

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25460512
 研究課題名(和文)先天性トキソプラズマ症に対するex vivoパルス自己樹状細胞ワクチンの導入

 研究課題名(英文)Induction of ex vivo-pulsed self dendritic cell vaccine against congenital toxoplasmosis

 研究代表者
 青才 文江(AOSAI, Fumie)

 信州大学・医学部・委嘱講師

 研究者番号：80150316

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1、妊娠マウスのトキソプラズマ感染実験により胎児の子宮内発育不全、胎盤の樹状細胞(DC)成熟およびTh分化誘導能を解析した。
 2、末梢の未熟DCを標的とするトキソプラズマ急増虫体特異的HSP70 (T.g.HSP70) ワクチンにより、感染細胞特異的CD8+およびCD4+細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導とCTL移入による防御免疫誘導を解析した(Parasitol Int.2014;63:408)。T.g.HSP70ペプチドのヒトおよびマウスのMHC分子結合アルゴリズムを解析し、日本人86%/欧米人58%をカバーするCTLエピトープ候補ペプチドを選択しin vitro解析を進めた。

研究成果の概要(英文)：1. Toxoplasma gondii infection during pregnancy induced the intrauterine growth retardation in fetus. The influences of T. gondii infection on placenta and fetal liver were shown by analyzing their dendritic cell (DC) maturation and Th polarization.
 2. Not only CD8+ but CD4+ cytotoxic T lymphocytes (CTL) specific for T. gondii-infected cells were induced by the vaccination with a virulent tachyzoite-specific HSP70 (T.g.HSP70) gene targeting peripheral DC. Adoptive transfer experiments revealed that the vaccine-induced CTL possessed protective roles for toxoplasmosis at both acute and chronic phases of infection. CTL peptide epitopes of T.g.HSP70 which bound to murine and human MHC molecules were analyzed.

研究分野：寄生虫学 感染免疫学

キーワード：先天性トキソプラズマ症 トキソプラズマHSP70 樹状細胞ワクチン 細胞傷害性T細胞(CTL) T細胞ペプチドエピトープ

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマは典型的日和見感染病原体であるが、初感染妊婦からの経胎盤垂直感染により胎児に重篤な先天性トキソプラズマ症をきたし、欧米を中心に200例規模のmass studyが繰り返された結果、“重症先天性トキソプラズマ症”の発症リスクが最も高いのは妊娠10~24週の妊婦感染であることが明らかとなった。我々はinterferon-gamma (IFN- γ)およびmyeloid differentiation factor 88 (MyD88)がトキソプラズマ感染に対する防御免疫に必須であることを報告し、これらの欠損マウスを免疫不全モデルマウスとした感染実験から、胎盤には早期からトキソプラズマが同定されるが、胎児への感染伝播は免疫不全宿主においてさえ妊娠後期になるまではみられないことから胎盤自体に防御免疫機能があることを明らかにし、妊婦の早期診断・治療により感染を胎盤で食い止め先天性トキソプラズマ症を予防し得ることを示した。しかし、最近では生肉摂取を好む若年層が増え、国内の先天性トキソプラズマ症例は寧ろ増加しておりTORCH検査の啓蒙のみでは現状を打破できない状況がある。

我々は、熱ショックストレス蛋白HSP70が宿主に誘導される感染細胞特異的細胞傷害性T細胞(CTL)のエピトープであることを世界で最初に報告し、その後、感染宿主の死亡直前に発現が急増するトキソプラズマ由来HSP70 (T.g.HSP70)の宿主防御免疫に対する機能解析を進め、細胞性防御免疫の誘導を目的とした樹状細胞(DC)標的ワクチンの開発を目指して研究を進めている。既に皮膚の未熟DCを標的とした遺伝子銃によるin vivo T.g.HSP70 遺伝子ワクチンによりTh1型防御免疫が誘導されることを報告しており、本研究では、さらに、T.g.HSP70 DC ワクチンによるCTL誘導を解析し、MHC分子結合T.g.HSP70 ペプチドによるDC ワクチン開発に着手した。

2. 研究の目的

先天性トキソプラズマ症に対し、自己末梢血の樹状細胞(DC)を用いたex vivo ワクチンを導入する。本研究のex vivo DCワクチンは、胎児画像所見に異常のない感染妊婦、生下時は不顕性で後に症状を呈する「成長期発症型」新生児、子宮内発育不全(IUGR)により出生後の発育に障害をきたす「非感染性先天性トキソプラズマ症」新生児を対象とする。

これまでに、T.g.HSP70によるDC活性化とTh1防御免疫応答の誘導を報告しており(Cell Stress Chaperones 7: 357, 2002; Biochem Biophys Res Commun 322: 899, 2004; Cell Stress Chaperones 11: 13, 2006; Vaccine 229:1899, 2011)、本研究では、妊娠マウスの感染実験による胎盤のDC成熟およびTh分化誘導能の解析、T.g.HSP70

DC ワクチンによるCTL誘導、および、ヒトおよび感染感受性マウスのMHC分子結合 T.g.HSP70 ペプチド CTL エピトープの解析により、ex vivo DC ワクチン開発を進める。

3. 研究の方法

下記の点に焦点を絞り解析した。

1) 妊娠マウスの感染実験による胎盤のDC成熟およびTh分化誘導能の解析:

交尾翌朝にプラグを確認した雌マウスを妊娠0日(E0)とし、野生型(WT)および免疫不全マウスの妊娠7日目にトキソプラズマ深谷株10シストを経口感染させ、妊娠18日目の妊娠マウスの胎盤のDCとTh分化誘導能を解析した。非感染および感染マウスの胎盤を母体側deciduaと胎児側labyrinthに物理的に分離し、母体脾臓と胎児肝臓をコントロールとして、各臓器のCD11c⁺細胞を回収しDC成熟度をi)細胞表面MHC分子とCD40, CD80, CD86の発現量増加、および、ii) IL-12産生定量により解析した。また、各臓器のCD11c⁻陰性細胞群からCD4⁺T細胞を回収し、Th1, Th2, Th17の代表的サイトカイン(IFN- γ , IL-4, IL-17)のmRNA発現を定量解析し、感染により誘導される胎盤のTh1/Th2/Th17分化誘導能を解析した。

2) T.g.HSP70 DC ワクチンによる特異的細胞傷害性T細胞(CTL)誘導能の解析:

T.g.HSP70発現B6マウス由来DC株(DC2.4-T.g.HSP70)を樹立し、その成熟を細胞表面のMHCとCD86分子の発現増加により確認しCTL assayの標的細胞とした。

in vivo T.g.HSP70遺伝子導入DCワクチン接種1週間後のマウス脾臓細胞を用い、DC2.4-T.g.HSP70, T.g.HSP70パルスDC2.4、および、トキソプラズマRH株タキゾイト感染DC2.4細胞に対する特異的CTL誘導を解析した。次にワクチン接種マウス脾臓細胞からCD4⁺またはCD8⁺T細胞群を回収しCTLエフェクター解析を行った。

CD8⁺およびCD4⁺CTLの移入感染実験により、急性期腸管膜リンパ節内トキソプラズマ数、および、慢性期脳内シスト数解析し、CTLの防御免疫能を解析した。

CD8⁺およびCD4⁺CTLの感染細胞傷害機構(perforin/granzyme, Fas/Fas ligand)を明らかにした。

3) CTL エピトープの解析

ヒトおよびマウスMHCにおける感染細胞特異的CTLが認識するMHC分子結合T.g.HSP70 エピトープを解析した。

感染感受性C57BL/6マウスのMHCクラスI分子H-2Kb, Dbに結合する9-mer T.g.HSP70 ペプチド候補を、SYFPEITHI, ProPred, BIMAS, NetMHCpanプログラムのアルゴリズム解析により選択した。

日本人86% / 欧米人58%が有するヒトHLA-A2分子(HLA-A2402/ A0201/ A0206)に結合する9-merペプチドエピトープの候補ペプチドを選択しその結合試験を行った。

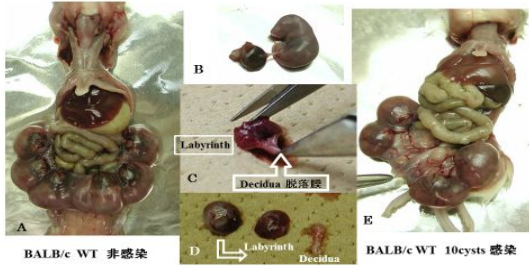
T.g.HSP70ペプチド候補を絞りex vivo ワクチンに向け解析を進めた。

4. 研究成果

1. 妊娠マウスの感染実験による胎盤の DC 成熟および Th 分化誘導能の解析:

胎盤を中心に妊娠マウスの感染実験により防御免疫の解析を進めた。非感染 WT マウス(妊娠 18 日)(図 1A)に比較し感染 WT マウス(妊娠 18 日)には**発育不全胎児**がみられる(図 1E)。子宮内から取り出した胎児と胎盤(図 1B)を分け、胎盤の脱落膜 Decidua と Labyrinth をピンセットで物理的に分離した(図 1C)(図 1D は whole placenta、胎盤 Labyrinth、胎盤 Decidua)。

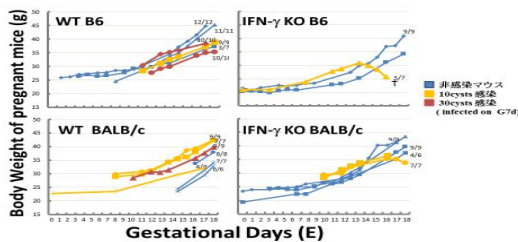
図 1 母体からの胎盤・胎児の分離



妊娠 7 日(G7d)に感染させ妊娠マウスの体重変化をみると(青:非感染、黄:10cyst 感染、赤:30cyst 感染)、WT 感染マウスは妊娠経過に伴い体重増加はあるが、妊娠後期の体重伸び率は非感染マウスに比べて少なく、WT においてもトキソプラズマ感染による胎児の子宮内発育不全 (IUGR) が示唆された(図 2)。

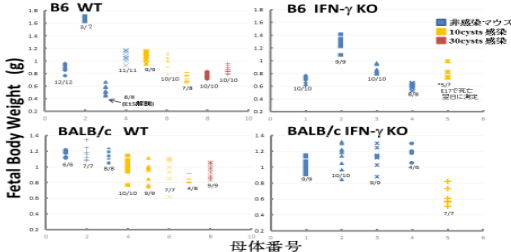
IUGR は、FN- γ 欠損マウスで特に著しく、非感染マウスの体重は妊娠 18 日まで増加し続けるのに対し、感染マウスでは妊娠 13~16 日以降、横ばい、もしくは減少し、**胎児の強い子宮内発育不全 or 死産**が示唆されこの傾向は B6 マウスでより著しい(図 2)。

図 2 妊娠マウスの体重変化



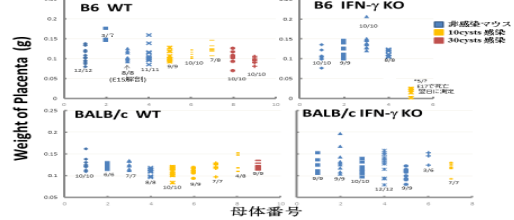
WT においても感染マウスの胎児体重(妊娠 18 日測定)は非感染マウスに比べて B6、BALB/c 共に少ない傾向があり、IFN- γ KO 感染マウスで死産を免れた胎児は更に小さい傾向にあり、トキソプラズマ感染による IUGR は、IFN- γ KO マウスでより著明であった(図 3)。

図 3 胎児体重



ところが、胎盤重量は B6、BALB/c 共に、感染、非感染マウスの間に明らかな差はみられず、また、WT、IFN- γ KO マウスの間にも差はみられず(トキソプラズマ感染数による違いもみられず)、胎児の IUGR と胎盤重量の間に相関関係が示されなかった(図 4)。

図 4 胎盤重量

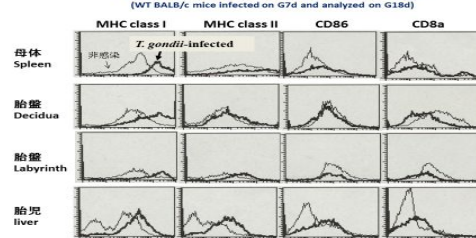


既に 1)トキソプラズマ HSP70 により樹状細胞(DC)の成熟分化が誘導されること、2)成熟 DC により引き続き naiveTh0 から Th1 への polarization が誘導されることを報告している。そこで、感染による妊娠マウスの DC と Th 分化誘導機能を解析し以下の結果を得た。

感染により母体脾臓 DC の明らかな MHC class I, II 分子の発現増加と、軽度の accessory 分子 CD86 の発現量増加がみられ、感染による DC 成熟示された(図 5)。

胎盤 Decidua と Labyrinth、胎児 liver においても MHC 分子の発現増加は明らかであるが、胎盤の CD86 の発現増加はみられず、その T 細胞活性化能は十分ではないことが示唆された。

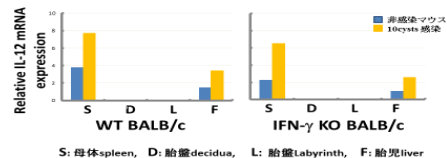
図 5 樹状細胞の成熟化



成熟 DC の内訳では、母体・胎児では lymphoid CD8a⁺DC の増加がみられたのに対し、胎盤ではこれら DC の変化はみられなかった。Plasmatoid DC(B220⁺/CD11c⁺)の存在については今後の検討課題である。

次に DC 機能を IL-12 mRNA 発現により検討した。胎盤 Decidua、Labyrinth の IL-12 産生はみられないが、母体 spleen と胎児 liver で感染による DC で IL-12 産生増加がみられ DC の機能的活性化が示された(図 6)。

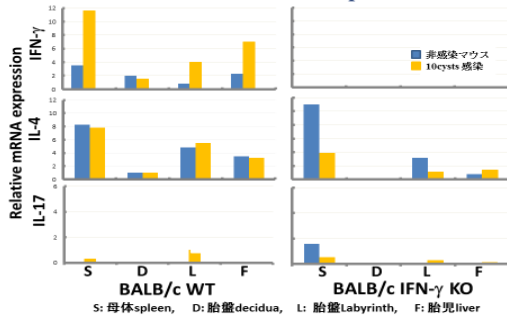
図 6 樹状細胞による IL-12 産生



CD4⁺T 細胞を分離し、Th1 Th2 Th17 の特異的サイトカインである IFN- γ 、IL-4、IL-17 の産生を比較検討した。妊娠により非感染マウスが Th2 優位に傾くことが報告されており、我々の非感染マウスも同様の傾向であった。

トキソプラズマ感染による Th 誘導については、WT マウスの母体でみられる Th1 優位の免疫応答が、胎盤や胎児においてもみられた。IL-4 産生は、WT では感染による明らかな変化がないのに対し、IFN- γ KO マウスでは減少した。感染による IL-17 産生の変化は今後の検討が必要である (図 7)。

図 7 各臓器 CD4⁺T 細胞 polarization



2) T.g.HSP70 DC ワクチンによる特異的細胞傷害性T細胞(CTL)誘導能の解析:

マウスに腹部末梢皮膚の未熟 DC を標的として T.g.HSP70 遺伝子ワクチンを行うと、ワクチン後早期 (3 日後) から所属リンパ節 DC の IL-12 産生がみられ、また、所属リンパ節 CD4⁺T 細胞の IFN- γ 産生も 5 日後には maximum に達し、DC 活性化に引き続き早期から Th1 誘導がみられることが確認され既に報告済みである (Vaccine 2011; 29:1899-905)。IFN- γ はトキソプラズマ感染に対する防御免疫に必須であり、Th1 細胞以外に CD8⁺T 細胞や NK 細胞からも産生される。また、IFN- γ 欠損マウスでも有意なワクチン効果がみられたことから、ワクチンの防御免疫誘導には IFN- γ 依存性・非依存性メカニズムの両者が関わると考えられる。

そこで本研究において、トキソプラズマ HSP70 遺伝子ワクチンによる CTL 誘導を解析し以下の結果を得た。

T.g.HSP70 遺伝子ワクチン終了後 1 週間後のマウス脾臓細胞中に、T.g.HSP70 蛋白パルス syngeneic DC 細胞株 (DC2.4) や T.g.HSP70 遺伝子導入 DC 細胞株 (DC2.4-T. gondii HSP70) を標的として特異的細胞傷害活性を示す CTL が誘導されることが判明した (図 8AB)。

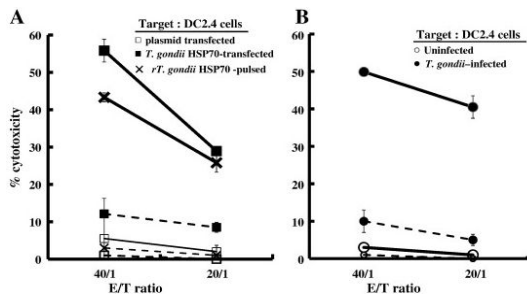


図 8

さらに、この CTL がトキソプラズマ感染 DC2.4 に対しても特異的細胞傷害活性を示すことが明らかになった (図 8C)。

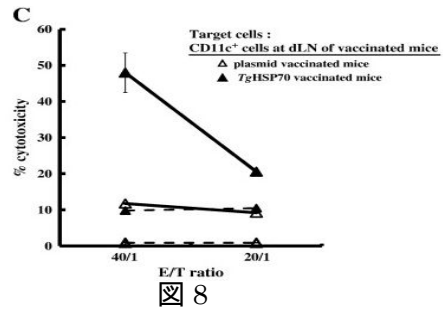


図 8

既に我々は慢性トキソプラズマ症患者の末梢血中に CD8⁺ CTL および CD4⁺ CTL の両者が誘導されることを明らかにしており、本研究により、T.g.HSP70 遺伝子ワクチンによっても D8⁺ CTL (図 9 AB) および CD4⁺ CTL (図 10 AB) の両者が誘導されることを解析した。

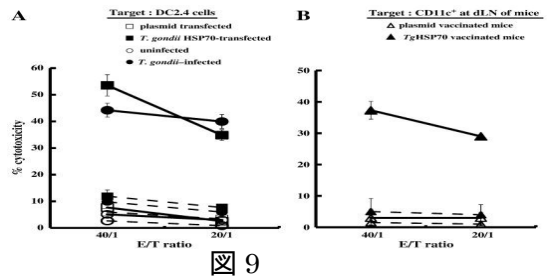


図 9

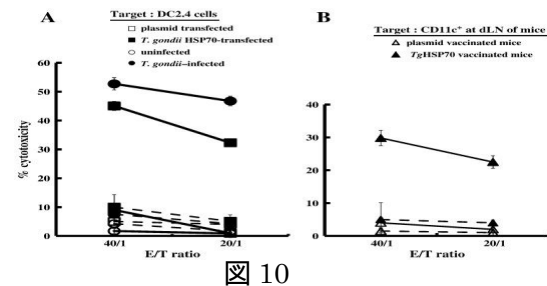


図 10

本ワクチンにより CD8⁺T 細胞からの IFN- γ 産生も増加しており、ワクチンが誘導する CD8⁺ および CD4⁺T 細胞は、共に、IFN- γ 産生と感染細胞特異的 CTL 機能によりトキソプラズマ感染に対する防御免疫を担っていることが解析された (図 11)。

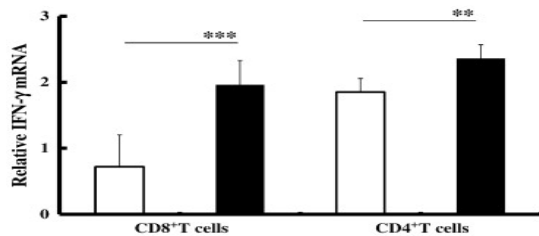
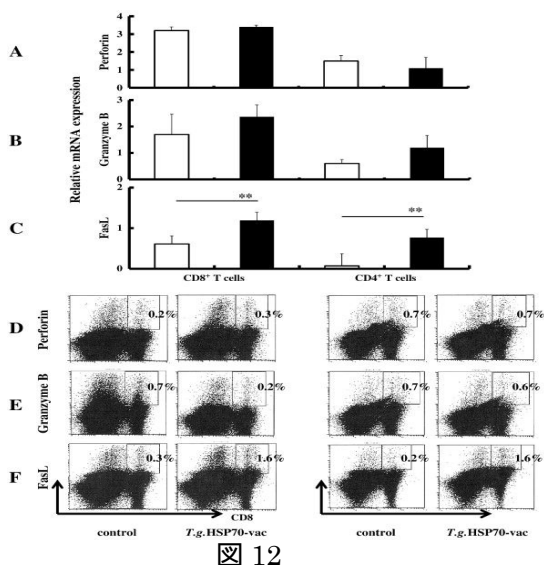
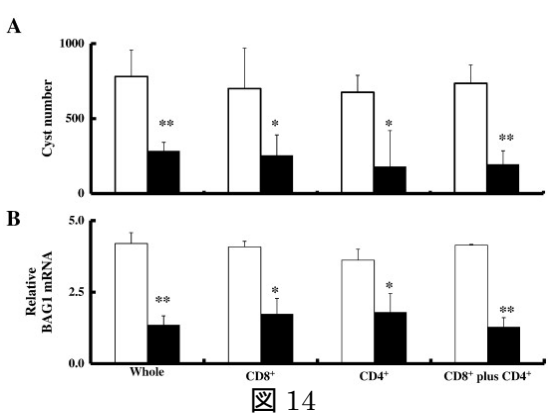
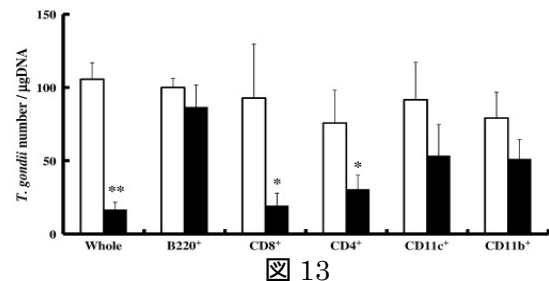


図 11 (黒: T.g.HSP70 ワクチン、白: コントロールワクチン)

CD8⁺ および CD4⁺ CTL による細胞傷害機構は、perforin/granzyme の cytotoxic granules に比し、Fas / Fas Ligand を介する傷害機構が優位であった (図 12)。



これらのCTLの移入感染実験により、感染急性期(図13)および慢性期(図14AB)における明らかな感染防御免疫が誘導されることが解析された。



(黒:T.g.HSP70 ワクチン、白:コントロールワクチン群)

3) CTL エピトープの解析

我々は、慢性トキソプラズマ症例の末梢血中に感染細胞特異的細胞傷害活性を示すCTLが存在し、CTLがHSP70をT細胞エピトープとして認識することを既に明らかにしている。上述のT.g.HSP70 DC ワクチンによるCTL誘導の結果を踏まえ、次に、CTLが認識するヒトおよびマウスのMHC分子結合T.g.HSP70ペプチドエピトープの解析を行った。

感染感受性C57BL/6マウスのMHCクラスI分子H-2Kb, Dbに対する9-mer T.g.HSP70ペプチド候補を、SYFPEITHI,

ProPred1プログラムのアルゴリズムにより選択し、これらについて、BIMASによりHalf Time of Disassociationを、NetMHCpanにより(affinity nM)を解析した。

SYFPEITHI, ProPredプログラム解析から、H-2Kbに優位に結合するペプチドは見当たらず、H-2bのMHCクラスI結合ペプチドの殆どはH-2Dbに結合することが判った(表1)。

		H-2Db			
		SYFPEITHI	ProPred1	BIMAS (revised program)	NetMHCpan (nM)
42	VAFTDTERL	18	19.9	2.9	WB (3679)
96	AGPGDKPLI	18		8.6 (4.5)	low
115	FHPPEVSAM	18		7.9 (1.0)	low (9848)
157	QATKDAGTI	16	56.7	3.1 (5.9)	low (15377)
163	GTIAGLSVL	15	24.1	7.2 (4.8)	low (5774)
166	AGLSVLRII	18		10.3 (7.6)	low (13042)
191	CGEMNVLIF	18		0.5 (0.3)	low (10095)
209	SLLTIEDGI	17		6.6 (12.9)	low (14157)
254	DISTNSRAL	20	19.9	200 (2.5)	low
315	SLLPVEKVL	14	81.4	6.6 (7.7)	low
337	VLVGGSTRI	16		6.6 (0.6)	low
374	GAAVQAAIL	15	85.4	3.1 (8.4)	low (10881)
387	SSQVQDLLL	17	281.7	3.4 (16.8)	low (6594)
388	SQVQDLLLL	19		9.5 (56.7)	WB (2189)
393	LLLLDVAPL	12	22.2	6.0 (4.3)	low (5287)
408	AGGVMTKLI	18		3.4 (2.1)	low (18097)
414	KLIERNITI	19		0.7 (0.14)	low (7203)
432	TYADNQPVG	18		11 (1.0)	low (15641)
450	AMTKDNLL	15		3.4 (19.9)	low (10351)
497	TGKSNQITI	25		85.8 (281.7)	WB (1183)
542	NGLENYCYH	18		10.3 (7.8)	low (11592)
575	AIQEALDWL	17		3.2 (2.0)	low (13339)
658	SGGPTVEEV	15		0.14 (0.7)	low (18516)

表 1

(WB : weak binder、low : very low binder)

日本人 86% / 欧米人 58% が有するヒト HLA-A2 分子 (HLA-A2402/ A0201/ A0206) に結合する 9-mer ペプチドエピトープの候補ペプチドを選択しその結合試験結果から、6 種類の *T.g.*HSP70 ペプチド候補を絞り、ex vivo ワクチンに向け解析中である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計7件)

Miyagi T, Itonaga H, Aosai F, Taguchi J, Norose K, Mochizuki K, Fujii H, Furumoto A, Ohama M, Karimata K, Yamanoha A, Taniguchi H, Sato S, Taira N, Moriuchi Y, Fukushima T, Masuzaki H, Miyazaki Y. (2015) Successful treatment of toxoplasmic encephalitis early diagnosed by a polymerase chain reaction after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: two cases reports and review of the literature. *Transplant Infect Dis.* 17: 593-8. 査読: 有

青才文江 (2015) トキソプラズマ HSP70 による樹状細胞成熟分化と防御免疫誘導最新のトピックス 信州医学雑誌 63(5):351-3. 査読: 無

Abdel-Hafeez EH, Mohamed RM, Belal US, Atiya AM, Takamoto M, Aosai F. (2015) Human wound myiasis caused by *Phormia regina* and *Sarcophaga haemorrhoidalis* in Minia Governorate, Egypt. *Parasitol Res.* 114:3703-9. 査読: 有

Chu D, Moroda M, Piao LX, Aosai F. (2014) CTL induction by DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-HSP70 gene *Parasitol Int.* 63: 408-16. 査読: 有

Sato S, Nishida M, Nasu K, Narahara H, Norose K, Aosai F. (2014) Congenital toxoplasmosis from a mother with type 2 diabetes mellitus: a case report. *J Obstet Gynaecol Res.* 40: 2158-61. 査読: 有

Mohamed RM, Abdel-Hafeez EH, Belal US, Norose K, Aosai F. (2014) Human cystic echinococcosis in the Nalut District of Western Libya: A clinico-epidemiological study. *Trop Med Health* 42: 177-84. 査読: 有

Sumi M, Aosai F, Norose K, Takeda W, Kiriwara T, Sato K, Fujikawa Y, Shimizu I, Ueki T, Hiroshima Y, Ueno M, Ichikawa N, Watanabe M, Kobayashi H. (2013) Acute exacerbation of *Toxoplasma gondii* infection after hematopoietic stem cell transplantation: five case reports among 279 recipients. *Int J Hematol* 98: 214-22. 査読: 有

[学会発表](計5件)

Aosai F, Takamoto M IL-17A deficiency downregulates protective immunity of hosts by *Toxoplasma gondii* HSP70 expression. 第44回日本免疫学会総会・学術集会 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 44 (ISSN 0919-1984) 56. 2015年11月. 札幌
光永哲也、Li Kein、Feng Xue、青才文

江、野呂瀬一美 Peyer's patches are the primary invasion sites of *Toxoplasma gondii* regardless of the host immune status. 第84回日本寄生虫学会大会抄録集 57 2015年3月21日 東京.

Chu D, Aosai F CTL induction by DNA vaccine with *Toxoplasma gondii* HSP 70 gene 第42回日本免疫学会総会・学術集会 Proceedings of the Japanese Society for Immunology 42 (ISSN 0919-1984) 209. 2013年12月13日 千葉幕張メッセ.

佐藤新平、西田正和、古川雄一、山崎靖人、奈須家栄、榎原久司、野呂瀬一美、青才文江 羊水検査で胎児感染が判明し、化学療法により重症化が予防できた先天性トキソプラズマ症不顕性感染例の1例。第83回日本感染症学会西日本地方部会 2013年11月6-8日大阪国際会議場

佐藤新平、西田正和、古川雄一、山崎靖人、奈須家栄、榎原久司、野呂瀬一美、青才文江 羊水検査で胎児感染が判明し、化学療法により重症化が予防できた先天性トキソプラズマ症不顕性感染例の1例。第70回九州連合産科婦人科学会 2013年5月18-19日 熊本市国際交流会館

[図書](計3件)

— 青才文江 (2015) 「トキソプラズマ症」感染症予防必携 第3版 日本公衆衛生協会 414-417(総ページ634頁).

— 青才文江 (2014) 「先天性トキソプラズマ症」新領域別症候群シリーズ『神経症候群』第2版 周産期障害 TORCH症候群 日本臨床社 40-44(索引別総ページ876頁).

— 青才文江 (2013) 「血液や体液中に存在する微生物 5 マラリア原虫」『微生物学・感染看護学 微生物から感染防止を考える』岡田忍・小池和子・白澤浩編 医歯薬出版株式会社 133-135(総ページ198頁).

[その他]

2014.3までのホームページ

www.m.chiba-u.ac.jp/class/infection-hostdefense

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青才文江 (AOSAI, Fumie)
信州大学・医学部・委嘱講師
研究者番号: 80150316

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし