71　IFN誘導性GTPaseによるインフラマソーム制御機構の解明	山本　雅裕

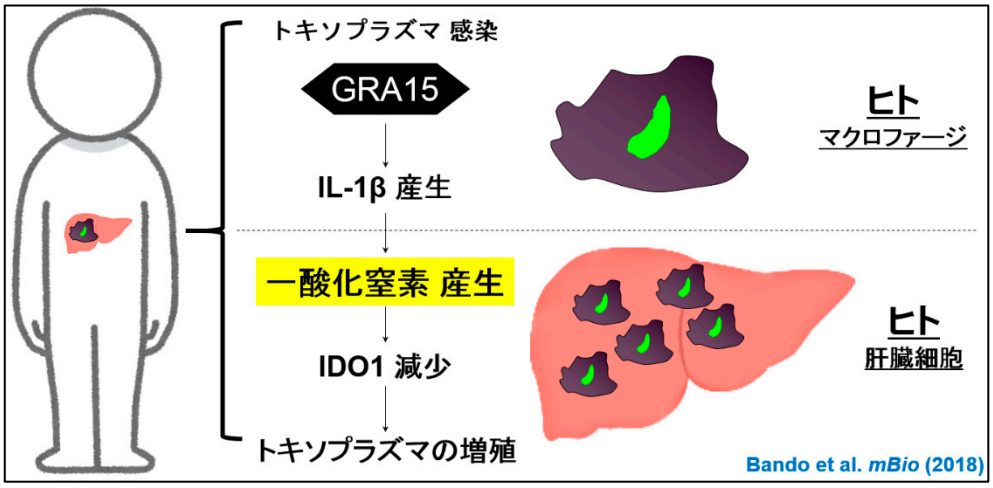
【目的】インターフェロン（IFN）誘導性 GTPase は、小型魚類から哺乳動物まで広く保存されており、IFN 刺激によって様々な細胞で強く誘導される分子群である。IFN 誘導性 GTPase は主に、細胞内に寄生する様々な病原体が形成する病原体含有小胞に蓄積し、それを破壊する機能を有し、トキソプラズマなどの寄生虫やサルモネラなどの細菌に対する宿主免疫応答に重要である。トキソプラズマは細胞に感染して、病原体含有小胞の中でだけ増殖ができる寄生虫である。これまでに宿主の細胞に感染した際に様々な分子を放出することが知られており、それら分子がどのように病原性発症にかかわってくるのかなど、その寄生虫学の研究がされている。その中の一つである GRA15 も宿主細胞内に放出され、宿主免疫系を活性化することが知られ、IL-1β の産生に関与することが報告されていた。しかし、マウスを使った寄生虫免疫学による研究の結果、*GRA15* を欠損したトキソプラズマの方が野生型原虫よりも病原性が増す（つまり、GRA15 が無い方がトキソプラズマには有利である）ことが報告され、トキソプラズマが GRA15 を持つ寄生虫学上の意義は長い間不明であった。

そこで我々はトキソプラズマの GRA15 のインフラマソーム活性化と IFN 誘導性の抗トキソプラズマ応答の関係性を調べることを目的とした。

【方法】ヒトマクロファージにトキソプラズマを感染させ、ヒト肝臓細胞と共培養をし、インターフェロン依存的な宿主免疫応答を検討した。

【結果】トキソプラズマに感染したヒトマクロファージは GRA15 の有無によって、NLRP3 インフラマソームの活性化による IL-1β の産生が制御され、さらにヒト肝臓細胞を刺激し一酸化窒素を産生することによって、IFN 依存的な宿主免疫応答を抑制していた。このことによって、NLRP3 インフラマソームによるインターフェロン宿主免疫の負の制御機構が明らかとなった。

NLRP3 インフラマソームの活性化によって、インターフェロン依存的宿主免疫応答が制御される



71. IFN 誘導性 GTPase によるインフラマソーム制御機構の解明

山本　雅裕

大阪大学 微生物病研究所 感染病態分野

Key words：インフラマソーム，トキソプラズマ，インターフェロン，NLRP3

緒　言

インターフェロン（IFN）誘導性 GTPase は、小型魚類から哺乳動物まで広く保存されており、IFN 刺激によって様々な細胞で強く誘導される分子群である。IFN 誘導性 GTPase は主に、細胞内に寄生する様々な病原体が形成する病原体含有小胞に蓄積し、それを破壊する機能を有し、トキソプラズマなどの寄生虫やサルモネラなどの細菌に対する宿主免疫応答に重要である。

IFN 誘導性 GTPase の標的となるトキソプラズマはヒトを含む全ての恒温動物に感染する人畜共通の寄生虫である。世界人口の 3 分の 1 が感染していると言われるが、免疫系が正常である場合は特に問題はない。しかしトキソプラズマは、エイズにかかる、臓器移植を受けるなどの免疫不全状態になると致死的な脳炎や肺炎、肝炎などを引き起こし、妊婦が初感染すると流産や新生児が先天性の水頭症や眼の疾患を引き起こす病原体で、現在、トキソプラズマ症は我が国で医学的に最も大きな問題となっている寄生虫疾患のひとつであると言っても過言ではない。

トキソプラズマは細胞に感染してのみ増殖ができる寄生虫である。これまでに宿主の細胞に感染した際に様々な分子を放出することが知られており、それら分子がどのように病原性発症にかかわってくるのかなど、その寄生虫学の研究競争がされている。その中の一つである GRA15 も宿主細胞内に放出され、宿主免疫系を活性化することが知られ、IL-1β の産生に関与することが報告されていた。しかし、マウスを使った寄生虫免疫学による研究の結果、*GRA15* を欠損したトキソプラズマの方が野生型原虫よりも病原性が増す（つまり、GRA15 が無い方がトキソプラズマには有利である）ことが報告され［1］、トキソプラズマが GRA15 を持つ寄生虫学上の意義は長い間不明であった。

そこで我々はトキソプラズマの GRA15 のインフラマソーム活性化と IFN 誘導性の抗トキソプラズマ応答の関係性を調べることを目的とした。

方法および結果

まず、ヒトのマクロファージや肝臓細胞の単独培養系に、野生型トキソプラズマまたは *GRA15* 欠損トキソプラズマを感染させたところ、*GRA15* の有無にかかわらずトキソプラズマはインターフェロン刺激によって増殖が抑制され、両者の間に違いを見つけることはできなかった（図 1A）。トキソプラズマが感染した宿主の体内では、トキソプラズマに感染したマクロファージが様々な臓器を巡る。このことから、肝臓細胞とトキソプラズマに感染したマクロファージを一緒に培養する系（共培養系）で試験してみた。その結果、野生型のトキソプラズマに比べて *GRA15* を欠損したトキソプラズマは、インターフェロン存在下で増殖できないことがわかった（図 1B）。

その理由を詳細に解析した結果、まず感染マクロファージはトキソプラズマの GRA15 依存的にインターロイキン（IL-1）と呼ばれるサイトカインを産生し、NLRP3 依存的インフラマソームの活性化によって放出することが分かった（図 2A）。そこで IL-1 を肝臓細胞に作用させたところインターフェロンと相乗的に働き、肝臓細胞において NO を合成する酵素の一つである誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の発現が上昇、NO の合成が誘導されていた。さらにこの NO が、ヒトにおいて抗トキソプラズマ免疫応答に必須の役割をしている IDO1 のタンパク質量が著しく減少させ、免疫応答を抑制していることがわかった。

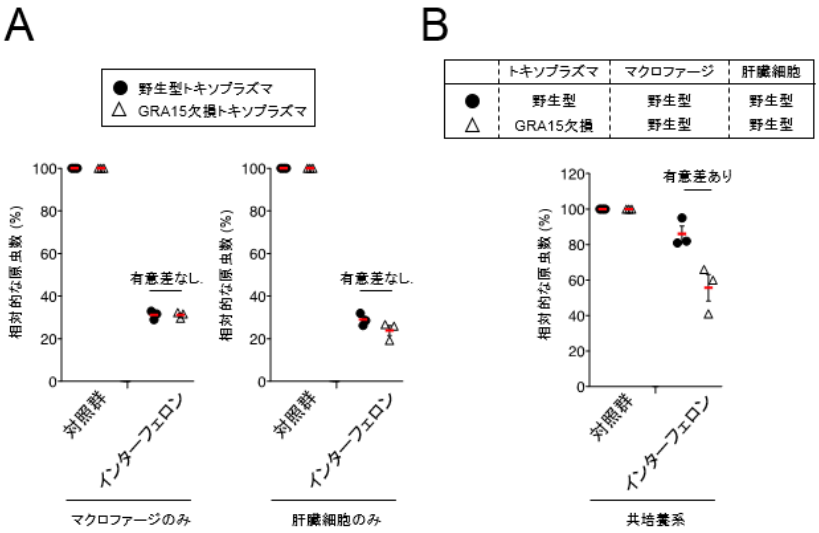


図 1. GRA15 依存的な抗トキソラズマ免疫応答抑制

(A) 未刺激またはインターフェロンで刺激したヒトのマクロファージまたはヒトの肝臓細胞に野生型または *GRA15* 欠損トキソプラズマを感染させた後に原虫数を比較した結果、どちらのトキソプラズマも数が同様に低下していた。(t 検定、有意差なし、$P > 0.05$)

(B) 野生型または *GRA15* 欠損トキソプラズマを感染させたヒトマクロファージをヒト肝臓細胞と共培養し、インターフェロン刺激したところ、野生型トキソプラズマに比べて *GRA15* 欠損トキソプラズマ感染群は数が低下していた。このことから、ヒトマクロファージと肝臓細胞の共培養系で、GRA15 によるインターフェロン依存的な抗原虫応答の抑制が観測された (t 検定、有意差あり、$P < 0.01$)

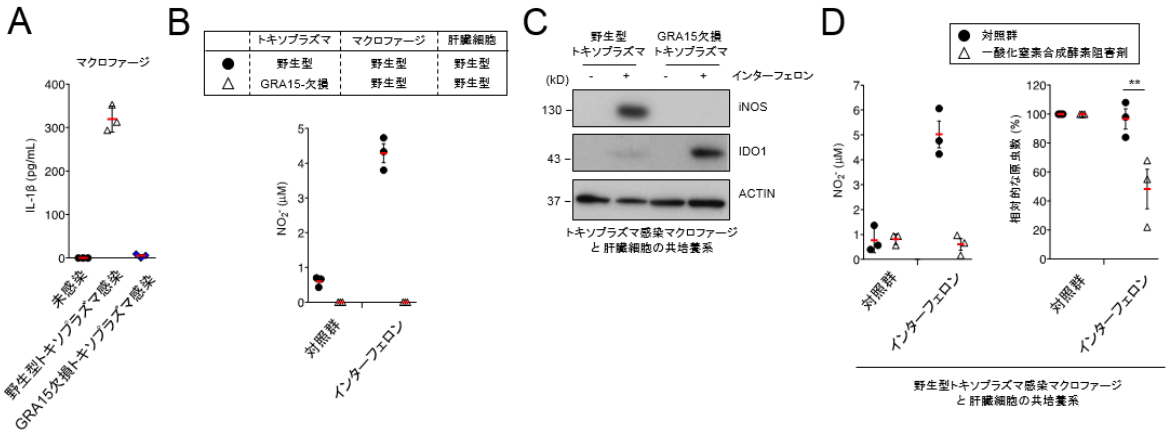


図 2. GRA15 依存的な一酸化窒素の産生と一酸化窒素産生阻害による野生型トキソプラズマの増殖抑制

(A) 野生型トキソプラズマを感染させたマクロファージから IL-1 が産生される。一方、*GRA15* 欠損トキソプラズマ感染細胞から全く IL-1 が産生されない。

(B) 野生型または *GRA15* 欠損トキソプラズマを感染させたヒトマクロファージをヒト肝臓細胞と共培養し、インターフェロン刺激したところ、野生型トキソプラズマに比べて *GRA15* 欠損トキソプラズマ感染群は一酸化窒素が全く産生されていなかった。

(C) (B) の条件で、iNOS 及び IDO1 タンパク質を検出したところ、iNOS については野生型トキソプラズマ感染群では検出されたが、*GRA15* 欠損トキソプラズマ感染群では iNOS が全く検出されなかった。一方 IDO1 について、野生型トキソプラズマ感染群ではほとんど検出されず、*GRA15* 欠損トキソプラズマ感染群では IDO1 が多く発現していた。

(D) 一酸化窒素合成阻害剤 (既に糖尿病合併症治療薬として広く使われている化合物) 存在下で、野生型トキソプラズマ感染群であってもインターフェロン刺激後の数が大幅に減少した (t 検定：有意差あり：$P < 0.01$)。

これらの結果により、トキソプラズマが GRA15 依存的にインターフェロン誘導性の抗トキソプラズマ免疫反応を抑制していることが明らかになった（図 2B、C）。さらに、iNOS の阻害剤を加えることによって、GRA15 を有する野生型トキソプラズマの増殖をマクロファージ・肝臓細胞の共培養系でも抑制できることを確認した（図 2D）。

考　察

これまでマウスの研究では、病原性因子 GRA15 は宿主免疫系を活性化することは知られていたが、トキソプラズマによって本来不利であるはずの宿主免疫活性化がなぜ起こるのか、その理由は不明であったが、今回、我々の研究によって、1. GRA15 依存的にマクロファージが IL-1β を産生し、NLRP3 依存的インフラマソームの活性化により L-1β が放出され、ヒト肝臓細胞では一酸化窒素（NO）産生が誘導されること 2. トキソプラズマの GRA15 により誘導された NO が、ヒトの抗トキソプラズマ免疫反応に重要な IDO1 を減少させることによって、ヒトの免疫反応を抑制することが分かった［2］。これにより、一酸化窒素（NO）の産生阻害が「ヒト」のトキソプラズマ症の新しい治療戦略となることが期待される。このように GRA15 は NLRP3 依存的インフラマソームを活性化し、IFN 誘導性の免疫応答を抑制する機序を有することが明らかになったことから、今後は GRA15 による IFN 誘導性 GTPase の抑制も同様に起きるのか、また IFN 誘導性 GTPase による GRA15 依存的な NLRP3 インフラマソームの活性化への影響について検討していく予定である。

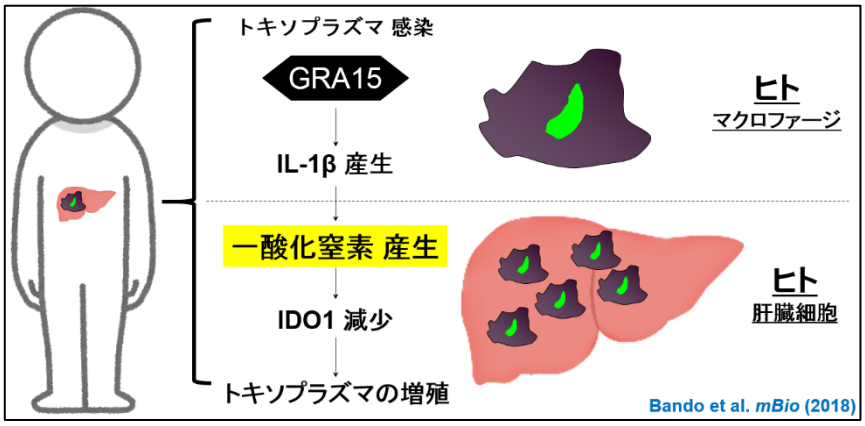


図 3. GRA15 による NLRP3 を介した IFN 誘導性抗トキソプラズマ免疫系抑制機構

トキソプラズマ感染によって、GRA15 依存的に NLRP3 インフラマソームを介してヒトマクロファージから IL-1 が産生され、それが肝臓細胞にインターフェロンと共に作用すると一酸化窒素の産生が起きる。その結果、インターフェロン刺激により誘導されるはずのヒト抗トキソプラズマ免疫分子である IDO1 が減少し、トキソプラズマは増殖できる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、帯広畜産大学原虫病研究所センターの西川義文教授である。

文　献

1） Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel Toxoplasma gondii dense granule protein. Rosowski EE, Lu D, Julien L, Rodda L, Gaiser RA, Jensen KD, Saeij JP. J Exp Med. 2011 Jan 17;208(1):195-212. doi: 10.1084/jem.20100717.

2） Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for Toxoplasma GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response. 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. 2018 Oct 9;9(5). pii: e01738-18. doi: 10.1128/mBio.01738-18.