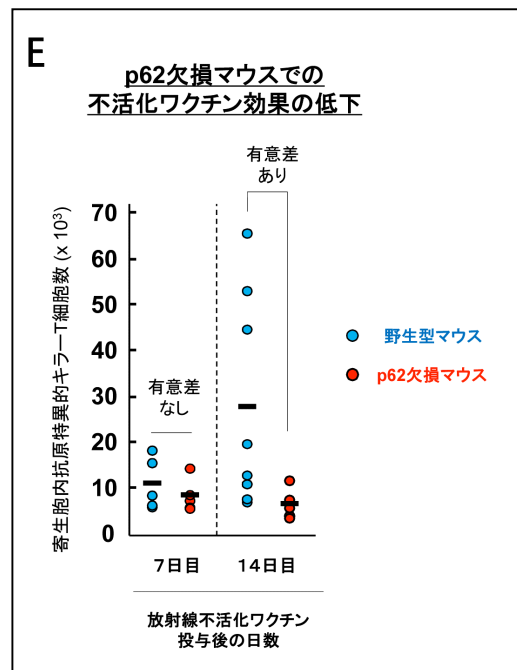
以前に先行研究により、寄生胞内に放出されたトキソプラズマ由来の抗原がキラーT細胞の主要抗原になるということから、次に私達はインターフェロン ガンマ刺激によってトキソプラズマ感染細胞を刺激した時のキラーT細胞の活性化を検討しました。その結果、未刺激の感染細胞に比べて、インターフェロン ガンマによって刺激した感染細胞では抗原特異的なキラーT細胞の活性が劇的に上昇することを見出しました（下図C）。



この感染細胞をインターフェロン ガンマ刺激した際に見られているキラーT細胞の強い活性化は、p62を欠損した感染細胞では有意に低下した（下図D）。



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細胞の数が激減した（下図E）。



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し、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。

本研究で、トキソプラズマ寄生胞放出タンパク質特異的なキラーT細胞活性化における p 6 2 のユニークな機能を発見した。ワクチン開発が進まず、我が国を含め半ば「無視された感染症 (Neglected Infectious Diseases)」の状態となっているトキソプラズマ症に対して、p 6 2 を新たな標的としその機能を高める等によって新規の治療・予防戦略を提供できることが期待される。

#### 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 1 件)

Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley DM, Yoshimori T, Yamamoto M. Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat Immunol.* (2017) 18:899-910. 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[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

李 英愛 (Lee Youngae)  
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教  
研究者番号：60610681

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )