

寄生虫「トキソプラズマ」は、どのように宿主の身体を乗っ取るか？

—高病原性因子 GRA6 が「トロイの木馬」現象を引き起こす—

❖ 概要

免疫学フロンティア研究センターの山本雅裕教授(大阪大学微生物病研究所兼任)らの研究グループは、寄生虫「トキソプラズマ」の病原性因子 GRA6 が宿主の免疫制御分子である NFAT4 を活性化して宿主自然免疫細胞を強制的に利用(ハイジャック)することが、トキソプラズマ症の重症化の一つの理由であることをつきとめました。

❖ 研究の背景

トキソプラズマは寄生虫の一種で、エイズや抗癌剤治療下にある免疫不全患者に致死性の脳症や心筋炎を引き起こします。十分加熱されていない肉(レアのステーキや生ハムでも)から感染する以外に猫のふんから感染することも確認されています。妊婦が感染すると流産、新生児の水頭症など先天性疾患の原因になり、わが国でも報告が増加していますが、トキソプラズマが持つどの病原性因子が局所から全身性の感染拡大に関与するかは全く不明でした。

❖ 本研究で分かったこと

1. トキソプラズマが宿主細胞内に分泌する GRA6 が宿主重要転写因子である NFAT4 を非常に強く活性化させる能力を有すること
2. GRA6 によって活性化された NFAT4 が、強力な免疫細胞遊走能を有するケモカインを感染局所でさらに誘導し、免疫細胞である好中球が感染局所に呼び寄せられ、トキソプラズマがその好中球に感染すること
3. 好中球をまるで「トロイの木馬」のように利用して、トキソプラズマが局所から全身性に感染拡大していること

本研究成果は、近年我が国においても症例報告が急増しているトキソプラズマ症に対して、特に感染初期には宿主転写因子 NFAT4 の活性化経路を阻害する薬剤を使用して全身性への感染拡大を阻止し、トキソプラズマ症の発病を食い止める新たな分子標的治療戦略を提供できるものとして大いに期待できます。

❖ 掲載論文・雑誌

Ji Su Ma, Miwa Sasai, Jun Ohshima, Youngae Lee, Hironori Bando, Kiyoshi Takeda, and Masahiro Yamamoto.

Selective and strain-specific NFAT4 activation by the *Toxoplasma gondii* polymorphic dense granule protein GRA6

The Journal of Experimental Medicine (JEM)

2014年9月16日(火)午前1時 オンライン掲載 (米国・東部時間: 9月15日正午)

解説

背景

寄生虫「トキソプラズマ」は、ヒトの日和見病原体です(図1)。全世界人口の3分の1が感染しており、我が国においても数千万人が感染していると試算されています。トキソプラズマの感染は健常人では問題ないのですが、エイズ患者や抗癌剤投与下にある免疫不全者では致死性の脳症や肺炎、心筋炎を主症状とする後天性トキソプラズマ症を発症します。また臓器移植患者においては拒絶を防ぐために免疫抑制剤を投与する必要がありますが、トキソプラズマに感染した臓器を移植されることにより、トキソプラズマ症を発症するケースも海外では多数報告されています。さらに日本ではユッケや生レバーなどの非加熱(加熱不十分)の肉を食することによる食中毒が最近問題となっていますが、トキソプラズマに汚染した非加熱肉を妊娠初期の妊婦が食することにより、トキソプラズマが胎児に感染し、流産を引き起こすあるいは新生児がトキソプラズマに感染した状態で生まれ、水頭症や目の異常(網脈絡膜炎)を主症状とする先天性トキソプラズマ症を発病するケースがマスコミ等で取上げられています。(詳しくは、先天性トキソプラズマ&サイトメガロウイルス患者会「トーチの会」のホームページ <http://toxco-cmv.org/> を参照してください。) 以上のように、日本では病原性寄生虫「トキソプラズマ」に対する社会的注目が集まりつつあります。

ヒトや家畜への感染経路については、上記のようにトキソプラズマ汚染肉の経口摂取、または終宿主であるネコの糞便中にある非常に感染力の強いトキソプラズマ虫体に汚染した水や感染したネコが存在する環境でのガーデニングにより得られた生野菜を洗浄不十分で飲食することがほとんどです。口から入ったトキソプラズマは腸管に達した後に感染局所である腸管の上皮から、全身性に感染が拡大していくことが古くから知られており、感染局所から全身に広がる際にマクロファージや樹状細胞、好中球といった宿主の自然免疫細胞にトキソプラズマが潜伏感染することが重要であることが最近、示唆されています。トキソプラズマにとっては、自然免疫細胞に潜伏感染して表面に出ないことにより宿主免疫系の監視網から逃れられる点が有利であり、病原体によって利用される自然免疫細胞が、まるでギリシャ神話に登場する「トロイの木馬」のようであることから、この一連の現象は、『トキソプラズマ「トロイの木馬」現象』と呼ばれています。しかし、感染局所でトキソプラズマが「トロイの木馬」である宿主自然免疫細胞に効率よく感染できるその分子メカニズムやそれに関する病原体側因子については、ほとんど分かっていませんでした。

研究の手法と成果

研究グループは、トキソプラズマが感染細胞中に濃縮顆粒(デンスグラニュール)から分泌する分子群(GRAファミリータンパク質群)に着目しました(図1、図2)。まずGRAタンパク質を個別に哺乳動物細胞内で強制的に発現させ、どのような宿主転写因子活性化経路が反応するかを検討しました。その結果、GRAファミリータンパク質群の中でGRA6が宿主転写因子であるNFAT依存的なレポーターを非常に強く活性化することを見出しました(図2A)。次に、NFAT1からNFAT5まで5種類存在するNFATの中でどのNFATを活性化するのかがどうかを検討した結果、NFAT4の発現した哺乳動物細胞ではGRA6過剰発現によるNFAT依存性レポーターの活性化が低下したことから、GRA6はNFAT4を選択的に活性化することを同定しました(図2B)。またGRA6を欠損するトキソプラズマを相同組み換えによるジーンターゲティング法により作成し、トキソプラズマ感染による細胞でのNFAT4の活性化がGRA6に依存しているかを検討した結果、GRA6欠損トキソプラズマ感染ではNFAT4の核移行(NFAT4の活性化の指標)が認められなかったことから、寄生虫感染という生理的条件下においてもGRA6がNFAT4を活性化する重要な因子であることが突き止めました(図2C)。

では、GRA6 はトキソプラズマ感染における病原性にどのような役割を持っているのでしょうか？それを検討するために、野生型トキソプラズマと GRA6 欠損トキソプラズマをマウスの足蹠(そくせき;footpad)に感染させ、生体イメージング法によりマウスの全身への感染拡大を比較検討しました。その結果、野生型トキソプラズマに比べて GRA6 欠損トキソプラズマは足蹠からの感染拡大が遅延していました(図3A)。さらに GRA6 欠損トキソプラズマ感染マウス群の生存期間は野生型トキソプラズマ感染マウス群よりも有意に延長していたことから、GRA6 は感染局所から全身への感染拡大に重要な役割を果たす病原性因子であることが分かりました(図3B)。

次に感染局所である足蹠で野生型トキソプラズマが病原性因子 GRA6 を介して宿主転写因子 NFAT4 を活性化する理由について検討してみました。まず野生型トキソプラズマが感染した膝のリンパ節では、トキソプラズマに感染している細胞のうち、50%以上の細胞が CD11b 陽性の自然免疫細胞でした。また野生型トキソプラズマが感染した足蹠においては自然免疫細胞である好中球(CD11b 陽性 Ly6G 陽性細胞)が多数存在していましたが、GRA6 欠損トキソプラズマが感染した足蹠では好中球の数が顕著に減少していました。さらに野生型トキソプラズマが感染した足蹠に比べて、GRA6 欠損トキソプラズマが感染した足蹠では非常に強い好中球遊走能を有する液性因子であるケモカイン(Cxcl2 や Ccl2)の発現レベルが低いことが判明しました。

最後に、GRA6 依存的な足蹠への好中球の遊走と好中球遊走ケモカイン群の発現が NFAT4 に依存しているかどうかを検討する目的で、NFAT4 欠損マウスを CRISPR/Cas9 ヌクレアーゼを使用したゲノム編集法により作製し、野生型トキソプラズマを感染させました。その結果、野生型マウスにおいて認められたトキソプラズマ感染による足蹠への好中球への遊走とケモカイン群(Cxcl2 と Ccl2)の発現が、NFAT4 欠損マウス群においては有意に低下していました(図4A,図4B)。さらに NFAT4 欠損マウスは野生型トキソプラズマ感染に対して、野生型マウスに比べて、有意に生存期間が延びました(図4C)。これは、GRA6 欠損トキソプラズマを野生型マウスに感染させた時に認められる生存期間の延長と非常に良く似ています。

さらに、トキソプラズマには高病原性のものと低病原性のものが存在しますが、高病原性のトキソプラズマが有する GRA6 は、低病原性トキソプラズマの GRA6 に比べて NFAT4 の活性化が強いことも見出しました。

以上のことから、本研究において、高病原性トキソプラズマは病原性因子 GRA6 を使い、宿主の転写因子 NFAT4 を強制的に活性化してケモカイン群を誘導し、感染局所に「トロイの木馬」となる好中球を遊走させ、それに感染することによって全身に感染拡大していくことが明らかとなりました(図5)。

今後の期待

本研究では、トキソプラズマが宿主細胞内に分泌する病原性因子 GRA6 を使用して、宿主免疫機構を「ハイジャック」することにより病原性を最大化するメカニズムを解明したのと同時に、宿主因子 NFAT4 の活性化がトキソプラズマの病原性発揮に重要であることを示しました。この点に関して、転写因子 NFAT4 を含め NFAT の活性化を阻害する薬剤は、すでに別の用途で治療薬として広く世の中で使用されています。従って、トキソプラズマの感染初期において、全身性にトキソプラズマの伝播を阻止する目的で NFAT 活性化阻害薬が使用されることにより、トキソプラズマ症の発病を食い止める新規の治療・予防戦略を提供できることが期待されます。

参考図

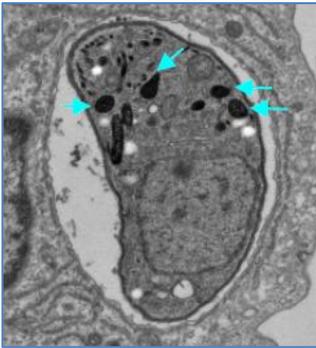


図1 トキソプラズマの電子顕微鏡写真

宿主の細胞の中に感染しているトキソプラズマの電子顕微鏡写真。矢印の「デンスグラニュール（濃縮顆粒）」から GRA タンパク質が宿主細胞質に分泌される。

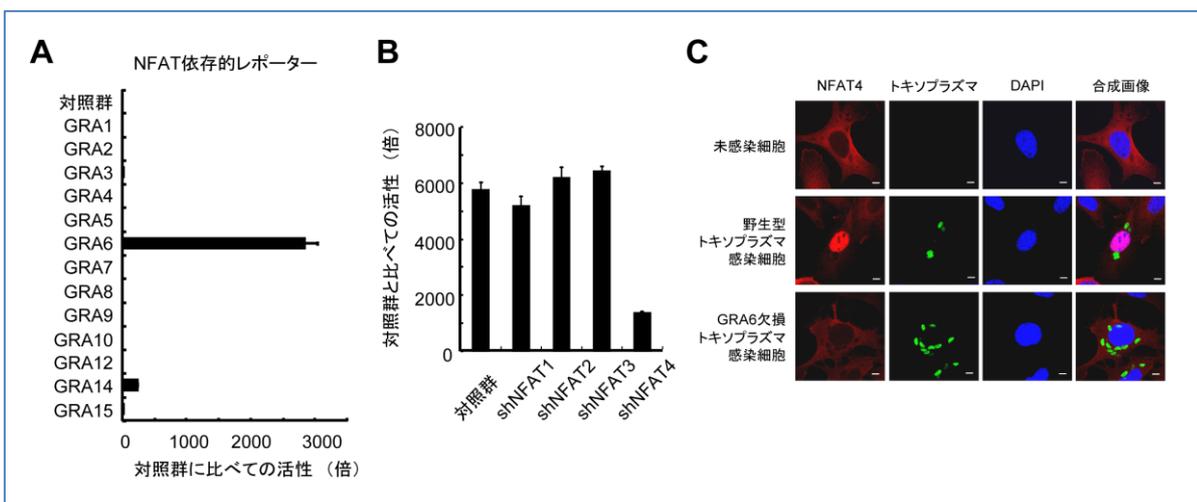


図2 GRA6 依存的に NFAT4 が選択的に活性化する

(A) GRA ファミリータンパク質の中で GRA6 が特に NFAT 依存的レポーターを活性化する。(B) NFAT4 の発現が低下した細胞では GRA6 による NFAT 依存的レポーターの活性化が低下する。(C) 野生型トキソプラズマ感染で見られる NFAT4 の核移行(赤と青のシグナルの位置に着目)が、GRA6 欠損トキソプラズマ感染ではみられない。

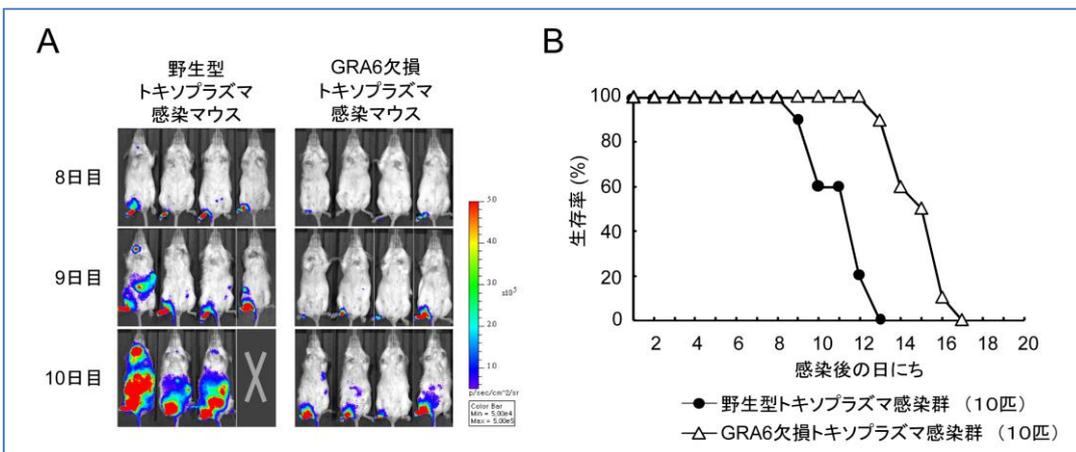


図3 病原因子 GRA6 はトキソプラズマが、感染局所から全身性に感染拡大するのに重要である

(A) 野生型トキソプラズマは、GRA6 欠損トキソプラズマよりも感染の左足からの感染拡大が速い。(B) 野生型トキソプラズマ感染群よりも、GRA6 欠損トキソプラズマ感染群の生存期間が長くなる。

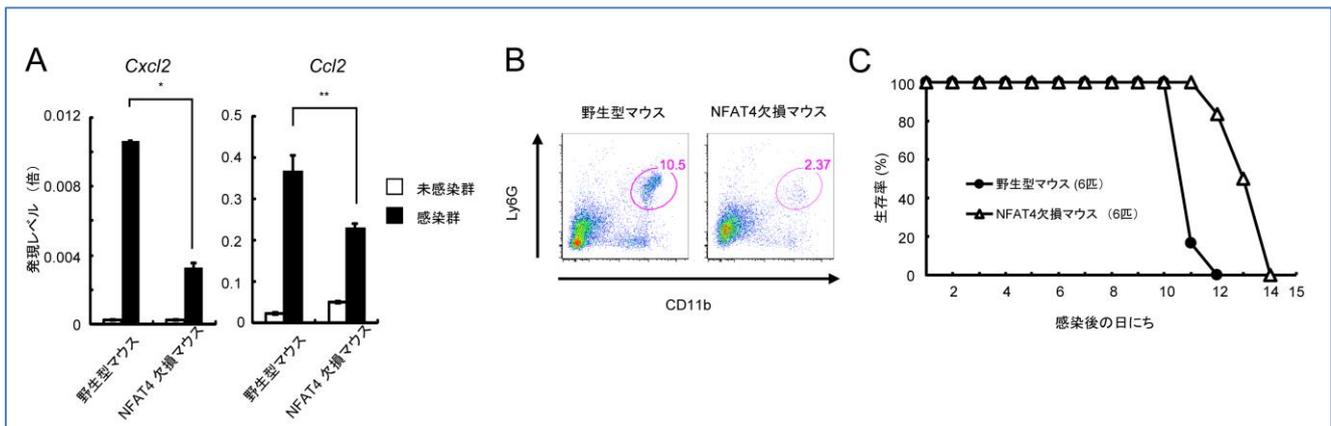


図4 NFAT4 欠損マウスでは、野生型トキソプラズマ感染での病原性が低下する

(A)野生型トキソプラズマが感染した野生型マウスの足蹠では、NFAT4 欠損マウスの足蹠よりも好中球の遊走に重要な役割を果たすケモカイン(Cxcl2 と Ccl2)の発現レベルが高い。(B)野生型トキソプラズマ感染した野生型マウスの足蹠では NFAT4 欠損マウスの足蹠よりも、CD11b 陽性 Ly6G 陽性細胞(好中球)の割合が多い。(C)野生型トキソプラズマ感染において、NFAT4 欠損マウスは野生型マウスよりも生存期間が有意に延びている。

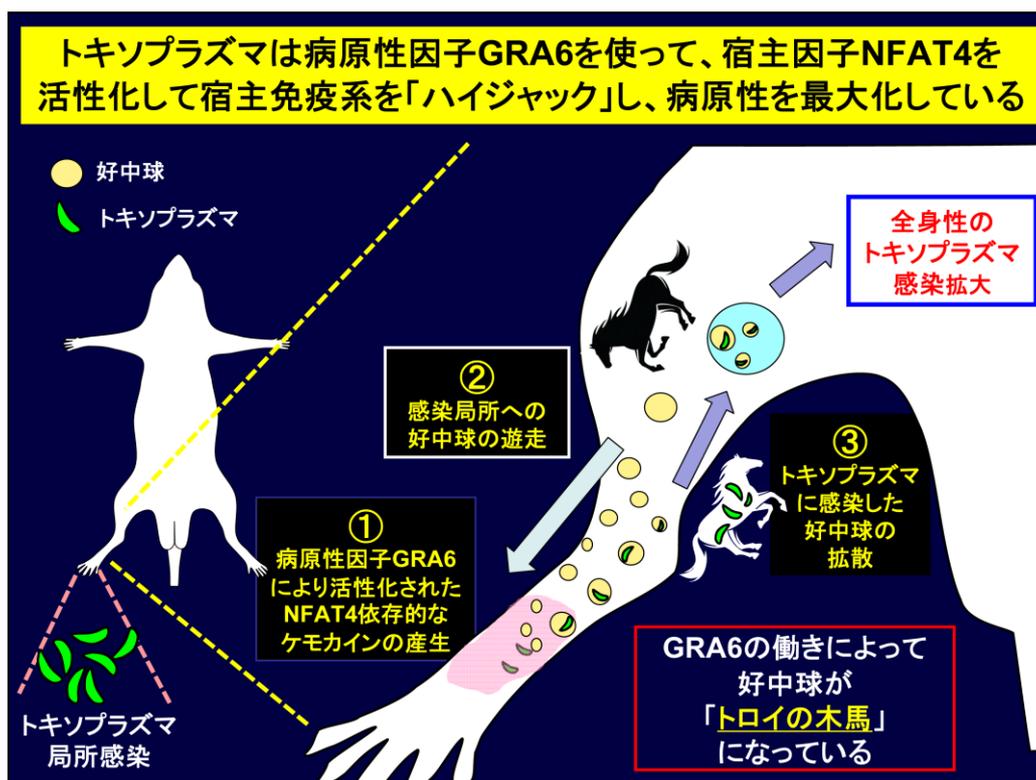


図5 今回明らかとなったトキソプラズマの病原性因子 GRA6による宿主免疫ハイジャック機構

トキソプラズマが局所感染した後、①病原性因子 GRA6により宿主転写因子 NFAT4が活性化しケモカインが産生する。次に、②ケモカインがあるために好中球が局所に遊走し、そこでトキソプラズマが好中球に感染する。そして、③トキソプラズマが感染した好中球が全身に拡散していくことによって、トキソプラズマが局所から全身に感染拡大する。すなわち、トキソプラズマは病原性因子 GRA6 を機能させ、宿主免疫系をハイジャックして、好中球を「トロイの木馬」化していることが明らかとなった。