トキソプラズマ症の発病を防ぐ最重要宿主防御因子 GBP の同定

―インターフェロン誘導性タンパク GBP は寄生虫「トキソプラズマ」を破壊する―

❖ 概要

寄生虫「トキソプラズマ」はエイズや抗癌剤投与下にある免疫不全患者に致死性のトキソプラズマ症や妊婦に流産と新生児に水頭症を引き起こす先天性疾患の原因病原体です。我々ヒトを含む宿主はインターフェロンと呼ばれる分子を出すことでトキソプラズマ症の発病を抑えていることが四半世紀前から分かっていましたが、インターフェロンが具体的にどのようにしてトキソプラズマを破壊するのか、そのメカニズムは不明でした。

IFReC の山本雅裕准教授、竹田潔教授らは、トキソプラズマが感染細胞内で増殖する際に必須の生活の場である「寄生胞」を、インターフェロンにより誘導されるタンパク質である GBP が破壊することが、トキソプラズマが感染細胞内で増殖不可能にするために不可欠であり、その結果トキソプラズマ症の発病を抑制していることを、GBP 欠損マウスの作製と生体レベルでのイメージング解析により、世界に先駆けて証明しました。

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、GBP の機能を高めるなどの人為的な制御を加えることでの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

Yamamoto et al., A Cluster of Interferon-γ-Inducible p65 GTPases Plays a Critical Role in Host Defense against *Toxoplasma gondii*,

Immunity (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.009

❖ 特記事項

本研究は、大阪大学免疫学フロンティア研究センター(WPI-IFReC)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 ソルダーティ＝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(JST)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「胞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 ソルダーティ＝ファーブル)の一環として行いました。

詳しい解説

背景

トキソプラズマはネコを終宿主とする病原性寄生虫です（図1A）。中間宿主はヒトを含むほぼ全ての恒温動物であり、ヒトに限っていえば全世界人口のうちの約 3 分の1（数十億人）が感染し、我が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ます。近年我が国において、ガーデニングの流行や非加熱の生肉食の増加などのライフスタイルの欧米化に伴い、とりわけ妊婦がトキソプラズマに感染し、その結果胎児にトキソプラズマ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症例が急増しており、マスコミなどにも取り上げられています（2012 年 5 月 10 日放映 NHK・朝イチ「妊婦さんご注意！意外なモノで赤ちゃんに危険」も参考にして下さい http://www.nhk.or.jp/asaichi/2012/05/10/01.html）。また、最近は統合失調症の発病にもトキソプラズマの感染の有無が関連しているとの報告もされています。

トキソプラズマ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種多様の細胞がトキソプラズマの標的細胞となることが、非常に多くの感染者がいる原因の一つであると考えられます。トキソプラズマは細胞に感染した時に、「寄生胞」と呼ばれる細胞内小器官を形成し、その中で宿主から栄養分を摂取することで効率的に増殖することがわかっています（図 1B）。それに対して、我々宿主はインターフェロン（IFNγ）という T 細胞やナチュラルキラー細胞などの免疫細胞から主に分泌されるタンパク質を使って寄生胞内のトキソプラズマを破壊することがトキソプラズマ症の発病を防ぐのに重要であるということが約 30 年前から示唆されていました。しかし、IFNγ 自身には病原体を直接破壊するような構造はなく、従ってどのようにして IFNγ がトキソプラズマを破壊しているのかについてのメカニズムは長い間不明のままでした。

研究の手法と成果

研究グループは IFNγ がマクロファージや線維芽細胞などの自然免疫担当細胞に作用して、約 2000 種類のエフェクター分子群の遺伝子発現を誘導することに着目しました。中にはトキソプラズマの寄生胞の周辺に集まってくる GBP（p65 GTP分解酵素）と呼ばれる 13 個のファミリー分子群から形成されるエフェクター分子群があり、宿主の抗トキソプラズマ免疫応答に何らかの役割を果たしていることが考えられました。通常、ある特定の遺伝子の役割を調べたいという場合には一つの遺伝子を欠損させたマウスを作成して検討しますが、GBP の場合はそれぞれの遺伝子の相同性が非常に高く（つまり、よく似ているため）、一つの遺伝子を欠損させても非常に良く似た別の GBP ファミリー分子がその機能を補う（相補する）ことが予想されました。そこで当研究グループでは GBP ファミリー分子が 6 個と 7 個に分かれて異なる染色体上の非常に狭い領域に隣り合って存在することを利用して、染色体工学的手法を用いて 3 番染色体上に存在する全ての GBP（6 個）の GBP ファミリー分子を欠損するマウス（GBPchr3 欠損マウス）の作製し解析しました。

GBPchr3 欠損マウスと野生型マウスにトキソプラズマを感染させ生存率を測定した所、GBPchr3 欠損マウスはトキソプラズマ感染に対して非常に弱くなっていることが分かりました（図2A）。また感染マウス内でのトキソプラズマの感染拡大を、トキソプラズマから出る発光を指標に生体イメージング装置を使って検討したところ、GBPchr3 欠損マウス内では野生型マウスと比べて劇的にトキソプラズマが増殖していることが分かりま

した（図2B）。次にトキソプラズマが生体内で感染している細胞であるマクロファージと呼ばれる自然免疫細胞を単離して、トキソプラズマを感染させその増殖を検討しました。IFNγ で野生型マクロファージを処理すると濃度依存的にトキソプラズマの増殖が抑制されますが、GBPchr3 欠損マクロファージではIFNγによるトキソプラズマの増殖を野生型細胞と比較して抑制できないことを見出しました（図2C）。このことから、IFNγによって誘導される GBPchr3 は自然免疫細胞マクロファージ内でトキソプラズマ増殖を妨げることが、生体レベルでのトキソプラズマに対する感染防御反応に重要であることが分かりました。

では、GBPを欠損したマクロファージでは何故トキソプラズマの増殖を抑制できないのでしょうか？その問題を解決するために研究グループは電子顕微鏡を使って、感染細胞内でのトキソプラズマの状態を検討しました。その結果、IFNγ で刺激した野生型マクロファージ内ではトキソプラズマの寄生胞の膜が激しく波打ち、その構造が著しく破壊されていました(図3A)。一方、GBPchr3 欠損マクロファージ内ではIFNγ 処理をしてもそのような寄生胞膜の構造変化は認められませんでした(図 3B)。このことから、GBPはマクロファージ内でトキソプラズマの寄生胞の膜構造を破壊する機能があることが分かりました。

ではどのようにしてGBPはトキソプラズマの寄生胞膜を破壊することができるのでしょうか？以前から寄生胞膜の破壊についての機能が示唆されていたGBPとは別のファミリー分子群である p47 GTP 分解酵素（IRG）の動態について、野生型及びGBPchr3欠損マクロファージで比較しました。すると、野生型細胞ではIRGがトキソプラズマに蓄積するのに対して、GBPchr3 欠損マクロファージではIRGの蓄積が著しく減少していることが分かりました（図4A）。またGBPとIRGの局在について野生型マクロファージ内で検討したところどちらもトキソプラズマに蓄積し、さらにGBPはIRGに結合していることも分かりました（図4B）。これらのことから、GBPはIRGをトキソプラズマに蓄積させることでその寄生胞膜を破壊し増殖を阻害していることが示唆されました（図 5）。

今後の期待

今回の研究により、IFNγ によって誘導される抗トキソプラズマ感染防御機構にGBPが重要な役割を果たしていることを明らかにしました。このことから、人為的にGBPの機能を高めることにより、我が国で症例報告が急増しているトキソプラズマ症に対する新たな治療戦略を提供できることが期待できます。

寄生胞はトキソプラズマに限らずマラリア原虫においても形成されることを考えると、GBPがマラリア原虫感染防御に関与する可能性は非常に高く、マラリア症の発病におけるGBPの役割の解明は最も重要な今後の研究課題です。またGBPは様々な癌において高い発現が認められることが多数報告されており、感染下ではない異常な状態でのGBPの存在が引き起こす疾患の病理機構の解明に、研究グループが染色体工学により作り出したGBP欠損マウスが非常に有用であると考えられます。

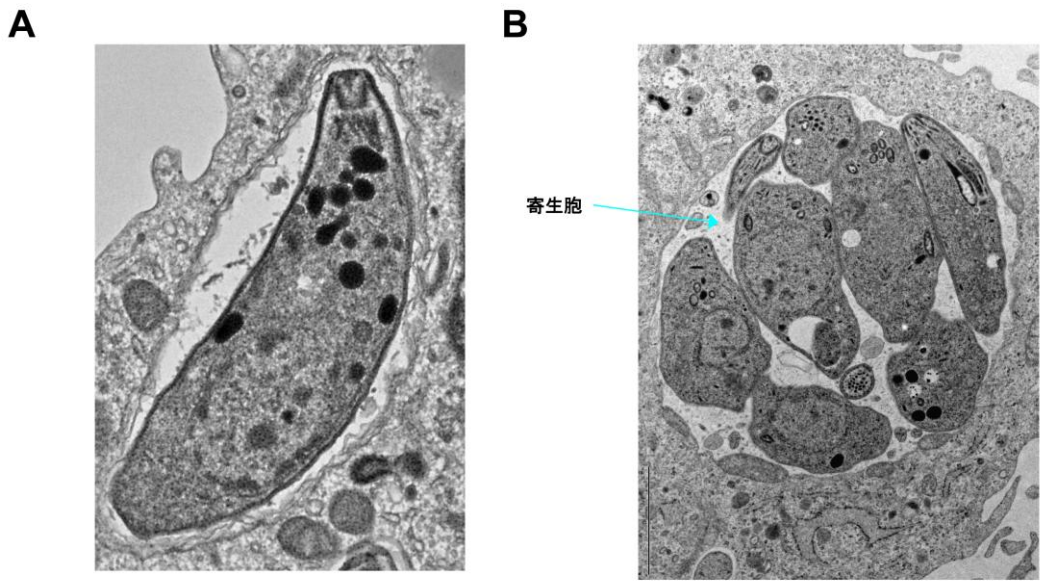

図1　トキソプラズマは「寄生胞」の中で増殖する

（A）トキソプラズマの電子顕微鏡写真。（B）寄生胞の中で増殖しているトキソプラズマの電子顕微鏡写真。寄生胞膜を介して感染細胞から増殖に必要な栄養分を摂取する。

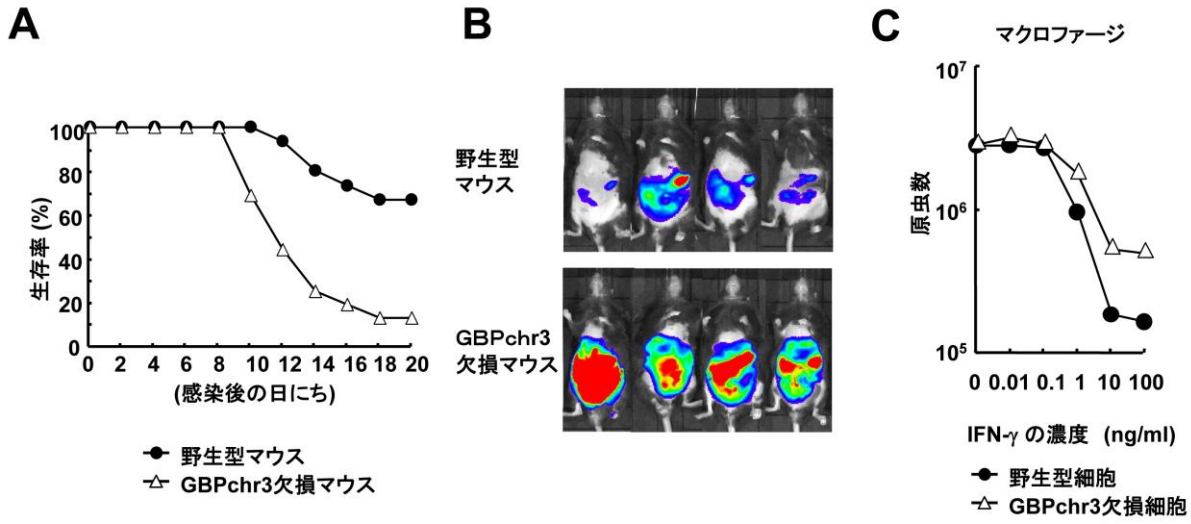

図2　GBPchr3 を欠損したマウス及び細胞はトキソプラズマ感染に弱くなる

（A）野生型及び GBPchr3 欠損マウスにトキソプラズマを感染させ生存率を測定した結果、GBPchr3 欠損マウスはトキソプラズマ感染に非常に感受性が高まることが明らかとなった。（B）発光するトキソプラズマをマウスに感染させ、生体イメージング装置でトキソプラズマの動態を観察した所、GBPchr3　欠損マウス内でトキソプラズマがより多く増殖した。（C）野生型マクロファージをIFNγ で刺激すると濃度依存的にトキソプラズマの数が減少するが、GBPchr3　欠損マクロファージでは野生型に比べて原虫数の数が多かったことから、GBPchr3 の欠損により IFNγ 依存的な増殖抑制に障害が出ることが示唆された。

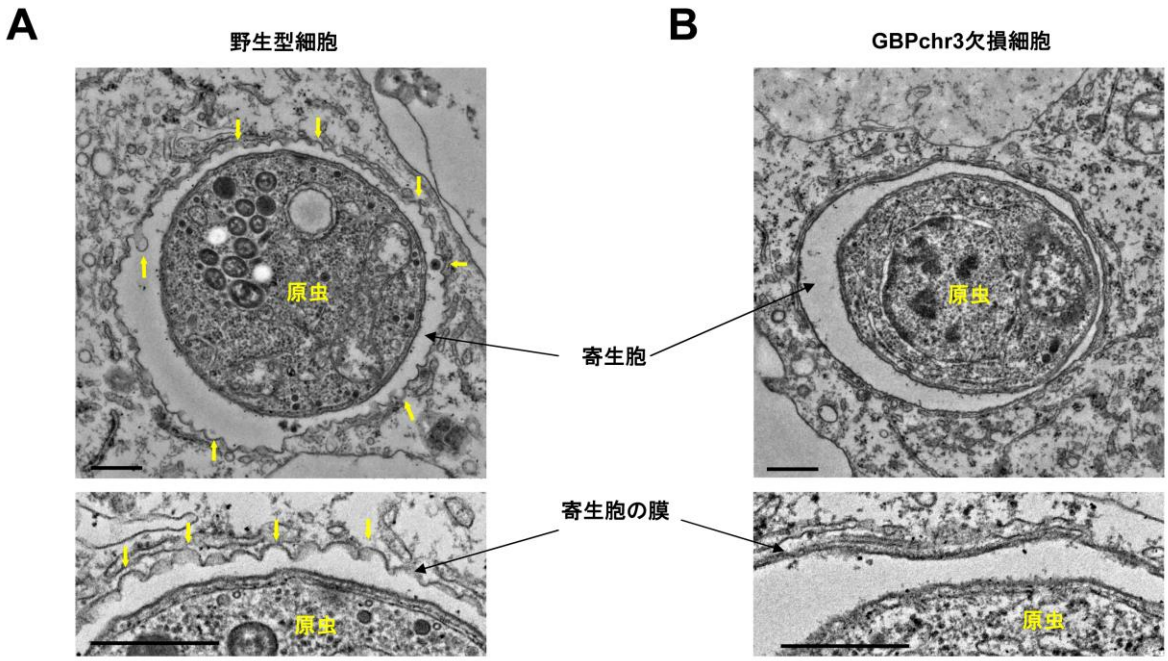

図3　GBPchr3 を欠損した細胞では寄生胞膜の構造変化が認められない

（A）野生型　（B）GBPchr3　欠損マクロファージにおける寄生胞内のトキソプラズマの電子顕微鏡像。野生型細胞では寄生胞の膜が激しく波打っているのに対し、GBPchr3 欠損細胞ではそのような変化は認められない。

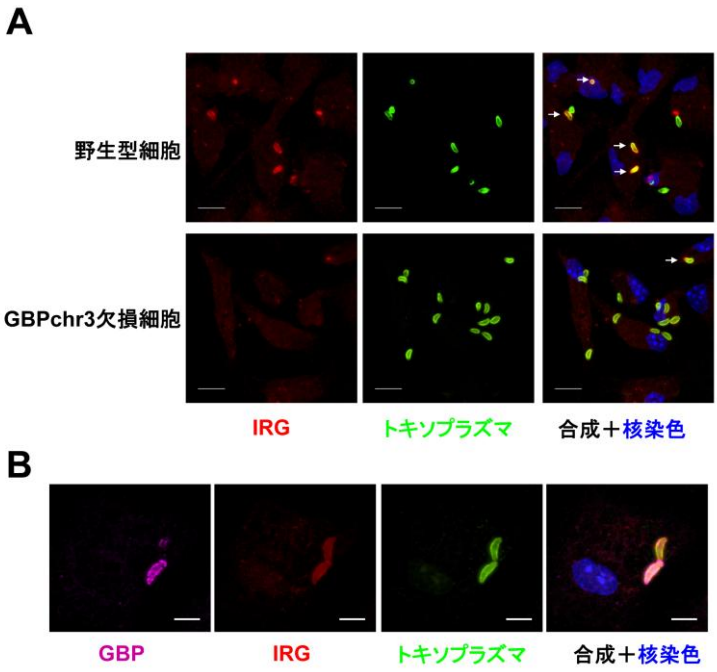

図4　GBPchr3 を欠損した細胞では IRG のトキソプラズマへの蓄積が低下している

（A）IRGのトキソプラズマへの蓄積を比較した所、野生型細胞に比べて GBPchr3 欠損細胞では IRG とトキソプラズマが共局在している像が認められない。（B）野生型細胞において　GBP、IRGとトキソプラズマは共局在をすることからGBP とIRGは非常に近い所に存在することが示唆された。

図5　今回明らかとなったインターフェロン誘導性タンパクGBPを介する抗トキソプラズマ感染防御機構

IFNγ が無い場合、トキソプラズマは感染細胞内の寄生胞内で増殖し、その結果感染細胞はトキソプラズマによって殺され、最終的には宿主がトキソプラズマ症により死亡する。一方、IFNγ 存在下では GBP が誘導され寄生胞膜に IRG と共に蓄積することで寄生胞膜構造を破壊し、トキソプラズマは増殖することができなくなる。