

トキソプラズマ症発病の決定的病原性因子を同定

－ 病原性因子 ROP18 による宿主免疫抑制機構の解明 －

本研究成果のポイント

- ROP18 欠損トキソプラズマ原虫を使って、ROP18 の免疫抑制機能を解明
- ROP18 の標的蛋白質である小胞体ストレスセンサーATF6 β の免疫系機能を示唆
- ROP18 を標的とした新たなトキソプラズマ症治療薬の開発への期待

トキソプラズマ症はエイズ患者や抗がん剤を多用する癌患者など免疫抑制状態にある人間や動物で脳症がおこり、重篤な神経症状を引き起こす大変死亡率の高い人畜共通寄生虫病です。トキソプラズマ症を引き起こすトキソプラズマ原虫は、世界人口の約 3 分の 1 が感染しているとされ、健康人ではさほど問題ないものの妊婦が初めて感染した際には胎児の流産や新生児の先天性水頭症を引き起こすこともある、予後が大変悪い重要病原体です。寄生虫が感染すると人間や動物などの宿主では免疫システムによる排除機構が作動しますが、病原性の高いトキソプラズマ原虫感染では宿主免疫系が抑制されトキソプラズマ症が発症することが近年わかってきました。しかし、その高病原性トキソプラズマ原虫による宿主免疫抑制機構の具体的なメカニズムは不明のままでした。

今回本研究グループはトキソプラズマ症のマウス実験モデルを用いることにより、高病原性トキソプラズマ原虫が分泌する病原性因子 ROP18 が急性トキソプラズマ症発病の際の免疫抑制反応に重要であることを発見しました。そのメカニズムとして、ROP18 が宿主感染細胞に打ち込まれ、宿主のストレスセンサーの一つである ATF6 β を分解し機能不全に陥れることで、寄生虫排除に必要な I 型免疫応答を抑制することを見出しました。この発見は、ROP18 の機能を人為的に操作することで、トキソプラズマ症に対する新たな治療法の開発に繋がる成果として期待されます。

本研究成果は、米国・医学雑誌「*Journal of Experimental Medicine*」誌(平成 23 年 6 月 13 日号オンライン版)に掲載されます。本研究は、大阪大学免疫学フロンティア研究センターの山本雅裕准教授、竹田潔教授らとスイス・ジュネーブ大学医学部微生物学教室(ドミニク ソルダージェイ=ファーブル博士)の共同研究グループが、独立行政法人科学技術振興機構の戦略的国際科学技術協力推進事業「日本-スイス(ETHZ)研究交流」研究領域における研究課題「孢子虫類原虫における宿主内作動性エフェクター因子の機能的解析」(研究代表者:山本雅裕・ドミニク ソルダージェイ=ファーブル)の一環として行いました。

(研究の詳細な説明)

1. 背景

トキソプラズマ原虫はネコを終宿主とする病原性微生物です。中間宿主はヒトを含むほぼ全ての恒温動物であり、ヒトに限って言えば全世界人口のうちの約 3 分の1(数十億人)が感染し、我国だけでも数千万人に感染していることが試算されています。健常人では一過性の発熱などを除いてほとんど症状がないことからトキソプラズマ原虫は日和見病原体として扱われていますが、エイズ患者・抗癌剤投与された患者などの免疫不全者においてはトキソプラズマ脳症を引き起こし、さらに妊婦が妊娠初期に初感染であった場合その胎児にトキソプラズマ原虫が母体の胎盤を介して感染し流産したり、あるいは新生児が水頭症に罹患した状態で生まれてくるなど非常に予後不良な疾患を引き起こす重要病原体です。また、最近では統合失調症の発病にもトキソプラズマ原虫の感染の有無が関与しているケースがあると報告されています。

トキソプラズマ原虫はマラリア症の原因病原体であるマラリア原虫などと同じ胞子虫類原虫に分類され、宿主の細胞の中でのみ増殖可能な偏性細胞内寄生生物です。感染可能な細胞の種類はすべての有核の細胞であり、赤血球あるいは肝臓細胞のみにしか感染できないマラリア原虫とは比較にならないぐらいの多数の細胞系譜がトキソプラズマ原虫の標的細胞となることが、数十億人に上る感染者がいる原因の一つであると考えられます。トキソプラズマ原虫はその三日月形の先端部に存在する複合体(アピカルコンプレックス)を用いて標的細胞に密着後、能動的に速やかに細胞内に侵入し、ロプトリーと呼ばれる分泌小器官から様々な分子を宿主細胞室内に放出することが判明しました(図1A,B)。

トキソプラズマ原虫の遺伝子型についてはヨーロッパ及び北米地域において以前から精力的に研究されており、その結果トキソプラズマ原虫は I 型、II 型、III 型という 3 つの主要な型に分類されることが分かっています。それぞれの遺伝子型を持つ原虫の病原性については、マウスにおける感染実験から I 型原虫は 10^0 (つまり、原虫1個)感染すればマウスを殺すことが可能であるのに対し、II 型と III 型原虫の LD₅₀ はそれぞれ 10^3 と 10^5 であり、従って I 型原虫の病原性はマウスにおいて著しく高いことが報告されています。II 型原虫と III 型原虫を使った順遺伝学的解析によりその原因の候補分子としてロプトリーに存在するリン酸化酵素である ROP18 が挙げられましたが、ROP18 が I 型トキソプラズマ原虫の特徴である高病原性を決定する因子であるかどうかは不明でした(図1C)。

2. 研究の手法と成果

研究グループはまず ROP18 が I 型トキソプラズマ原虫の高病原性を規定するかどうかを検討する目的で、ROP18 欠損原虫を遺伝子ノックアウト法により作成しました。ROP18 欠損 I 型原虫は、野生型 I 型原虫に比べて病原性が著しく低下したことから ROP18 が I 型トキソプラズマ原虫の高病原性を決定する病原性因子であることが分かりました(図 2)。次に、ROP18 のどの領域が病原性に重要かということ調べる目的で、ROP18 の N 末端部位を欠損する変異体を ROP18 欠損原虫に発現させ病原性を検討したところ、野生型(完全長)ROP18 を発現させた原虫に比べて、病

原性の回復が不十分であったことから ROP18 の N 末端が ROP18 の高病原性に重要であることが分かりました。

ROP18 のファミリー分子である ROP16 は同様に宿主細胞に打ち込まれ、自然免疫系担当細胞では免疫抑制能を有する転写因子である Stat3 という宿主因子と結合することを我々の研究グループが以前に報告していました。そこで ROP18 についてもその N 末端部位に結合する宿主因子が存在するのではないかと考え、ROP18 の結合分子を探索した結果、小胞体ストレスセンサーの一つであり転写因子でもある ATF6 β が ROP18 の宿主因子として同定されました。さらに、ROP18 存在下では ATF6 β がプロテアソーム依存的な蛋白質分解を受けることで、ATF6 β 依存的な遺伝子発現を抑制することを見出しました(図 3)。また ROP18 はリン酸化酵素ですが、そのリン酸化酵素活性が ATF6 β の蛋白質分解に必須であること及び I 型トキソプラズマ原虫の病原性に必須であることも明らかにしました。

しかしながら、ATF6 β がどのような機能を持っているためにトキソプラズマ原虫高病原性因子 ROP18 に標的とされているかについては不明でした。そこで ATF6 β の生理的機能を明らかにするために ATF6 β 欠損マウスを遺伝子ノックアウト法により作成し検討しました。その結果、ATF6 β 欠損マウスは野生型マウスに比較して ROP18 欠損原虫感染に対して感受性が著しく高まることから、ATF6 β が原虫に対する免疫機能を有することが示唆されました(図 4)。さらに ATF6 β 欠損マウスでは原虫排除に重要な免疫システムである I 型免疫応答の一部に機能不全があることを見出しました(図 5A)。

これらの結果から、I 型トキソプラズマ原虫は ROP18 を感染細胞に分泌し ATF6 β を標的として分解することでその機能不全を誘導し宿主免疫応答を抑制するために高病原性であることが明らかとなりました(図 5B)。

3. 今後の期待

研究グループは今回、遺伝子ノックアウト法を使った病原体側(寄生虫・原虫)と宿主側(マウス)の両方からのアプローチによって、トキソプラズマ原虫病原性因子 ROP18 の作用メカニズムおよび ER ストレスセンサー ATF6 β の免疫学的新機能を明らかにしました。ROP18 は 30 種類以上からなるファミリー分子であることからトキソプラズマ原虫の病原性決定に他のロプトリー分子が関与していることが予想されます。また小胞体ストレスと免疫系の関与についても学術的新展開が予想されます。

また、ROP18 はリン酸化酵素でありその酵素活性がトキソプラズマ原虫の病原性決定に重要であったことから、その活性を抑制する低分子化合物は新規トキソプラズマ症治療薬になると大いに期待されます。

(図)

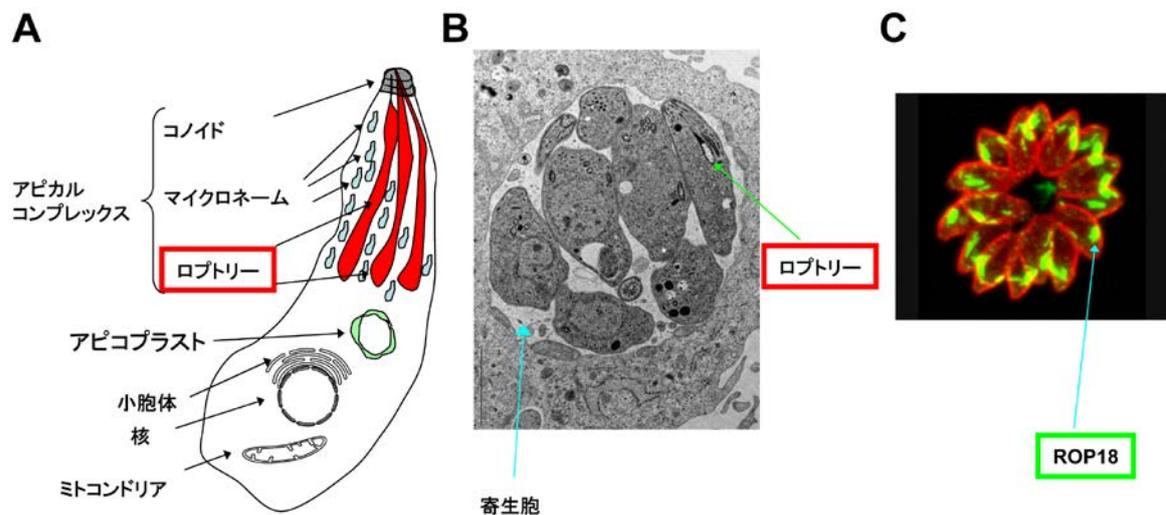


図1 トキソプラズマ原虫の分泌小器官ロプトリーと ROP18

(A)トキソプラズマ原虫の模式図。先端部に分泌小器官であるロプトリー(赤い部分)が存在する。(B)宿主細胞に感染したトキソプラズマ原虫の電子顕微鏡図。感染細胞中では寄生胞内(水色矢印)に存在する。また、先端部に明らかなロプトリー像が認められる(緑矢印)。(C)感染細胞中でのトキソプラズマ原虫の免疫染色図。トキソプラズマ原虫の細胞膜蛋白質GAP45を赤色で、ROP18を緑色で染色した。

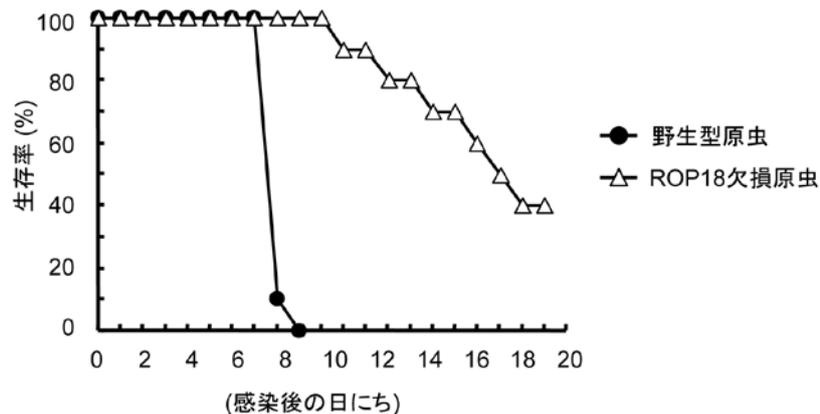


図2 ROP18欠損I型トキソプラズマ原虫は病原性が低くなる

野生型I型原虫とROP18欠損I型原虫をマウスに感染させ、その生存率を測定した。野生型原虫感染群は9日以内に全マウスが死亡したが、ROP18欠損原虫感染群は相当数生き残ったことから、ROP18がI型原虫の病原性に重要であることを示している。

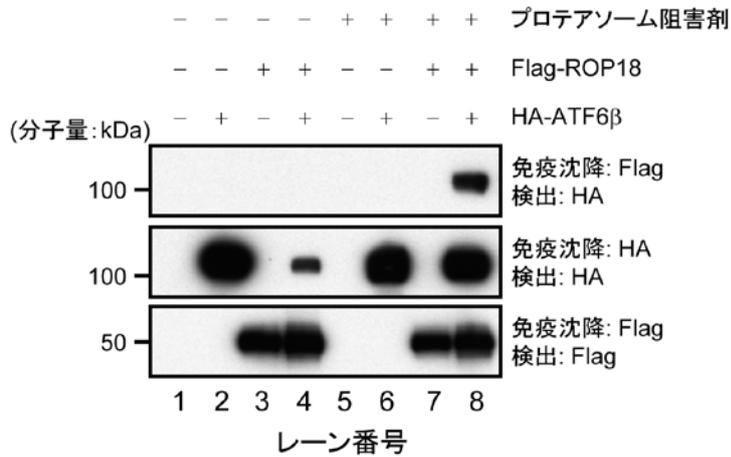


図3 高病原性因子 ROP18 は小胞体ストレスセンサーATF6 β を分解する
 哺乳動物細胞（293T 細胞）で ROP18 を ATF6 β と共に発現させた結果（レーン4）、ATF6 β 単独で発現させた時（レーン2）に比べて ATF6 β の蛋白質量が低下しているが、プロテアソーム阻害剤存在下では ATF6 β 蛋白質量が元に戻っている（レーン8）

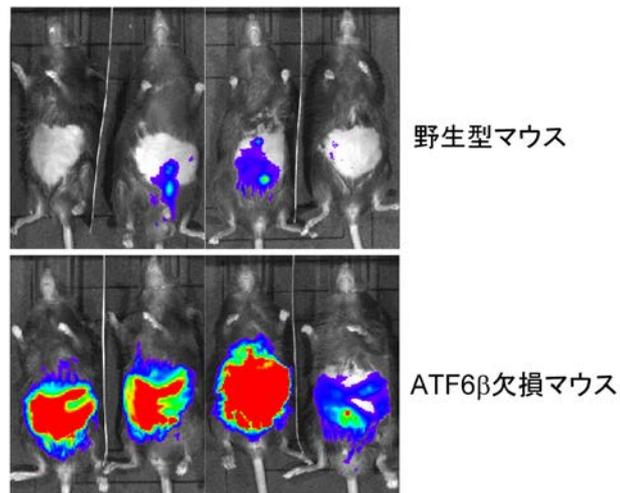


図4 ATF6 β 欠損マウスは ROP18 欠損トキソプラズマ原虫に対する高感受性となる
 基質依存的発光蛋白質ルシフェラーゼを発現する ROP18 欠損原虫を、野生型マウス及び ATF6 β 欠損マウスに感染させた後 8 日後に生体イメージング装置を使ってルシフェラーゼ活性を測定した。ATF6 β 欠損マウスではルシフェラーゼ発光強度が強いことから、ROP18 欠損原虫が広く拡散していることが示唆される。

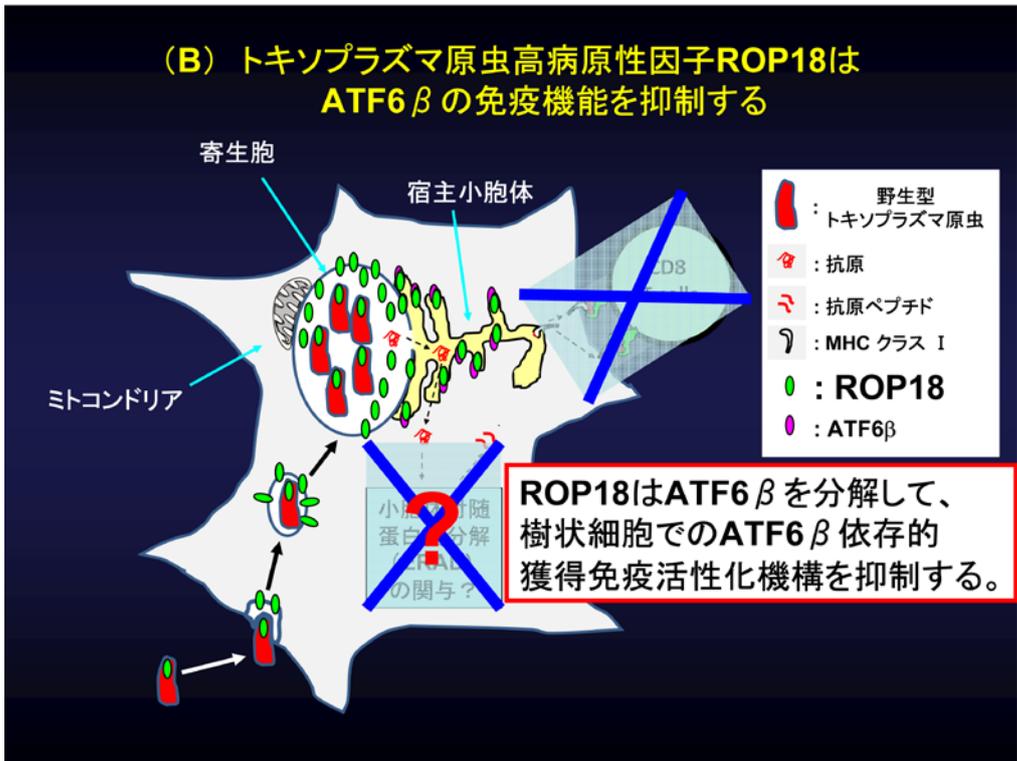
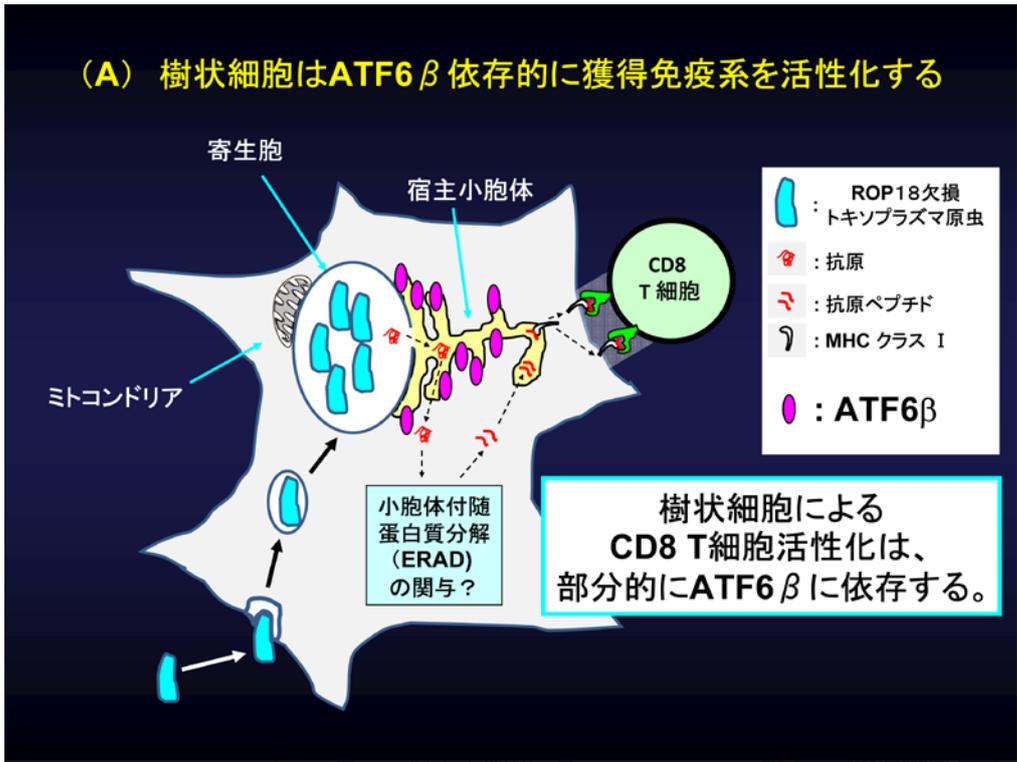


図 5 高病原性トキソプラズマ原虫の ROP18 による病原性のメカニズム

(A) ROP18 欠損原虫は感染後、部分的に ATF6 β に依存した経路による CD8 T 細胞による獲得免疫系の誘導により排除される。(B) しかし、野生型原虫では感染後原虫から分泌される ROP18 により ATF6 β が分解されることで免疫応答が抑制される。