

氏名（本（国）籍）	馬 場 みなみ（岐阜県）
主指導教員氏名	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488号
学位授与年月日	平成29年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2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 Mechanism of <i>Toxoplasma gondii</i> Selective Adhesion to and Egression from Host Cell (<i>Toxoplasma gondii</i> 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)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 准教授 大 屋 賢 司 副査 帯広畜産大学 教 授 河 津 信一郎 副査 岩 手 大 学 教 授 板 垣 匡 副査 東京農工大学 准教授 鈴 木 和 彦 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。また培養系においてはほぼ全ての種類の細胞に感染しうるなど、本原虫の宿主域は非常に広い。しかしながら、宿主体内においては特定の臓器や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。本研究は宿主体内に侵入した本原虫が、標的となる宿主細胞および臓器にどのように侵入しながら全身へ拡散してゆくのか明らかにしようとするものである。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」という単純な考え方ではトキソプラズマの感染動態を説明できない。

そこで本研究の第一章では、標的細胞上の特定の1分子の有無ではなく、細胞表面上に存在する $\alpha 2,3$ 結合シアル酸の量の違いに着目し実験を行っている。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）。 $\alpha 2,3/\alpha 2,6$ 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、ここに本原虫を加えたところ、 $\alpha 2, 3$ 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。この結果から、個々の宿主細胞表面におけるシアル酸構造と量のちがいが感染標的となる細胞を、少なくとも部分的には、決めていることが示された。

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。そこで第二章では、白血球集団において、本原虫が単球系細胞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ている。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、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。第三章では、この一連の現象がどのように起こっているのかを検証している。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。

審 査 結 果 の 要 旨

Toxoplasma gondii は細胞内寄生性の原虫であり、培養条件下ではほとんど全ての細胞に感染する。これは本原虫が細胞に感染する際、複数の宿主細胞表面分子を受容体として利用できるためであると考えられている。その一方で生体に感染する際は好んで感染する細胞とそうではない細胞が存在する。しかし、どのような細胞にでも感染できる能力を持つ本原虫がなぜこのような「選り好み」を起こすのかは依然として不明なままである。また本原虫は生体に感染する際、白血球に乗り全身を移動し標的臓器に到達すると考えられている。しかしどのように白血球から脱出し標的臓器を構成する細胞に感染するのか、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。以上をふまえ、本学位論文では本原虫の受容体分子の一つであるシアル酸の多寡が本原虫の「選り好み」に影響するかを検証した。更に本原虫が白血球から脱出するトリガーを探索した。

学位論文の第一章では、培養細胞を用いて本原虫は α -2, 3 結合シアル酸の多い細胞を好んで感染していることを証明した。その一方で α -2, 6 結合シアル酸の多寡はほとんど影響を示さないことを証明した。第二章では、本原虫が好んで感染する白血球である単球系への感染におけるシアル酸の影響をロジスティック回帰を用いて推測した。その結果、全ての白血球への感染のほとんどが α -2, 3 結合シアル酸によって起こっており、リンパ球系の細胞と比較して α -2, 3 結合シアル酸の発現が高い単球系の細胞への選択的な感染が生じていることを推測した。また、 α -2, 3 結合シアル酸以外にも単球系の細胞を好む因子の存在が推察されたが、この因子は α -2, 3 結合シアル酸が存在しない状況下でのみ単球への選択的な感染に関与していることを推測した。第三章では、感染白血球の血管内皮接着がシグナルとなって本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を証明した。今後、本研究で用いたロジスティック回帰式を用いてシアル酸以外の受容体分子の影響を明らかにすること、感染白血球接着による原虫脱出の分子メカニズムを明らかにすることにより、更なるトキソプラズマ原虫の宿主体内伝播メカニズムの解明が期待される。

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 : The distribution pattern of α 2, 3- and α 2, 6-linked sialic acids affects host cell preference in *Toxoplasma gondii*
著 者 名 : Baba, M., Sato, M., Kitoh, K. and Takashima, Y.
学術雑誌名 : Experimental Parasitology
巻・号・頁・発行年 : 155 : 74-81, 2015

既発表学術論文

- 1) 題 目 : CD44 mediated hyaluronan adhesion of *Toxoplasma gondii*-infected leukocyte
著 者 名 : Hayashi, T., Unno, A., Baba, M., Kitoh, K. and Takashima, Y.

学術雑誌名 : Parasitology International

巻・号・頁・発行年 : 63 (2) : 479-484, 2014

- 2) 題 目 : Age-Specificity of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in sheep, goats and cattle on subsistence farms in Bangladesh

著 者 名 : Rahman, M., Azad, M. T. A., Nahar, L., Rauf, S. M. A., Ohya, K., Chiou, S., Baba, M., Kitoh, K. and Takashima, Y.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 76 (9) : 1257-1259, 2014

- 3) 題 目 : Removal of extracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites from suspended cell culture

著 者 名 : Baba, M., Kitoh, K. and Takashima, Y.

学術雑誌名 : Parasitology International

巻・号・頁・発行年 : 65 (5 Part B) : 536-538, 2016

- 4) 題 目 : *Theileria annulata* seroprevalence among different cattle breeds in Rajshahi Division, Bangladesh

著 者 名 : Ali, M. W., Alauddin, M., Azad, M. T. A., Hasan, M. A., Appiah-Kwarteng, C., Takasu, M., Baba, M., Kitoh, K., Rahman, M. and Takashima, Y.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 78 (10) : 1577-1582, 2016