

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850183

研究課題名(和文)トキソプラズマ潜伏感染が誘導する抗ウイルス自然免疫応答の意義

研究課題名(英文) Study on anti-viral innate immune responses induced by infection with bradyzoite stage of *Toxoplasma gondii*

研究代表者

正谷 達膳 (Masatani, Tatsunori)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：70614072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：トキソプラズマは、宿主体内に入るとブラディゾイトと呼ばれる潜伏型虫体へと変化し、休眠する。ブラディゾイトは宿主抗ウイルス蛋白質の発現を誘導することから、その意義と機構を明らかにすることを目的とした。トキソプラズマ潜伏感染マウス脳内における自然免疫関連蛋白質遺伝子のmRNA発現量は大きく増加していた。トキソプラズマ潜伏感染マウスに対してウイルスを接種した結果、トキソプラズマ非感染マウスに比べ生存率が大きく上昇した。さらに培養細胞において、トキソプラズマ潜伏感染では自然免疫関連転写因子STAT1の活性化が見られた。本研究により、トキソプラズマ潜伏感染が宿主に与える影響の一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Toxoplasma gondii differentiates to bradyzoite (Bz) stage in host. We found that expression levels of some anti-viral proteins in Bz-infected cultured cells were higher than those in uninfected and Tz-infected cells. Aim of this study is to reveal the mechanism and importance of the phenomenon. We found that expression levels of mRNA of anti-viral proteins in brain of mice with chronic infection of *T. gondii*. We also found that mice with chronic infection of *T. gondii* have resistant to virus infections. STAT1, a transcription factor of innate immunity, was activated in human fibroblast with Bz stage of *T. gondii*. Taken together, our study revealed the fascinating effect of chronic infection of *T. gondii* to host.

研究分野：獣医感染症学

キーワード：トキソプラズマ ウイルス 自然免疫 共感染

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 (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。

我々は、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自然免疫関連蛋白質遺伝子 (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見出した。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。しかし、その機構及び意義は不明である。

自然界において、トキソプラズマに感染したげっ歯類をネコ科動物が捕食することでその生活環が成立しているとされている。中間宿主が終宿主に捕食される前に感染症な

どで死亡することは、生活環を成立させるうえで障害になると考えられる。一方、これまでにトキソプラズマは感染マウスの行動を変化させてネコに捕食されやすくさせることが示されており、宿主細胞のシグナル伝達を操作していることが示唆されている。そこで我々は、「潜伏期にあるトキソプラズマは中間宿主をウイルス感染から保護するために、何らかの機構で抗ウイルス蛋白質の発現を誘導しているのではないか」という仮説を立て、本研究を実施した。

2. 研究の目的

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する。さらに分子生物学的手法によって、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明らかにする。

3. 研究の方法

(1) トキソプラズマ潜伏感染マウス脳内における宿主自然免疫関連遺伝子の発現解析
C57BL/6 及び BALB/c マウス (10 週齢メス) ヘトキソプラズマ ME49 株を 10000 個腹腔内接種した。30 日後、マウスを安楽殺したのち脳を採取した。脳より RNA を抽出し、リアルタイム PCR によって IFN- γ 、IFN-4、Mx1、OAS1 および ISG15 遺伝子発現量を測定し、非感染マウスにおける同遺伝子発現量と比較した。

(2) トキソプラズマ潜伏感染マウスに対するウイルスによる攻撃試験
C57BL/6 マウス (8 週齢メス) ヘトキソプラズマ PLK 株を腹腔内へ接種した (1000 個または 500 個)。30 日後、日本脳炎ウイルスまたは単純ヘルペスウイルスを脳内接種した。接

種後、14日間マウスの症状を観察した。

(3) トキソプラズマ潜伏感染細胞における STAT1 のリン酸化の評価

ヒト線維芽細胞である HFF 細胞にトキソプラズマ ME49 株を感染させ、翌日培地を pH8.1 のものに置換し7日間培養し、細胞内でタキゾイトからブラディゾイトに変換させた。変換後、固定し、抗ブラディゾイトマーカーまたはタキゾイトマーカー蛋白質に対する抗体と、リン酸化 STAT1 に対する抗体を用いて二重間接蛍光染色を行った。染色後、封入したのち蛍光顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) トキソプラズマ潜伏感染マウス脳内における宿主自然免疫関連遺伝子の発現解析
トキソプラズマを潜伏感染させたマウス (C57BL/6 及び BALB/c) の脳を採取し、各種 IFN および自然免疫関連蛋白質遺伝子の mRNA 発現量を測定した。その結果、自然免疫関連蛋白質である Mx1、OAS1 および ISG15 遺伝子の発現量は、両系統の潜伏感染マウスにおいて非感染に比べ 8-10 倍に上昇した。一方、これら自然免疫関連遺伝子の発現を司る I 型 IFN である IFN- γ 、IFN- β の発現量は、潜伏感染マウスと非感染マウスとの間に有意な差はみられなかった。この結果は、我々が以前実施したブラディゾイト潜伏感染ヒト線維芽細胞の遺伝子発現網羅的解析の結果と一致しており、ブラディゾイト潜伏感染によって I 型 IFN の関与しない抗ウイルス蛋白質遺伝子の発現が起こっている可能性が示された。

(2) トキソプラズマ潜伏感染マウスに対するウイルスによる攻撃試験

日本脳炎ウイルスを接種後、トキソプラズマ非感染マウスは強い神経症状を示し、9 日以内に全て死亡した。これに対し、トキソプラズマ潜伏感染マウスは日本脳炎ウイルス

に対して抵抗性を示し、500 個感染させたマウスは 27%、1000 個感染させたマウスは 75% のマウスが生残した。この結果は、トキソプラズマ潜伏感染によって宿主体内でウイルスに対する抵抗性が生じていることを示している。同様の結果を単純ヘルペスウイルスによる攻撃試験でも得ており、本現象は RNA ウイルス・DNA ウイルスに共通して起こることが示された。

(3) トキソプラズマ潜伏感染細胞における STAT1 のリン酸化の評価

間接蛍光抗体法によりトキソプラズマ潜伏感染細胞における STAT1 の局在ならびにリン酸化を評価した結果、高 pH によるブラディゾイトへの誘導を行った感染細胞では STAT1 の核内移行が認められた。一方、通常の pH のまま培養することでタキゾイトのままにした場合、感染細胞では STAT1 の核内移行が認められなかった。したがって、トキソプラズマのブラディゾイトステージ虫体は感染細胞の STAT1 を活性化することで抗ウイルス自然免疫応答を活性化させている可能性が考えられた。

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 6 件)

Matsuu A., Yokota S., Ito K., Masatani T., Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-ranging and feral domestic cats on Amami Oshima Island, Japan, J. Vet. Med. Sci., 査読あり、79(11)、2017、1853-1856

正谷達膳、トキソプラズマ症、鹿児島県獣医師会会報、査読なし、第 59 号、2017、1-3.

Masatani T., Takashima Y., Takasu M., Matsuu A., Amaya T., Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibody in domestic horses in Japan, *Parasitol. Int.*, 査読あり、65(2)、2016、146-150

正谷達膳、原虫病学とウイルス学の融合の研究、*獣医寄生虫学会誌*、査読なし、第14巻 第1号、2015、p31-38.

Sugi T., Masatani T., Murakoshi F., Kawazu S., Kato K., Microplate assay for screening *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation with DUAL luciferase assay, *Anal. Biochem.*, 査読あり、464、2015、9-11

Kamyngkird K., Goo YK., Cao S., Adjou Moumouni PK., Aboge GO., Yamagishi J., Terkawi MA., Masatani T., Yu L., Nishikawa Y., Xuan X., Cloning and characterization of aspartic protease 3 of *Toxoplasma gondii*, *J. Protozool. Res.*, 査読あり、24、2014、18-25

〔学会発表〕(計 4 件)

正谷達膳、トキソプラズマのお話、第5回ポルナウイルス研究会、2016、鹿児島県鹿児島市

正谷達膳、山岸潤也、玄学南、細胞内寄生原虫トキソプラズマが誘導する自然免疫応答とその抗ウイルス効果、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014、神奈川県横浜市

正谷達膳、山岸潤也、玄学南、トキソプラズマ潜伏感染が誘導する宿主抗ウイルス自然免疫応答とその意義、第157回日本獣医学会学術集会、2014、北海道札幌市

Masatani T.、 Yamagishi J.、 Xuan X.、 Anti-viral innate immune responses induced by infection with bradyzoite, 13th International Congress of Parasitology (ICOPA XIII), 2014、メキシコシティ

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：抗原虫薬のスクリーニング方法及び組換えトキソプラズマ株

発明者：加藤健太郎、杉達紀、正谷達膳

権利者：国立大学法人帯広畜産大学、国立大学法人鹿児島大学

種類：特許

番号：特願 2014-109262

出願年月日：2014年5月27日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

正谷 達膳 (MASATANI, Tatsunori)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

(平成29年3月まで特任助教)

研究者番号：70614072