

氏名(本(国)籍)	林 武 志 (三重県)
主 指 導 教 員 名	岐阜大学 准教授 高 島 康 弘
学 位 の 種 類	博士(獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第418号
学位授与年月日	平成26年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Studies on the Behavior of <i>Toxoplasma gondii</i> in the Intermediate Host (トキソプラズマ原虫の中間宿主体内における挙動に関する研究)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 前 田 貞 俊 副査 帯 広 畜 産 大 学 教 授 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 教 授 板 垣 匡 副査 東 京 農 工 大 学 教 授 白 井 淳 資 副査 岐 阜 大 学 准 教 授 高 島 康 弘

### 学位論文の内容の要旨

*Toxoplasma gondii* は偏性細胞内寄生性の原虫で、多種の哺乳類がその中間宿主となる。*T. gondii* は中間宿主体内ではタキゾイトと呼ばれる増殖型のステージとなって全身の諸臓器へ移行する。また、脳や筋肉などでは潜伏型のブラディゾイトのステージとなる。しかし中間宿主体内における本原虫の複雑な挙動の詳細については未知の部分が多い。本研究では本原虫の挙動がどのような因子によって決定されるのか、宿主側因子を中心に検証した。

第一章では、タキゾイトの全身伝播のステージについて研究を行った。このステージの原虫は白血球に感染して全身運ばれることが知られている。本研究では、まずマウスおよびヒトにおいて、感染白血球上の CD44 分子の発現レベルが非感染白血球よりも高いことを示した。さらにヒアルロン酸でコートしたプラスチックプレートに感染白血球と非感染白血球を加えたところ、感染白血球の方が非感染白血球に比べて効率よく接着した。その結果、感染白血球はヒアルロン酸コートされたプレート上で濃縮された。さらにこのような感染白血球の固層ヒアルロン酸上での濃縮は抗 CD44 抗体による中和処理で抑制され、また CD44 欠損白血球においては見られなかった。以上の結果から、虫体に感染した白血球はその表面上に高レベルに発現している CD44 を介してヒアルロン酸に吸着していることが明らかになった。ヒアルロン酸は血管内皮表面や細胞外基質に豊富に存在する物質であることから、感染白血球表面の CD44 がトキソプラズマ原虫の宿主体内における播種的伝播に関与していることが示唆される。さらに CD44 を介した感染白血球の濃縮現象は CD11b 陰性細

胞よりも陽性細胞において顕著に見られた。これらの結果から、特に CD11b 陽性のミエロイド系の白血球に本原虫が感染するとヒアルロン酸の豊富な組織に定着しやすくなるものと考えられる。

第二章では、血中から臓器移行への感染白血球の移動時における CD44 の関与を検証した。CD44 欠損マウスあるいは野生型マウス白血球にトキソプラズマ原虫を感染させ、レシピエントとなるマウスの尾静脈から感染白血球を移入した。移入 2 時間後に末梢臓器に定着した虫体数の推定を行ったところ、野生型 CD44 または CD44 欠損白血球移入群間で有意差は認められなかった。本研究から、CD44 は感染白血球の血管内皮への接着など白血球組織遊走の初期段階には関与していないことを示唆している。感染白血球表面の CD44 は、血管外に脱出した後の結合組織への定着など、一連の遊走現象の後半で機能している可能性がある。

第三章ではタキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換に関わる因子について検証した。中間宿主に感染し全身へ播種的に伝播したタキゾイトのうち、脳や筋肉など特定臓器に侵入したタキゾイトは潜伏型虫体であるブラディゾイトへとステージ転換する。しかし生体内において、タキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換を起こす引き金となる要因は明らかになっていない。これまでに *in vitro* 実験系でタキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換を誘導する手法がいくつか報告されている。しかしその多くは高い pH や高温下に感染細胞を置くといったような、生体内では起こり得ない変化を与えるものである。しかし、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  阻害剤によってもこのようなステージ転換を誘導できることが知られている。MAPK p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  分子は多くの細胞・組織において各種ストレス刺激に対する応答に重要な因子であり、その活性は生体内で常に変動している。すなわち MAPK p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  阻害剤によるトキソプラズマのステージ転換は、生体内の現象を反映している可能性がある。そこで宿主細胞の MAPK p38 分子、とりわけ主要なアイソフォームである MAPK p38 $\alpha$  分子に着目し、この分子がトキソプラズマ原虫のステージ転換に関与しているか否か検証した。まず MAPK p38 $\alpha$  を欠損した細胞にタキゾイトを感染させたが、それだけではブラディゾイトは出現しなかった。このことから宿主 MAPK p38 $\alpha$  分子の活性が恒常的に欠損しているだけではトキソプラズマのステージ転換は起こらないことが分かった。さらに MAPK p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  阻害剤の一つである SB202190 添加により、MAPK p38 $\alpha$  欠損細胞に感染したタキゾイトにおいてステージ転換の開始が確認された。その頻度は MAPK p38 $\alpha$  を持つ細胞に感染したタキゾイトとほぼ同じであった。しかしながら、MAPK p38 $\alpha$  欠損細胞に感染した虫体では、ステージ転換の開始後におけるブラディゾイトの成熟レベルが MAPK p38 $\alpha$  を持つ細胞に感染した虫体に比べて有意に低かった。以上のことから宿主細胞の MAPK p38 $\alpha$  はタキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換の開始段階には関与していないものの、ブラディゾイトの成熟には部分的に関与していることが示唆された。

以上の通り本研究では、*T. gondii* 虫体の全身伝播およびステージ転換において、宿主の CD44 と MAPK p38 $\alpha$  がそれぞれ関与している可能性を示した。本研究で示された寄生体と宿主の相互作用に関する知見は、今後トキソプラズマ原虫の生活環を深く理解する上で重要な情報となる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

*Toxoplasma gondii* は偏性細胞内寄生性の原虫で、多種の哺乳類がその中間宿主となる。*T. gondii* は中間宿主体内ではタキゾイトと呼ばれる増殖型のステージとなって全身の諸

臓器へ移行する。また、脳や筋肉などでは潜伏型のブラディゾイトのステージとなる。しかし中間宿主体内における本原虫の複雑な挙動の詳細については未知の部分が多い。本研究では本原虫の挙動がどのような因子によって決定されるのか、宿主側因子を中心に検証した。

第一章では、タキゾイトに感染した白血球において CD44 の発現レベルが非感染白血球よりも高いこと明らかにした。さらに高レベルで発現した CD44 を介して感染白血球が固層ヒアルロン酸に効率よく接着することもあわせて証明した。ヒアルロン酸は血管内皮表面や細胞外基質に豊富に存在する物質であることから、感染白血球表面の CD44 がトキソプラズマ原虫の宿主体内における播種的伝播に関与していることが示唆される。第二章では、血中から臓器移行への感染白血球の移動時における CD44 の関与を検証し、CD44 は感染白血球の血管外遊走において、初期段階では関与があまりないことを示唆した。第三章ではタキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換に関わる因子について検証し、宿主細胞の MAPK p38 $\alpha$  の酵素活性レベルの変化が本原虫のステージ転換に関与する可能性を示した。また、MAPK p38 $\alpha$  はタキゾイトからブラディゾイトへのステージ転換の開始段階には関与せず、ブラディゾイトの成熟に関与していることがあわせて示唆された。

以上の通り本研究では、*T. gondii* 虫体の全身伝播およびステージ転換において、宿主の CD44 と MAPK p38 $\alpha$  がそれぞれ関与している可能性を示した。本研究で示された寄生体と宿主の相互作用に関する知見は、今後トキソプラズマ原虫の生活環を深く理解する上で重要な情報となる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

## 基礎となる学術論文

1) 題 目 : CD44 mediated Hyaluronan adhesion of *Toxoplasma gondii*-infected leukocytes

著 者 名 : Hayashi, T., Unno, A., Baba, M., Ohno, T., Kitoh, K.  
and Takashima, Y.

学術雑誌名 : Parasitology International

巻・号・頁・発行年 : In Press