

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22354

研究課題名（和文）トキソプラズマ潜伏により誘導される抗ウイルス応答：原虫とウイルスの攻防を紐解く

研究課題名（英文）Antiviral response induced by Toxoplasma latency: unraveling the attack and defense between protozoa and viruses.

研究代表者

玄 学南（Xuan, Xuenan）

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：10292096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、培養細胞や実験動物を用いた原虫-ウイルス共感染実験によって、トキソプラズマ潜伏感染がウイルスの増殖や病原性に及ぼす影響を明らかにし、さらにトキソプラズマ潜伏感染細胞において抗ウイルス自然免疫シグナルのうちどの因子が活性化されているかを解明することを目的とし実験を行った。その結果、本原虫潜伏感染マウスの脳における自然免疫関連遺伝子の発現が上昇すること、ステージ変換した原虫が感染細胞におけるSTAT1のリン酸化と核内移行を誘導すること、トキソプラズマ潜伏感染マウスがウイルス感染に対して抵抗性を示すようになることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、トキソプラズマが誘導する抗ウイルス自然免疫誘導の一端を明らかにした。このように、一つの宿主をめぐって複数の病原体同士がせめぎ合う様子を明らかにすることで、実際に生体で起こっている感染症の本態を明らかにすることができると考えられる。トキソプラズマに潜伏感染した者は世界の全人口の1/3にのぼるとされており、最もありふれた原虫感染症といえる。すなわち、これまで基礎免疫学・感染症学で得られたSPFマウスへの病原体接種実験により得られた成果には、トキソプラズマのような潜伏感染病原体の影響を考慮していく必要があることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to clarify the effects of latent Toxoplasma infection on viral growth and virulence, and to elucidate which factors among the antiviral innate immune signals are activated in cells latently infected with Toxoplasma by using protozoa-virus co-infection experiments in cultured cells and laboratory animals. We conducted experiments to clarify which factors among the antiviral innate immune signals are activated in Toxoplasma latently infected cells. The results showed that the expression of innate immunity-related genes in the brains of mice latently infected with *T. gondii* increased, and stage-transformed *T. gondii* induced STAT1 phosphorylation and nuclear translocation in infected cells, and that mice latently infected with Toxoplasma became resistant to viral infection.

研究分野：獣医学

キーワード：トキソプラズマ ウイルス 免疫

## 1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) は、ネコ科動物を終宿主とし、げっ歯類をはじめとする他の哺乳動物を中間宿主とする寄生性原虫である。本原虫はヒトにも感染し、死流産の原因や免疫不全患者へ致死感染を引き起こすため人獣共通病原体としても重要である。

本原虫は中間宿主体内に経口ルートより侵入すると、まずタキゾイトと呼ばれる急速に増殖する虫体として増え、脳や筋肉に移行する。タキゾイトはこれら臓器内でブラディゾイトと呼ばれる緩慢に増殖する虫体にステージ変換し、シスト膜で包まれ休眠状態となり潜伏感染が成立する (図、Lyons *et al.*, Trends Parasitol., 2002)。休眠状態となったトキソプラズマは宿主免疫の影響を受けることなく終生寄生するが、宿主が免疫不全状態となると再活性化し、脳炎などの急性症状をもたらす。

応募者及びそのポスドク研究員であった正谷達膳博士 (現岐阜大学准教授、本研究の分担研究者) は、このステージ変換現象のメカニズムを解明する目的で、ブラディゾイト潜伏感染ヒト線維芽細胞の遺伝子発現を RNA-Seq 解析によって網羅的に解析した。その過程で、ブラディゾイト潜伏感染細胞では強い抗ウイルス活性を持つ種々の抗ウイルス自然免疫関連遺伝子 (Mx、OAS1 および ISG15 など、I 型インターフェロン (IFN) に誘導されるもの) が強く発現していることを明らかにした (第 154 回日本獣医学会学術集会、第 82 回日本寄生虫学会学術集会にて発表)。これら蛋白質はウイルス RNA 複製の阻害などに特異的に作用するとされており、トキソプラズマに対する傷害性は無いと考えられている。一方、タキゾイト感染細胞では同現象が全くみられないことから、休眠状態にあるブラディゾイトのみが宿主を抗ウイルス状態に導いていると考えられる。大変興味深いことに、上記の培養細胞・マウス実験系において、I 型 IFN の発現上昇が一切認められず、本現象の機構及び意義は不明である。

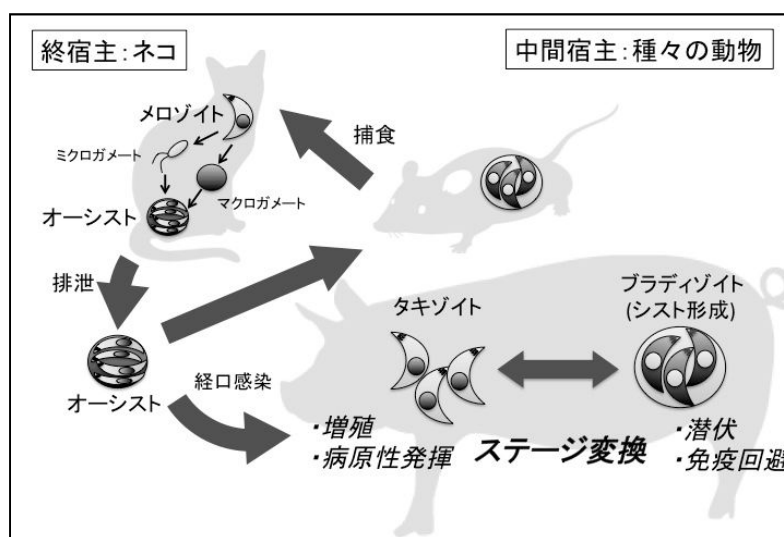


図 トキソプラズマの生活環

## 2. 研究の目的

本研究では、培養細胞や実験動物を用いた原虫-ウイルス共感染実験によって、トキソプラズマ潜伏感染がウイルスの増殖や病原性に及ぼす影響を明らかにし、さらにトキソプラズマ潜伏感染細胞において抗ウイルス自然免疫シグナルのうちどの因子が活性化されているかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 7週齢マウス(C57BL/6)にトキソプラズマ PLK 株を接種し、接種 30 日後にトキソプラズマ潜伏マウスを得た。トキソプラズマ潜伏マウスの脳における抗ウイルス自然免疫関連遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により定量した。

(2) ヒト皮膚線維芽細胞である HFF 細胞における抗ウイルス自然免疫関連転写因子 STAT1 の活性化の指標であるリン酸化および核内移行について、蛍光免疫染色法により検討した。

(3) トキソプラズマ潜伏マウスに、致死的神経病原性を示す RNA ウイルスである日本脳炎ウイルス(JEV)または DNA ウイルスである単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) を脳内接種し、病原性を解析した。

(4) CRISPR/Cas9 系を利用し、IFN レセプターノックアウトマウスまたは IFN レセプターノックアウト HFF 細胞の樹立を試みた。

### 4. 研究成果

(1) マウスにトキソプラズマを感染させ、30 日飼育することで潜伏感染マウスモデルを作出した。正常なマウスと潜伏感染マウスの脳における自然免疫関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR により検証した結果、いずれの遺伝子も潜伏感染で上昇が見られた。すなわち、これまでヒト線維芽細胞でみられた自然免疫関連遺伝子の上昇という現象が、*in vitro* だけでなくマウス脳でも起こっていることが確認できた。しかし、興味深いことに、HFF 細胞を用いた *in vitro* 解析およびマウス脳を用いた *in vivo* 解析のいずれにおいても、抗ウイルス自然免疫の上流において重要なはたらきをしめす I 型インターフェロン (IFN  $\alpha$  及び  $\beta$ ) および III 型インターフェロン (IFN  $\lambda$ ) の遺伝子発現上昇は認められなかった。

(2) HFF 細胞に PLK 株を接種翌日、培地の pH を 8.1 のものに置換し 6 日間飼育することでプラディゾイトに変換させた。一方、培地 pH を変化させない群を陰性対照とした。接種 7 日目において原虫及びリン酸化 STAT1 に対する抗体を用いた蛍光二重染色によりこれらを可視化し観察した。プラディゾイトへの変換を誘導した場合、感染細胞におけるリン酸化 STAT1 が明確に可視化され、さらにこれらの核内移行が認められた。これに対し、培地 pH を変化させない群では、感染細胞におけるリン酸化 STAT1 の染色は不明瞭であり、また核内への移行も認められなかった。なお、トキソプラズマを感染させず、pH を 8.1 に変化させただけの細胞ではリン酸化 STAT1 の染色および核内移行はみられなかった。したがって、トキソプラズマは、プラディゾイトステージにおいてのみ、何らかの方法で宿主細胞の STAT1 を活性化している可能性が示された。

(3) マウスにトキソプラズマを感染させ、30 日飼育することで潜伏感染マウスモデルを作出した。正常なマウスと潜伏感染マウスに、JEV および HSV-1 を脳内接種することで攻撃したところ、正常マウスにとって致死量のウイルス接種に対し、潜伏感染マウスは半数以上が生残した。すなわち、トキソプラズマ潜伏感染によって誘導された抗ウイルス自然免疫応答が、生体においてもウイルス感染に対する防御機能をもつことが示唆された。

(4) CRISPR/Cas9 系を利用し、I 型 IFN レセプターノックアウトマウスまたは I 型 IFN レセプターノックアウト HFF 細胞の樹立を試みた。ノックアウトマウスについては、現在作成中であり、近日中に樹立できる予定である。一方、I 型 IFN レセプターノックアウト HFF 細

胞については、本細胞へのトランスフェクション効率が良いでないため、化学的なトランスフェクション法から Nucleofector を利用した電氣的なトランスフェクション法について、検討していく予定である。

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 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Saito et al.	4. 巻 51
2. 論文標題 Releasing latent <i>Toxoplasma gondii</i> cysts from host cells to the extracellular environment induces excystation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Parasitol	6. 最初と最後の頁 999-1006
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpara.2021.04.004	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 Kidaka et al.	4. 巻 98
2. 論文標題 TSS-seq of <i>Toxoplasma gondii</i> sporozoites revealed a novel motif in stage-specific promoters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infect Genet Evol	6. 最初と最後の頁 105213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.meegid.2022.105213	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 Li J et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 PLK: gar9 live attenuated strain induces protective immunity against acute and chronic toxoplasmosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 619335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.619335	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 Konishi R et al.	4. 巻 100
2. 論文標題 Raft microdomain localized in the luminal leaflet of inner membrane complex of living <i>Toxoplasma gondii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Cell Biol	6. 最初と最後の頁 151149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejcb.2020.151149	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 Gao Y. et al.	4. 巻 82
2. 論文標題 Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant TgSRS2 for serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in cats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 1662-1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0231	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 Kurokawa et al.	4. 巻 152
2. 論文標題 Nanoscale analysis reveals no domain formation of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein SAG1 in the plasma membrane of living Toxoplasma gondii	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histchem Cell Biol	6. 最初と最後の頁 365-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00418-019-01814-3	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 Guo et al.	4. 巻 229
2. 論文標題 Characterization of strain-specific phenotypes associated with knockout of dense granule protein 9 in Toxoplasma gondii	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Biochem Parasitol	6. 最初と最後の頁 53-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molbiopara.2019.01.003	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

〔学会発表〕 計0件

〔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	正谷 達膳  (Tatsunori Masatani)  (70614072)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授    (13701)	2020年12月1日付で鹿児島大学から岐阜大学へ異動

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
---------	---------