

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 馬 場 み な み

題 目 Studies on the Mechanism of *Toxoplasma gondii* Selective Adhesion to and Egression from Host Cell  
(*Toxoplasma gondii* における宿主細胞への選択的接着と脱出機構に関する研究)

*Toxoplasma gondii* は細胞内に寄生する細胞内寄生性原虫で、人を含むほぼ全ての哺乳類・鳥類に感染する。本原虫は培養系においてはほぼ全ての種類の細胞に感染しうるが、宿主体内においては特定の細胞に好んで感染する。このように潜在的にはどのような細胞にも感染できるはずの本原虫が宿主体内で特定の細胞を選ぶメカニズムについては未だ分かっていない。本原虫は宿主生体内では通常標的としない種類の細胞であっても培養条件下では感染する。したがってこれらの細胞は本原虫侵入に必須となる受容体分子は保有しているということになる。つまり「細胞内感染性微生物の宿主細胞域は、当該微生物の侵入に必須となる受容体分子の有無で決まる」という細胞内寄生性微生物の分野で受け入れられている考え方はトキソプラズマにはあてはまらない。そこで本研究では、標的細胞上の特定の 1 分子の有無ではなく、細胞表面上に複数ある受容体分子の分布の違いに着目した。本原虫の感染に関与することが示唆される宿主側分子のうち、シアル酸は非常に多様な分子構造のバリエーションを持ち、生体内のほとんどの細胞表面に存在するが、その結合様式によって多様な立体構造をとりうる(生体内に多いのは  $\alpha 2,3$  結合および  $\alpha 2,6$  結合)。本研究で用いた原虫は  $\alpha 2,3$  結合シアル酸が全くない均一な細胞群 (Lec2 細胞) に対して感染できる。この原虫を  $\alpha 2,3/\alpha 2,6$  結合シアル酸をさまざまな比率で発現する細胞が混在したモデルを人為的に構築し加えたところ、 $\alpha 2,3$  結合シアル酸量が相対的に多い細胞に選択的に原虫が侵入した。本原虫が特定の細胞を選ぶメカニズムについて、 $\alpha 2,3$  結合シアル酸は感染成立に必須ではないが、複数種の細胞が混在した状況下では  $\alpha 2,3$  結合シアル酸の多い細胞が選択的に感染されていることを明らかにした。

また本原虫は全身の諸臓器へ伝播する際、白血球に感染し血流を移動するが、その中でも単球系の細胞に感染しやすいことが知られている。そこで、リンパ球や単球といった複数の細胞群からなる白血球集団において、本原虫が単球系へ選択的に感染する現象がシアル酸量で説明できるかどうか検証した。個々の白血球表面の  $\alpha 2,3$  結合シアル酸量が原虫感染の有無に与える効果をロジスティック回帰分析にて評価したところ、単球がリンパ球等に比べて多くの  $\alpha 2,3$  結合シアル酸を持っていること、個々の細胞表面上の  $\alpha 2,3$  結合シアル酸の多寡で感染成立の有無がほぼ推定できることが明らかになった。また、 $\alpha 2,3$  結合シアル酸以外にも感染成立の有無に有意に影響する要因の存在が示唆されたが、それらの要因は  $\alpha 2,3$  結合シアル酸がごくわずかにしかない状況でのみ機能しているものと推定された。

白血球に感染して血中へと侵入した本原虫が標的臓器に感染するためにはまず、血中の感染白血球が標的臓器内の毛細血管に接着し、臓器内に留まり、さらにこの感染白血球から原虫が脱出し、標的臓器を構成する細胞に感染する必要がある。この一連の現象がどのように起こっているのかは全く分かっていない。そこで本研究ではまず、生体内における感染白血球の挙動を明らかにするため、赤色蛍光タンパクを発現する組換え原虫を GFP マウスの白血球に感染させたのち、野生型マウスの血流中に移入した。経時的に臓器を採材

し、標的臓器に流入する白血球と虫体をそれぞれ緑色および赤色蛍光を指標に観察した。いくつかの臓器において感染白血球は非感染白血球よりも血管内皮に接着しやすく効率よく臓器内に留まっている傾向がみられ、肺では有意差が認められた。また肺に留まった感染白血球内の原虫の多くは4時間以内に白血球から脱出していた。肺において感染白血球の血管内皮細胞への接着と原虫の白血球からの脱出が同時に観察されたため、感染白血球の内皮細胞への接着が原虫の白血球脱出の引き金となっているのではないかと推測し、次の実験を行った。まず感染白血球を肺から取り出したばかりのマウス肺血管内皮細胞 (MLEC) と共培養した群と間にメッシュを入れ白血球と内皮が直接接触しない群を作成した。これら2群について白血球から脱出する原虫数を測定して比較した。非継代 MLEC に接着した感染白血球からの脱出虫体数は接着を許さず培養した時の数十倍であった。しかし、数代継代した MLEC を用いて同様の実験を行った場合、このような MLEC 接着白血球からの原虫の脱出は全く観察されなかった。以上から継代により原虫の脱出に必要な分子が消失したことが推測された。このため、接着に関する様々な遺伝子の発現量を非継代 MLEC と数代継代した MLEC 間で比較した。すると継代後に減少している分子が複数存在し、その中でも特に大きく減少していた CD162 分子について抗体による阻害実験を行ったところ、継代していない MLEC において観察された原虫の脱出は大きく減少した。以上から感染白血球の血管内皮接着がシグナルとなって原虫は白血球から脱出し、この脱出を補助する分子の一つとして CD162 分子が関与していることが明らかとなった。

本研究によって  $\alpha 2,3$  結合シアル酸の多寡が原虫の選択的感染を決定する因子のひとつであることを明らかにした。加えて特定の血管内皮への感染白血球の接着が原虫の脱出を引き起こすことが明らかとなった。本研究によりトキソプラズマ原虫の宿主体内伝播メカニズムの一端が解明された。

## 学 位 論 文 要 約

氏 名 BABA, Minami  
題 目 Studies on the Mechanism of *Toxoplasma gondii* Selective Adhesion to and Egression from Host Cell  
(*Toxoplasma gondii* における宿主細胞への選択的接着と脱出機構に関する研究)

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite that infects a broad range of intermediate hosts including human and livestock. Tachyzoites of *T. gondii* actively invade almost all types of nucleated cells. This wide host range suggests that *T. gondii* recognizes abundant components on the host cell surface. Despite their extremely wide host cell tropism, *T. gondii* tachyzoites preferentially infect particular types of animal tissue cells. The mechanism underlying the host cell preference of *T. gondii* is not yet known. It is difficult to explain host cell preference by the presence or absence of particular receptor molecules on the cell surface, because *T. gondii* can infect almost all cell types under certain conditions. This uniform infection suggests that almost all cell types have the receptor molecule(s) of *T. gondii*. Because of this, I hypothesized that the distribution pattern of preferential receptor molecule determine preferential infection of *T. gondii*.

Sialic acids, which are potential receptor molecules for *T. gondii*, are a family of sugars comprising one of the most abundant terminal monosaccharides on the surface of cells. Sialic acids are mostly linked to the penultimate galactose residues of carbohydrate side chains via  $\alpha 2,3$ - or  $\alpha 2,6$ -linkages. *T. gondii* could infect to a sialic acid-lacking mutant cell line derived from Chinese hamster ovary (CHO) cells but infection rate showed lower than that of wild type CHO cells both in my experiments and in a past study. Because CHO cells express  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids, not  $\alpha 2,6$ -linked sialic acids, this result indicated  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids worked as receptor molecules of *T. gondii*. Next, *T. gondii* added to ST6 cells that expressed both type of sialic acids in several expression patterns. In a subpopulation with a high level of  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids was significantly higher than that of a subpopulation with a low level of  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids. In contrast, the adhesion rate difference between the high level  $\alpha 2,6$ -linked sialic acid subpopulation and the low level  $\alpha 2,6$ -linked sialic acid subpopulation was small and statistically insignificant. These result suggested that *T. gondii* prefers  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids rich cell types but not  $\alpha 2,6$ -linked sialic acids when different expression pattern of sialic acids cell types was mixture.

*Toxoplasma gondii* tachyzoites infect leukocyte and transfer in the general circulation to the peripheral organs as leukocyte infected form. *T. gondii* also shows preferentially infection against leukocytes. Although *T. gondii* can infect each type of leukocyte including dendritic cells, monocytes, lymphocytes and neutrophils, myeloid cells are more susceptible to *T. gondii* infection than other types of leukocyte. However, it has not yet known how *T. gondii* prefers myeloid cells than

other cell types. To estimate the impact of the amount of  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids on the surface of each cell to *T. gondii* preferential infection to myeloid cells, fitting logistic regression analysis was carried out. Results of logistic analysis strongly suggested that the impact of the amount of  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids on the surface of each cell to *T. gondii* infection is much higher than that of CD11b positive myeloid cell specific factor(s). It can be interpreted that *T. gondii* preferentially infect CD11b positive myeloid cells because these cells express higher level of  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids than CD11b negative non-myeloid cells. It is also suggested that unknown alternative receptor molecule(s) is used only in the absence of  $\alpha 2,3$ -linked sialic acids and CD11b positive cells express higher level of the alternative receptor molecules than CD11b negative cells.

*Toxoplasma gondii*-infected leukocytes in the general circulation transport the tachyzoites to the peripheral organs. However, it is still unknown how *T. gondii* transit from the infected leukocytes in the general circulation to solid organs. Although *T. gondii* tachyzoites display a certain level of resistance to complement, their resistance levels are insufficient for continued survival in the bloodstream. For effective transition from leukocytes in the general circulation to solid organs, *T. gondii* must egress from the vehicle leukocyte near to the target organ thereby allowing egressed extracellular parasites to immediately enter target cells. To reveal the behavior of tachyzoite and leukocyte in host body, tachyzoite-infected leukocytes were injected into the tail vein of mice and visualized the flow of these leukocytes into the solid organs, lung and liver. Thirty minutes after injection, the infected leukocytes had reached the lung and liver. The frequency of detection of elongated cells among the total number of infected cells increased with time. According to this, the infection rate of leukocytes that remained in the lung was statistically higher than that of the injected leukocyte-suspension. In addition, the extracellular tachyzoite number increased during the 4h observation period. From these results, It has been hypothesized that the attachment of tachyzoite-infected leukocytes to endothelial cells triggers egression of tachyzoites. Therefore, mouse lung endothelial cells were isolated and co-cultured them with tachyzoite-infected leukocytes. As observed in the lung, tachyzoite-infected leukocytes in the co-culture system also attached to lung endothelial cells more effectively than did non-infected leukocytes. Extraleukocytic tachyzoites were detected after just 30 min of co-culture, and the number of extraleukocytic tachyzoites increased with time over the entire observation period. However, when tachyzoite-infected leukocytes were cultured alone or separated from endothelial cells by a 0.4 $\mu$ m mesh, the appearance of extraleukocytic tachyzoites was reduced.

When I focused on tachyzoite-infected leukocytes, many more infected leukocytes attached to the freshly isolated endothelial cells than few time passaged endothelial cells. In addition, egression of tachyzoites from the infected leukocytes was observed only when the vehicle leukocytes attached to the freshly isolated cells. These results indicated that the endothelial cells maintain the majority of endothelial properties but specifically lost the ability to selectively attach to tachyzoite-infected vehicle leukocytes and trigger tachyzoite egress, within only two to three passages. Therefore, it was compared that the expression level of 88 genes coding for cell adhesion related proteins between the freshly isolated and three times passaged endothelial cells. After three passages, the expression levels of 13 genes were decreased more than 2-fold. CD162 molecule was the one of the most decreased

gene. To examine whether CD162 molecules on the surface of endothelial cells induce tachyzoite egression from leukocytes, the freshly isolated lung endothelial cells were treated with anti-CD162 antibody before co-incubation with tachyzoite-infected leukocytes. This treatment of the freshly isolated endothelial cells drastically decreased the number of egressed tachyzoites. This indicated that CD162 molecules on the surface of the lung endothelial cells contribute to tachyzoite egress from the attaching leukocytes.

This study have revealed how *T. gondii* select the target cell and how the parasite senses the arrival to the target organ and then immediately egresses out for effective transition from blood flow to the target organs. The findings of this study will be conducive to deeply understanding for the mechanism of spread of *T. gondii* in the host body.