

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2018～2021

課題番号：18KK0226

研究課題名（和文）日中韓三国間でのトキソプラズマ原虫の全ゲノム解読と病原性解析

研究課題名（英文）Pathogenic and genetic analysis of Toxoplasma by Japan, China and South Korea

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） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：日本に未だトキソプラズマが存在し、依然として先天性・後天性トキソプラズマ症を発症し、毎年のように流産・死産・死者が出ていることが判明しているが、分離された日本のトキソプラズマ原虫の性状が全く分からないことが、日本におけるトキソプラズマ症に対する総合的対策を阻む主要な要因の一つであった。日本のトキソプラズマの系統分類や病原性などの寄生虫免疫学的な性状を理解する手段として、日本とは遠く離れた北米・欧州産の標準株との比較に加えて、中国由来のトキソプラズマとの比較でき、そのゲノム構造が明らかとなった。また中国側との共同研究によりiNOSの新しいトキソプラズマ-宿主免疫相互作用が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欧米や申請者のグループから見れば、中国や韓国研究グループは基礎研究力が依然として低いため、アジア由来のトキソプラズマは材料が極めてユニークであるにもかかわらず、その素材のポテンシャルを十分に引き出せていなかったが、本共同研究によりそのポテンシャルを引き出すことができた。また、北朝鮮情勢など歴史的激動期を迎えつつある昨今の東アジア情勢を考えると、地理的だけでなく、歴史的にも恩讐含めて極めて繋がりが緊密な日本・中国・韓国の3か国が手を携えて行う本国際共同研究は、単に寄生虫学という医学生物学的研究の範疇を超えて、民間親善外交の一翼を担い、我が国の国益にも十分利した。

研究成果の概要（英文）：It is known that Toxoplasma still exists in Japan, congenital and acquired toxoplasmosis still develops, and miscarriage, stillbirth, and death occur almost every year, but the properties of isolated Japanese Toxoplasma. It was one of the main factors that hindered comprehensive measures against toxoplasmosis in Japan. As a means of understanding parasite immunological properties such as phylogenetic classification and pathogenicity of Japanese Toxoplasma, in addition to comparison with standard strains from North America and Europe far from Japan, with Toxoplasma from China It was possible to compare and the genomic structure was clarified. In addition, joint research with the Chinese side revealed a new Toxoplasma-host immune interaction of iNOS.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ 中国 韓国 共同研究

## 1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマは世界人口の3分の1に感染している日和見病原体であるが、AIDS患者や抗がん剤投与下にあるがん患者、臓器移植を受け免疫抑制剤を投与された患者では致命的なトキソプラズマ症を引き起こす病原性寄生虫である。そのライフサイクルは、終宿主であるネコ科動物と、中間宿主であるヒトを含む全ての温血動物との間で回っている。1990年代に北米・欧州のトキソプラズマ症患者や野生動物から分離されたトキソプラズマはマウスにおいて病原性が解析され、I型、II型、III型の3型に分類されていた(Howe, et al. *J Infect. Dis* 1995年)。また3型の間を特徴づける多型遺伝子が発見され、それらのRFLP法やMLST法が開発された。しかし、中南米から分離されたトキソプラズマは上記の3型に分類されず、極めて多種であることが判明した。またRFLP法やMLST法にとって代わり、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム塩基配列比較によって、従来「I型」と分類され、同一視されていたRH株とGT-I株の間に約4000カ所の一塩基多型(SNP)があることが分かり、現在、北米・中南米・欧州分離された様々なトキソプラズマ株の全ゲノム的な系統解析が欧米のグループを中心に精力的になされていた。

少子化が進む日本では先天性トキソプラズマ症が妊婦に対して啓発され、そのスクリーニングが実施されるにつれて患者の報告数が増加している。また食生活の変化により肉の生食や加熱不十分で食することによる感染するリスクがマスコミなどで報道され、社会問題化している。今も日本にはトキソプラズマという寄生虫が存在しているが、日本のトキソプラズマの種類、全ゲノム配列、その由来、そして、病原性についての寄生虫免疫学的性状について、ほぼブラックボックス状態といっても過言ではない。日本列島の成り立ちから言って、中国大陸、あるいは、朝鮮半島に存在するトキソプラズマとは地理的にも、また日本と中国や韓国との歴史的観点からも、それらは密接に関連していると考えられるが、研究が進んだ北中南米・欧州由来のトキソプラズマと比べて、日本のみならず中国や韓国など東アジア3か国のトキソプラズマは、系統分類学・寄生虫学・免疫学的な性状がほぼ不明であった。

## 2. 研究の目的

中国・韓国・日本の各地域に存在するトキソプラズマ株の分離と、その系統分類及び病原性解析、そして、新規病原性因子・機構を探索することが研究目的である。さらに、学術的独自性は「中国及び韓国のトキソプラズマ」を自由に扱うことができる点であり、それを可能にした国際共同研究体制を構築することを目的とした。また中国は大都市中心部以外、ほぼ発展途上国と変わらず、新型インフルエンザなど家畜由来の新興・再興感染症が発生しうる「感染症のるつぼ」である。トキソプラズマは現時点で健常人には病原性が低い日和見病原体であっても、我々の生活・生命を脅かすような超高病原性・新型トキソプラズマが今後、中国で生じる可能性は否定できない。従って特に、日本とは切っても切れない関係である中国を巻き込んだ感染症の国際共同研究は常に実施する必要があると考えた。

日本へのトキソプラズマの移動を考える際には数十万年規模の人類や動物の移動を考えるだけでなく、第二次世界大戦前に日本人が中国・東北部(旧満洲)や韓国(旧朝

鮮)に多く居住したという数十年規模の歴史的事情も考慮する必要があることも考慮し、日本・中国・韓国によるトキソプラズマ研究ネットワークの構築が重要であると考え、この国際共同研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究を推進するために以下の方法を採用した。

- 1) 中国、韓国、日本の各トキソプラズマの全ゲノム解析情報解読とそのSNP解析を行った
- 2) 中国、韓国、日本の各拠点の研究者がそれぞれの専門領域(それぞれの強み)を生かしてトキソプラズマの国際共同研究を行った。

### 4. 研究成果

(1) 中国の南部(広州)の食用鳥獣の卸売市場に行き(図1A, 1B)、ドブネズミを捕獲し脳を採取した(図1C)。また猫食文化がある中国南部で食用猫専門市場に行き、猫の脳及び舌片を採取した。各地の大学で各地の研究者が、これらの組織片をPBSでホモゲナイズ後、ペプシン消化して調整した懸濁液を、原虫殺傷作用を全く持たないIFN-  
受容体欠損マウスの腹腔に投与し経時的に観察した。2週間後に血清を採取し、トキソプラズマの有無について抗体価を測定した。また衰弱し始めたマウスの腹腔から腹腔滲出液を採取し、原虫特異的抗体を使用した免疫染色を行い、原虫の存在を確認する。原虫が分離された場合には、マウスの個体を使った限界希釈を行い逐次株化した。



(A) 広州近郊の家畜市場。現地人なら自由に入れる。(倫教授と一緒に訪問)  
(B) 家畜が高密度に飼育されており、野良猫・犬などが場内を歩いていた。  
(C) 市場内に無数に転がっていたドブネズミの死骸。現地では生体を捕まえてトキソプラズマを分離している。

図1 中国での採材の様子

### (2)

中国グループとの共同研究で解析を進めているX株の全ゲノム配列を決定し、SNP密度を高解像度に解析した。その結果、先に報告されていた蘭州(中国西部)由来のTgCatPRC2と近い関係にあることがわかった。尚、X株とTgCatPRC2の間には約38000カ所のSNPが存在することがわかった。完全連結法による系統樹を作成すると、右図となりXは既存の16ハプログループの中でTgCatPRC2と同じHG13という孤立したグループに属することがわかった(図2)。

### (3)

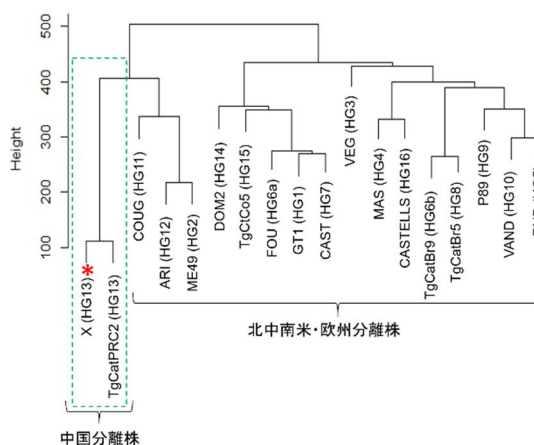


図2 完全連結法による系統樹

HGは、Lorenzi et al. で報告されたハプログループを示す。また  
\* : 今回、中国・武漢で分離された株(X株)を示す。

一酸化窒素 (NO) は、ほとんどの宿主の細胞外および細胞内病原体に対して作用する重要な免疫分子である。ただし、Sprague Dawley (SD) ラットで誘導型一酸化窒素シンターゼ (iNOS<sup>-/-</sup>) をノックアウトした後、これらの iNOS<sup>-/-</sup> ラットはトキソプラズマ感染に対して完全に耐性があることがわかった。iNOS<sup>-/-</sup> ラット腹腔マクロファージがトキソプラズマに感染すると、トキソプラズマのデンスグラニュールから分泌される GRA43 によって引き起こされる高レベルの活性酸素種 (ROS) が生成され、寄生

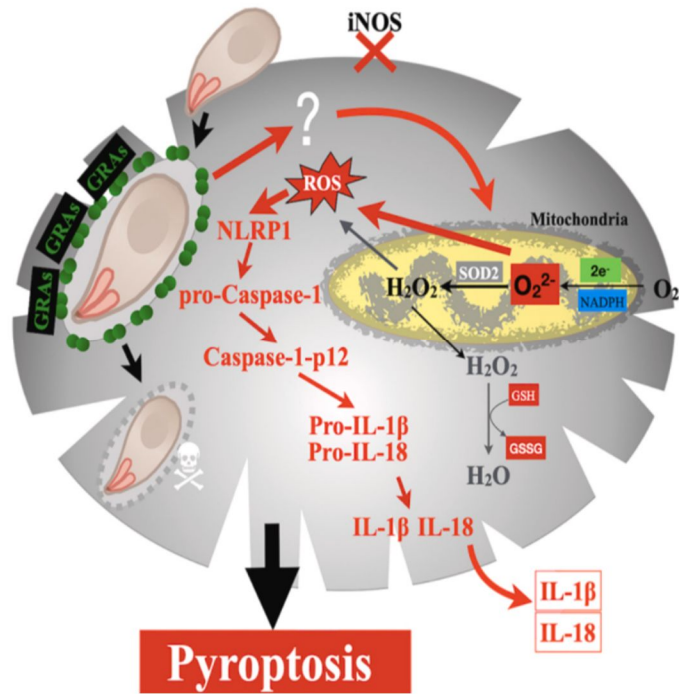


図3 iNOS 欠損ラットでのトキソプラズマ耐性機構

虫空胞膜と腹腔マクロファージのミトコンドリア膜が損傷した。また感染後数時間、高レベルの ROS がミトコンドリアのスーパーオキシドジスムターゼ 2 (SOD2) の枯渇を引き起こし、腹腔マクロファージのピロトーシスと細胞死を誘発したことを見出した。従って iNOS<sup>-/-</sup> SD ラットにおけるトキソプラズマ感染に対する完全な耐性のこの発見は、トキソプラズマ感染に対する免疫における NO と ROS の間の強い関連を示し、潜在的に新規で効果的な自然免疫システムを示していた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishiyama Saishi、Pradipta Ariel、Ma Ji Su、Sasai Miwa、Yamamoto Masahiro	4. 巻 75
2. 論文標題 T cell-derived interferon- is required for host defense to	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102049 ~ 102049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2019.102049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lee Youngae、Yamada Hiroshi、Pradipta Ariel、Ma Ji Su、Okamoto Masaaki、Nagaoka Hikaru、Takashima Eizo、Standley Daron M、Sasai Miwa、Takei Kohji、Yamamoto Masahiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Initial phospholipid-dependent Irgb6 targeting to Toxoplasma gondii vacuoles mediates host defense	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.201900549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Bando Hironori、Pradipta Ariel、Iwanaga Shiroh、Okamoto Toru、Okuzaki Daisuke、Tanaka Shun、Vega-Rodriguez Joel、Lee Youngae、Ma Ji Su、Sakaguchi Naoya、Soga Akira、Fukamoto Shinya、Sasai Miwa、Matsuura Yoshiharu、Yuda Masao、Jacobs-Lorena Marcelo、Yamamoto Masahiro	4. 巻 216
2. 論文標題 CXCR4 regulates Plasmodium development in mouse and human hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1733 ~ 1748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20182227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Bando Hironori、Lee Youngae、Sakaguchi Naoya、Pradipta Ariel、Sakamoto Ryoma、Tanaka Shun、Ma Ji Su、Sasai Miwa、Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Toxoplasma Effector GRA15-Dependent Suppression of IFN- -Induced Antiparasitic Response in Human Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2019.00140	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bando Hironori, Lee Youngae, Sakaguchi Naoya, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Cai Yihong, Liu Jianfa, Shen Jilong, Nishikawa Yoshifumi, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for Toxoplasma GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01738-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Bando Hironori, Sakaguchi Naoya, Lee Youngae, Pradipta Ariel, Ma Ji Su, Tanaka Shun, Lai De-Hua, Liu Jianfa, Lun Zhao-Rong, Nishikawa Yoshifumi, Sasai Miwa, Yamamoto Masahiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Toxoplasma Effector TgIST Targets Host ID01 to Antagonize the IFN- $\gamma$ -Induced Anti-parasitic Response in Human Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 2073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.02073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang Zhen-Jie, Yu Shao-Meng, Gao Jiang-Mei, Zhang Peng, Hide Geoff, Yamamoto Masahiro, Lai De-Hua, Lun Zhao-Rong	4. 巻 24
2. 論文標題 High resistance to Toxoplasma gondii infection in inducible nitric oxide synthase knockout rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103280 ~ 103280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masahiro Yamamoto
2. 発表標題 Targeted disruption of IFN- $\gamma$ -induced ID01-dependent anti-parasitic response in human cells by Toxoplasma effector TgIST
3. 学会等名 The 3rd Asian Congress of Protistology & 10th Asian Conference of Ciliate Biology & 2nd International Symposium on Biodiversity and Evolution of Protozoa (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	笹井 美和  (Sasai Miwa)  (30631551)	大阪大学・微生物病研究所・准教授   (14401)	
研究 分担者	馬 知秀  (Ma Jisu)  (90755266)	大阪大学・微生物病研究所・助教   (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
中国	安徽医科大学	中山大学	中国農業大学	
米国	ジョンズ・ホプキンス大学			