

# 人獣共通感染性原虫の寄生メカニズムに関する研究

伴戸 寛徳 (東北大学大学院農学研究科)

hironori.bando.d4@tohoku.ac.jp

トキソプラズマは、ヒトや畜産動物などを含むほぼ全ての温血動物に感染することが可能な人獣共通感染性の原虫である。ヒトや動物の母体にトキソプラズマが感染すると、胎児の胎内死亡や流産など重篤な症状が引き起こされるため、農畜産業にも多大な経済的被害をもたらしている。しかしながら、トキソプラズマの寄生メカニズムに関しては未だ不明な点が多く、有効な予防薬や根治薬の開発には至っていない。そこで我々は、新規創薬に向けた研究基盤の構築を目指して、宿主-トキソプラズマ間相互作用の解明を進めてきた。

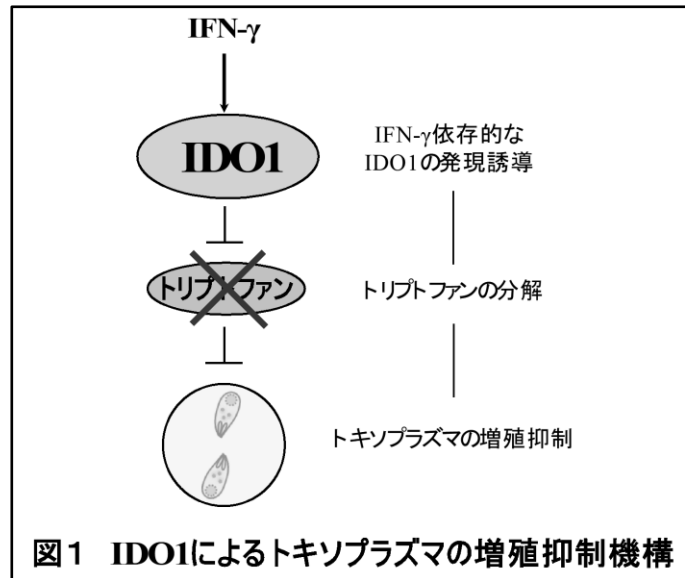
## はじめに

原虫による感染症は農畜産業に多大な経済的損失をもたらすものが多く、原虫感染に起因する世界の経済的損失は、年間 15 兆円以上とも試算されている。また、原虫感染症の一つであるトキソプラズマ症は、畜産動物にも流産や死産を引き起こすことから経済損失が大きく、家畜伝染病予防法により届出が義務づけられている重要な人獣共通感染症である。トキソプラズマの主な感染経路は、終宿主である猫の糞便に排出されたオーシストが経口感染することや、トキソプラズマに汚染された肉を加熱不完全な状態で摂取することが原因である。そのため、トキソプラズマ症は食品由来感染症の一つとしても知られている。近年、多様な生物の生活空間の重なり増加に伴い、全ての生物にとってトキソプラズマの感染リスクは高まっている。実際に、ヒトや畜産動物への感染源ともなる野生動物のトキソプラズマ保有率が増加していることが明らかになっている<sup>1</sup>。このように、トキソプラズマ症は医学・獣医学・農畜産学分野において重要視されているにも関わらず、未だ有効な予防薬や根治薬の開発には至っていない<sup>2</sup>。そこで我々は、「宿主免疫によるトキソプラズマの排除機構」と「トキソプラズマの病原性因子による宿主免疫の制御機構」、つまり、「宿主側」と「原虫側」の双方向のアプローチから“寄生メカニズム”を解明することで、新規創薬に向けた研究基盤を構築することを目的として研究を進めてきた<sup>3,4</sup>。

## 宿主免疫によるトキソプラズマの排除機構の解明

まず、トキソプラズマの寄生メカニズムの解明に向けた「宿主側」からのアプローチとして、炎症性サイトカインの一種であるインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) に着目したトキソプラズマの排除機構の解明を行なった。宿主の細胞内に感染したトキソプラズマの排除には、IFN- $\gamma$  依存的な宿主免疫応答が重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、IFN- $\gamma$  が直接的にトキソプラズマを攻撃するわけではなく、宿主細胞膜表面のレセプターと IFN- $\gamma$  が結合することで、2000 種類以上の IFN- $\gamma$  誘導性遺伝子群 (IFN-stimulated genes : ISGs) が発現し、その結果産生された何らかの分子がトキソプラズマの排除に重要な役割を果たしている。したがって、IFN- $\gamma$  依存的な抗トキソプラズマ応答に重要な宿主分子の特定とその作用機序の解明が、現在も世界中で進められている。これまで我々は、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を利用して様々な遺伝子組換え生物や細胞、原虫を作出しており<sup>5-8</sup>、これらを利用して研究を進めることでマウスの細胞内で IFN- $\gamma$  依存的な抗トキシ

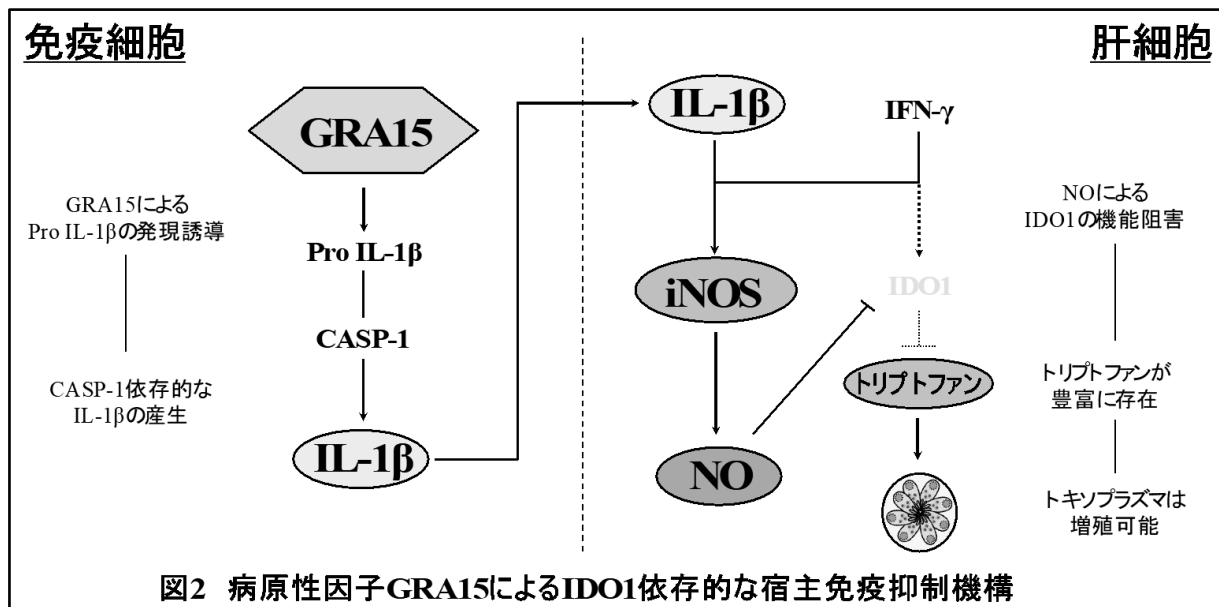
プラズマ応答に関わる分子として、p65 GTP 分解酵素 (p65 guanylate-binding protein: GBP) や免疫関連 GTPase タンパク質 (Immunity related GTPase: IRG) などを同定してきた<sup>9-14)</sup>。そして近年、マウス以外の哺乳動物細胞として多種多様な細胞が利用できるヒトの細胞内における宿主-トキソプラズマ間相互作用に着目して研究を進めたところ、新規の抗トキソプラズマ応答を発見した。まず我々は、様々な臓器由来のヒトの細胞を用いて多様な ISGs を欠損した細胞を作成し、各々の遺伝子が IFN- $\gamma$  依存的な抗トキソプラズマ応答に及ぼす影響を解析した。その結果、トリプトファン分解酵素の一つであるインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ 1 (Indoleamine 2, 3-Dioxygenase 1: IDO1) を欠損した細胞では、IFN- $\gamma$  依存的な抗トキソプラズマ応答が著しく低下することを発見した。そこで、IDO1 依存的な抗トキソプラズマ応答の作用機序の解析を進めた結果、トキソプラズマの増殖に必須の栄養素の一つであるトリプトファンを、IFN- $\gamma$  依存的に産生される IDO1 によって分解することが、トキソプラズマの増殖抑制に重要な役割を果たしていることが明らかになった (図1)<sup>15)</sup>。



### 病原性因子GRA15によるIDO1依存的な宿主免疫応答抑制機構の解明

トキソプラズマは、デンスグラニュールと呼ばれる細胞内小器官から放出されるGRAタンパク質群 (dense granule protein: GRAs) や、ロプトリーと呼ばれる分泌器官から放出されるROPタンパク質群 (rhoptry organelle proteins: ROPs) などの病原性因子を用いて宿主の免疫を制御している。そこで現在、各々の病原性因子の機能や標的とする宿主分子に関する研究が世界中で進められ徐々に明らかになってきているが、未だに分子メカニズムやその生物学的意義が不明なものも残されている。トキソプラズマの病原性因子GRA15は、その中の一つである。これまでに、GRA15は宿主細胞内の核内因子 $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B: NF- $\kappa$ B) を活性化する機能を持つことが明らかにされているが、NF- $\kappa$ Bは免疫反応において中心的役割を果たす転写因子であり、様々な自然免疫応答を誘導することが知られている。病原性因子は本来、宿主免疫を“抑制”する機能を持つことが多いが、GRA15は宿主免疫を“活性化”させるという真逆の機能を持っており、実際に、GRA15を欠損したトキソプラズマは野生型のトキソプラズマよりもむしろ、マウスに対して高い病原性を示すことが明らかになっている。こうして、トキソプラズマがGRA15を分泌することの生物学的意義は長い間不明のままであった。そこで、我々が新規に同定した抗トキソプラズマ分子であるIDO1の機能にGRA15が及ぼす影響について検討した。我々はこれまでに、宿主に感染したトキソプラズマが自然免疫細胞に潜伏感染して全身へ広がっていく、トキソプラズマの「トロイの木馬」現象を明らかにしている<sup>16)</sup>。したがって本研究ではまず、トロイの木馬現象を再現した実験系として、トキソプラズマを感染させた免疫細胞と多様な臓器由来の細胞を共培養する感染実験系を構築した。そして、共培養した環境内における相互作用の解析を進めた。これまでに我々は、免疫細胞と25種類の細胞を用いた共培養系を構築しているが<sup>17)</sup>、本講演ではトキソプラズマが感染しやすい臓器の一つである肝臓に焦点

を当てる。こうして、トキソプラズマを感染させた免疫細胞と肝細胞の共培養系において、肝細胞内におけるIFN- $\gamma$ 依存的な抗トキソプラズマ応答にGRA15が及ぼす影響を検討した。その結果、トキソプラズマが感染した免疫細胞からは、GRA15依存的に炎症性サイトカインの一種であるインターロイキン1ベータ前駆体 (pro interleukin-1beta: pro IL-1 $\beta$ )の発現が誘導され、システインプロテアーゼの一種であるカスパーゼ1 (caspase-1: CASP-1) 依存的にIL-1 $\beta$ が産生されることが明らかになった。さらに、GRA15依存的に産生されたIL-1 $\beta$ が肝細胞に作用することで、肝細胞内におけるIFN- $\gamma$ 依存的な抗トキソプラズマ応答が抑制されることを発見した。そこで次に、その抑制機構の解明を進めたところ、IL-1 $\beta$ とIFN- $\gamma$ が肝細胞に作用すると、肝細胞内で一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) 依存的に一酸化窒素 (nitric oxide: NO) が産生され、NOがIDO1の機能を転写・翻訳・酵素活性レベルで強力に阻害していることが明らかになった (図2)。さらに、iNOS阻害剤を肝細胞に作用させると、GRA15依存的なトキソプラズマの感染拡大を抑制できることも明らかにした。このようにしてトキソプラズマは、GRA15を免疫細胞内に分泌することで宿主の免疫機能を制御して、次に感染する細胞内での抗トキソプラズマ応答を抑制するという寄生メカニズムを持っていることが明らかになった<sup>18)</sup>。



## おわりに

本研究は、哺乳動物細胞における抗トキソプラズマ宿主免疫応答に重要な分子の一つとしてIDO1を同定し、さらに、トキソプラズマの病原性因子GRA15がIDO1依存的な宿主免疫応答の抑制に重要な役割を果たしていることを解明した。今後は、豚・牛・山羊などの畜産動物由来の細胞を用いてトキソプラズマの寄生メカニズムの解明を進め、これらの研究成果をトキソプラズマ症に対する新規創薬開発につなげることで、農畜産業およびその関連産業の発展のために重要な人獣共通感染症の制圧に貢献していきたい。

## 謝辞

本研究は、大阪大学微生物病研究所感染病態分野と、東北大学大学院農学研究科動物環境システム学分野にて行われたものです。本研究の遂行にあたり、多大なるご指導を賜りました山本雅裕教

授および加藤健太郎教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を実施する上でご支援賜りました研究室関係者の皆様、共同研究者の皆様に深く感謝致します。また、本賞の受賞にあたり、公益社団法人日本獣医学会から推薦を賜りました。久和茂理事長をはじめ関係の諸先生方および事務局の皆様にご心より感謝申し上げます。

## 文献

1. **Bando H**, Yoshimura A, Koketsu M, Soga A, Taniguchi Y, Ozaki M, Suzuki M, Kanuka H, Fukumoto S. *J Protozool Res* 25:1-2 (2015).
2. Murakoshi F, **Bando H**, Sugi T, Adeyemi OS, Nonaka M, Nakaya T, Kato K. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 14:159-166. (2020)
3. **Bando H**, Fukuda Y, Yamamoto M, Kato K. *JIFS*. vol.17, 22-25. (2020)
4. **Bando H**, Fukuda Y, Yamamoto M, Kato K. *JIFS*. vol.18, 13-17 (2021)
5. **Bando H**, Okado K, Guelbeogo WM, Badolo A, Aonuma H, Nelson B, Fukumoto S, Xuan X, Sagnon N, Kanuka H. *Sci Rep*. 3:1641 (2013).
6. Soga A, **Bando H**, Ko-Ketsu M, Masuda-Suganuma H, Kawazu SI, Fukumoto S. *Sci Rep*. 7:4001 (2017).
7. **Bando H**, Pradipta A, Iwanaga S, Okamoto T, Okuzaki D, Tanaka S, Vega-Rodriguez J, Lee Y, Ma JS, Sakaguchi N, Soga A, Fukumoto S, Sasai M, Matsuura Y, Yuda M, Jacobs-Lorena M, Yamamoto M. *J Exp Med*. 216:8 (2019).
8. Pradipta A, **Bando H**, Ma JS, Tanaka S, Sasai M, Yamamoto M. *Parasitol Int*. 83:102335. (2021)
9. Lee Y, Sasai M, Ma JS, Sakaguchi N, Ohshima J, **Bando H**, Saitoh T, Akira S, Yamamoto M. *Cell Rep*. 13:223-233 (2015)
10. Ohshima J, Sasai M, Liu J, Yamashita K, Ma JS, Lee Y, **Bando H**, Howard JC, Ebisu S, Hayashi M, Takeda K, Standley DM, Frickel EM, Yamamoto M. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112:E4581-4590 (2015).
11. Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, **Bando H**, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley DM, Yoshimori T, Yamamoto M. *Nat Immunol*. 18:899-910 (2017)
12. Fisch D, **Bando H**, Clough B, Hornung V, Yamamoto M, Shenoy AR, Frickel EM. *EMBO J*. 38(13):e100926. (2019)
13. Fisch D, Clough B, Domart MC, Encheva V, **Bando H**, Snijders AP, Collinson LM, Yamamoto M, Shenoy AR, Frickel EM. *Cell Rep*. 32(6) (2020)
14. Sakaguchi N, Sasai M, **Bando H (Equal-contribution)**, Lee Y, Pradipta A, Ma JS, Yamamoto M. *Front Immunol*. 11:561948. (2020)
15. **Bando H**, Sakaguchi N, Lee Y, Pradipta A, Ma JS, Tanaka S, Lai DH, Liu J, Lun ZR, Nishikawa Y, Sasai M, Yamamoto M. *Front Immunol*. 9:2073 (2018)
16. Ma JS, Sasai M, Ohshima J, Lee Y, **Bando H**, Takeda K, Yamamoto M. *J Exp Med*. 211:2013-32 (2014).
17. **Bando H**, Lee Y, Sakaguchi N, Pradipta A, Sakamoto R, Tanaka S, Ma JS, Sasai M, Yamamoto M. *Front Cell Infect Microbiol*. 10:3389 (2019)
18. **Bando H**, Lee Y, Sakaguchi N, Pradipta A, Ma JS, Tanaka S, Cai Y, Liu J, Shen J, Nishikawa Y, Sasai M, Yamamoto M. *MBio*. 9:5 (2018).