

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658239

研究課題名(和文)トキソプラズマ原虫の潜伏を誘導する骨格筋細胞内因子の特定

研究課題名(英文)Host cell factors to induce *Toxoplasma gondii* stage-conversion

研究代表者

高島 康弘 (TAKASHIMA, YASUHIRO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：筋分化に重要とされるMyoD遺伝子を繊維芽細胞に導入したところ筋芽細胞様の細胞へと分化したが、このような細胞と通常の繊維芽細胞にトキソプラズマを感染させたところステージ転換の効率に大きな変化はなかった。このことはMyoDによる筋分化に伴う宿主細胞の変化だけでは細胞内に寄生したトキソプラズマのステージ転換を誘導するには不十分であることを示している。また宿主細胞のMAPKp38 はステージ転換の開始には関与していないものの、いったん始まったステージ転換に関わる一連の反応を推進する段階で関与していることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Statistical difference of frequency of *Toxoplasma gondii* stage-conversion in normal fibroblast and a fibroblast cell line which had been transformed with MyoD. MyoD is key molecule to induce differentiation of myoblast, in which *T. gondii* preferentially converts its stage. However, the result of this study indicates that MyoD expression is not enough to induce the stage-conversion. In contrast, it was strongly suggested that p38 MAPK related with progression of stage-conversion from tachyzoite to bradyzoite.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：潜伏 トキソプラズマ

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) はほぼ全ての哺乳類・鳥類に感染能を持つ人畜共通病原体である。妊娠中の女性が感染すると死産・流産がおこったり、児に精神遅滞、視力障害、脳性麻痺など重篤な症状をもたらしたりするなど重大な健康被害を生じる。細胞内寄生性原虫であるトキソプラズマは家畜や人に感染した後、増殖型虫体としていったん増殖するものの、免疫系によって速やかに排除される。しかしその一部は生き残り、潜伏型虫体にステージ転換して筋肉や脳に長期間持続感染する。本原虫が食肉家畜に感染しても家畜に顕著な健康障害をおこすことは稀であるが生涯にわたって筋肉などに虫体を保有する。このため潜伏感染家畜から生産された食肉からヒトへの感染が成立する。なおヒトへの感染源としては、食肉中の潜伏虫体のほうが終宿主であるネコの糞便中に排出される虫体より重要であるとされる。このように食肉家畜における本原虫の潜伏は家畜衛生上、あるいは公衆衛生上大きな問題であるがその潜伏メカニズムについては未知の部分が多い。

培養細胞系において、さまざまな人為的刺激で本原虫のステージ転換を誘導することが知られているが、それらは高温での培養や培地の pH を極端に変化させるなど生体内で起こるとは考えにくい現象である。このような刺激は、生体内における実際のステージ転換のきっかけとを必ずしも反映していないものと考えられる。

2. 研究の目的

細胞内寄生性原虫であるトキソプラズマは感染後、潜伏型虫体にステージ転換して筋肉や脳に長期間持続感染する。その潜伏メカニズムについては未知の部分が多い。とりわけ宿主細胞側の要因についてはほとんど何も分かっていない。本研究ではトキソプラズマ原虫の潜伏導入あるいは維持に必要な宿主細胞側の因子を具体的に特定することを目的とする。ひいては、なぜほとんどの細胞に感染しうるトキソプラズマ原虫が、骨格筋や神経といった特定の細胞で潜伏型にステージ転換するのかという疑問をとくきっかけを得たい。

3. 研究の方法

宿主細胞 (繊維芽細胞) を化学的に類似した 2 種類の化合物得処理したり、遺伝子を改変することで、片方の細胞では原虫が潜伏しやすく他方では潜伏しにくい状況を構築する。この際、原虫の潜伏を鋭敏に捕

らえ、かつ宿主細胞の DNA、RNA を損傷しないようにするため、活性時と潜伏時で異なった蛍光色を発する組換え原虫を用い、蛍光色の変化によって潜伏の有無を判定する。このような組換え原虫を用いれば実験手順が簡便になるばかりか、緑色蛍光を発する虫体の頻度をみることでステージ転換のスタート段階を評価することができ、個々の虫体の緑色蛍光の強度を見ることでステージ転換時の一連の反応の推進状況を見ることができる。

4. 研究成果

マウスの初代培養繊維芽細胞に筋分化に重要とされる MyoD 遺伝子を繊維芽細胞に導入したところ、導入した細胞の多くにおいて、その細胞周期が G0/G1 となった。また一部の細胞は多核で細長い筋肉繊維状になり培養液中で動いている様子が観察された。したがって遺伝子導入により不完全ながら筋肉への分化が起こったものと考えられる。筋肉細胞にトキソプラズマが感染した場合、特にストレス刺激がなくともステージ転換が起こるとする報告がある。また G1/G0 で固定された宿主細胞ではステージ転換が起こりやすいという報告もある。しかし本実験では、MyoD 遺伝子導入により「筋肉細胞様」になった宿主細胞にトキソプラズマのタキゾイトを感染させたところ、タキゾイトの分裂速度はやや低下したものの、それだけではブラディゾイトへのステージ転換は開始されなかった。このことは虫体の株によりステージ転換に必要な条件が微妙に異なることを示唆している。少なくとも本研究に用いた Type II 型 PLK 原虫においては以下のことが言える。すなわち MyoD 遺伝子発現にともなう細胞周期の停止や筋肉細胞への分化にともなう一連の宿主細胞内微小環境の変化だけでは、そこに感染した原虫のステージ転換は開始されないということである。一方、この虫体はマウス生体内においては筋肉組織で成熟した潜伏型虫体を形成することができる。今回 MyoD 遺伝子導入によって作出した「見た目は筋肉細胞であるがトキソプラズマの潜伏を許さない細胞」がトキソプラズマを潜伏させる通常の筋肉細胞と違うのか、さらに精査することでステージ転換の引き金となる因子を見つけられるかもしれない。

これまでに *in vitro* 実験系では、タキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換を誘導する手法がいくつか報告されている。しかしその多くは高い pH や高温下に感染細胞を置くといったような、生体内では起こり得ない変化を与えるものである。しかし、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) p38, p38 阻害剤によってこのようなステージ転換を誘導できることが知られている。MAPK p38 分子は多くの細

胞・組織において各種ストレス刺激に対する応答に重要な因子であり、その活性は生体内で常に変動している。すなわち MAPK p38 , p38 阻害剤によるトキソプラズマのステージ転換は、生体内の現象を反映している可能性がある。言いかえれば、宿主細胞におけるこれら分子の酵素活性レベルの変化がトキソプラズマのステージ転換のきっかけになっている可能性があるということである。そこで宿主細胞の MAPK p38 分子、とりわけ主要なアイソフォームである MAPK p38 分子に着目し、この分子がトキソプラズマ原虫のステージ転換に関与しているか否かを検証した。まず MAPK p38 を欠損した細胞にタキゾイトを感染させた。タキゾイトの増殖速度は野生型宿主細胞に感染した原虫に比べて遅かったが、ブラディゾイトは出現しなかった。このことから宿主 MAPK p38 分子の活性が恒常的に欠損しているだけではトキソプラズマのステージ転換は起こらないことが分かった。さらに MAPK p38 および p38 阻害剤の一つである SB202190 添加により MAPK p38 欠損細胞に感染したタキゾイトにおいてステージ転換の開始が確認された。その頻度は MAPK p38 を持つ細胞に感染したタキゾイトとほぼ同じであった。このことは次の2つのことを示している。一つ目は、宿主細胞において MAPK p38 の活性が失われるだけではトキソプラズマのステージ転換の十分条件にはなりえないということである。2つ目は、従来用いられてきた MAPK p38 阻害活性のある化合物による人為的なトキソプラズマのステージ転換において、化合物のターゲットとなっているのは必ずしも MAPK p38 分子ではない可能性である。この2点については、今後更なる精査が必要なものと思われる。

本研究においてはタキゾイト期には赤色蛍光を、ブラディゾイト期には緑色蛍光を発する組換え原虫を用いて研究を行った。すなわちトキソプラズマのステージ転換はその蛍光色の変化をとらえることにより検出した。本組換え原虫については、緑色蛍光の強度は Bag1 遺伝子発現レベルを反映することが明らかになっている。また Bag1 遺伝子はステージ転換の極めて早い段階で発現が始まり、ステージ転換に関わる一連の過程で次第にその発現強度が高くなっていくことが知られている。したがって本組換え原虫を用いた実験では、緑色蛍光を発する虫体の頻度をみることでステージ転換を開始した虫体の頻度を評価することができ、各々の虫体が発する緑色蛍光の強度を見ることでいったん始まったステージ転換の進行状況を見ることができ、このような点に着目して上記結果を再評価したところ、以下のことが明らかになった。すなわち MAPK p38 阻害剤の一つである SB202190 添加によるトキソプラズマのステージ転換

効率について、野生型宿主細胞に感染したトキソプラズマと MAPK p38 欠損細胞に感染したトキソプラズマの間で比較しなおした。緑色蛍光を発する虫体の頻度は両者で変化がなかったが、緑色蛍光を発した個々の虫体についてその傾向強度を比較したところ前者のほうが有意に高かった。つまり、宿主細胞が MAPK p38 分子を持っているか否かに関わらず、SB202190 添加によるトキソプラズマのステージ転換は同様に開始されるということである。対照的に、宿主細胞に MAPK p38 分子がなければ、このようにしていったん開始されたステージ転換はうまく進まず、成熟したブラディゾイトが形成されないと解釈される。

以上を総合的に解釈すると、これまで実験モデルとして使用されてきた SB202190 添加によるトキソプラズマのステージ転換のメカニズムについて、次のようなことが推察される。すなわち SB202190 は初期の段階で虫体そのものに作用するか、あるいは宿主細胞の MAPK p38 以外の分子に作用し、これが引き金となってトキソプラズマのステージ転換が開始される。しかし一連のステージ転換現象が引き続き推進され成熟した潜伏型虫体が形成されるためには SB202190 による宿主細胞 MAPK p38 の活性低下が必要になる、ということである。

トキソプラズマのタキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換は大きく分けて以下の三段階ある。

第一段階（準備段階）：
タキゾイトの増殖速度の低下。

第二段階（ステージ転換開始）：
ブラディゾイト特異的遺伝子の一部について、その発現が始まる。

第三段階（ステージ転換の進行）：
一連のブラディゾイト特異的遺伝子が発現されると共にシスト壁が形成される。

本研究により MyoD 発現による骨格筋細胞の分化は第一段階に関与するものの、第二、第三段階の現象を誘導する十分条件には（少なくとも PLK 株においては）なり得ないことが分かった。一方、宿主細胞 MAPK p38 分子は第一段階と第三段階に関与しているが、第二段階についてはあまり関係がなさそうである。

残念ながら本研究によりトキソプラズマ潜伏誘導の必要十分条件となる生命現象を特定するには至らなかった。しかし筋分化に重要な役割を果たす MyoD やストレス刺激に反応して活性レベルが変化することが知られる MAPK p38 について、トキソプラズマステージ転換のどの段階に関与しているのか知ることができた。今後、本研究で得られた情報を知識基盤として更に詳細な

検討を加えることで、ステージ転換の引き金となる因子を特定できるものと思われる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 156 回日本獣医学会

林武志、鬼頭克也、高島康弘

CD44分子を介したT. gondii感染白血球の接着

2013年9月20日～9月22日 岐阜大学

〔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

高島 康弘

(TAKASHIMA, Yasuhiro)

岐阜大学応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：