

最新の特ピックス

TOPICS

トキソプラズマ HSP70による樹状細胞成熟分化と防御免疫誘導

信州大学医学部病理学・大学院医学系研究科感染防御学

青 才 文 江

I はじめに

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) は温血動物の細胞内に寄生する単細胞寄生虫 (原虫) で、ネコを終宿主、ヒトや家畜を中間宿主とする典型的日和見感染病原体である。最近、日本では先天性・後天性トキソプラズマ症の症例がともに確実に増加しており危機感をもっている (前者は妊娠年齢層を含めて安易に生肉を食べる機会が増えているためであり、後者は、非AIDS例においても、白血病の骨髄移植症例などに頻発している)。そこで、プロフェッショナル抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) を標的とする *T. gondii* 熱ショック蛋白 (HSP) 70による防御免疫誘導について私共の取り組みを紹介いたします。

II トキソプラズマ HSP70 と自然免疫

HSP70は種間ホモロジーの高い分子シャペロンでありながら、病原体由来 HSP70は宿主の防御免疫に高い抗原性を有する。*T. gondii* HSP70は、宿主の死亡直前に発現が急増する tachyzoite 特異的 virulent 分子であり、慢性トキソプラズマ症例の末梢血中の細胞傷害性T細胞 (CTL) がT細胞エピトープとして認識することを、既に明らかにしている¹⁾。細胞内寄生体感染に対する宿主防御免疫にはT細胞性防御免疫の誘導が必須であり、naïve T細胞活性化の惹起には成熟DCの刺激が必須である。末梢に存在するDCは未熟DCで、末梢で抗原刺激を受けた後に所属リンパ節に向けてmigrateしながら分化成熟し、十分な抗原提示機能を備えた成熟DCの司令によりT細胞は活性化される。筆者らは*T. gondii* HSP70の*in vitro*刺激により、未熟DC (ヒト単球由来DC, および、マウス骨髄由来DC) の分化成熟が誘導されることを、その発現分子 (MHC分子・アクセサリ分子) の増加、抗原取り込み能低下、アロ反応性T細胞活性化などで明らかにした²⁾。さらに、*T. gondii* HSP70

は自然免疫リセプターToll-like receptor (TLR) 2とTLR4のアゴニストであるが、このDC成熟誘導はTLR4を介し、TLR4の下流シグナルはMyD88非依存性でTRAM-TRIF pathwayを介することを、遺伝子欠損マウスを用いた実験系で解析した (図1)³⁾。

III トキソプラズマ HSP70 刺激成熟 DC による Th1 誘導

T. gondii HSP70刺激後の成熟DCではIL-12産生が増すことから、この成熟DCと非感染syngeneicマウスの脾臓T細胞を共培養したところ、著しいIFN- γ 産生がみられ、*T. gondii* HSP70刺激による成熟DCはsyngeneic T細胞も活性化しTh1を誘導することが確認された。トキソプラズマに一度感染した宿主では、急性期以後もシスト内bradyzoiteとして感染が終生継続し後に急性増悪する危険性があるため、慢性期まで継続する防御免疫誘導が必要である。そこで、トキソプラズマ感染急性期 (1w P.I.) または慢性期 (6w P.I.) のマウス脾臓T細胞と*T. gondii* HSP70刺激成熟DCを共培養すると、IFN- γ 産生の更なる増加がみられ、慢性期の防御免疫能も強化されることが判った。IFN- γ は、NO産生によるtachyzoite発育抑制や、急性増悪時にみられるbradyzoiteからtachyzoiteへのstage変換のdown regulationを誘導する。

IV DC 標的トキソプラズマ HSP70 遺伝子ワクチン

これらの背景から、DCを標的とする*in vivo T. gondii* HSP70遺伝子ワクチン開発に着手した。マウスの腹部皮膚DCを標的とする遺伝子ワクチン後、所属リンパ節DCから明らかなIL-12産生がみられ5日後にpeakをみた。また、所属リンパ節CD4⁺T細胞のIFN- γ 産生も5日後にmaximumに達し、DC活性化に引き続いて早期からTh1誘導がみられることが確認された³⁾。さらに、DCのIL-12産生、Th1誘導、

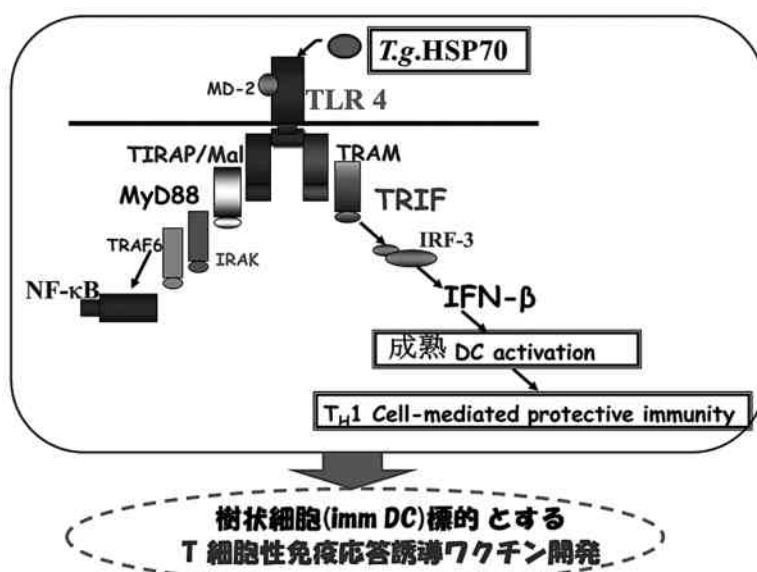


図1 *T. gondii* HSP70刺激による DC 成熟・ T_H1 防御免疫誘導に関わる自然免疫シグナル経路

ワクチン効果の発現は、TLR4/MyD88 pathway を介し、MyD88依存性については DC 成熟化における非依存性と異なった³⁾。但し、HSP70においては私共と同様に、MyD88依存性・非依存性の両シグナル経路が関わる報告が独米などの研究機関からもなされており、今後、他の細胞内シグナル cascade との関連やTLR2/4のheteromer機能の解析などが待たれる。この遺伝子ワクチンは、トキソプラズマの他のワクチン候補遺伝子 (tachyzoite 特異的 SAG1遺伝子やbradyzoite 特異的 BAG1遺伝子) に比べて優れた効果を発揮し、また、私共が宿主感染死メカニズムの一つであることを報告した本蛋白による PAF 依存性致死性アナフィラキシー反応や、自己抗 HSP70抗体産生などの、*T. gondii* HSP70蛋白による danger signal を回避する。

V トキソプラズマ HSP70 遺伝子ワクチンによる CTL 誘導

IFN- γ はトキソプラズマ感染に対する宿主防御免疫に必須であり、既に *T. gondii* HSP70遺伝子ワクチンによる $Th1$ 誘導を明らかにしたが、 $CD8^+$ T細胞やNK細胞からも産生される。また、IFN- γ 欠損マウスでも有意なワクチン効果がみられたことから、ワクチンの防御免疫誘導にはIFN- γ 依存性・非依存性メカニズムの両者が関わる。

そこで、次に、*T. gondii* HSP70遺伝子ワクチンによる CTL 誘導を解析し、本ワクチンにより、 $CD8^+$

CTL および $CD4^+$ CTL の両者が誘導されることを明らかにした⁴⁾。本遺伝子ワクチンが誘導するこれらの CTL は、① *T. gondii* HSP70蛋白パルス syngeneic DC細胞株 (DC2.4) や *T. gondii* HSP70遺伝子導入 DC細胞株 (DC2.4-*T. gondii* HSP70) を標的とした特異的細胞傷害活性のみならず、トキソプラズマ感染DC2.4に対しても特異的細胞傷害活性を示すことが明らかになり、さらに、②これらのCTLの移入感染実験により、感染急性期および慢性期における明らかな感染防御免疫が誘導されることが解析された⁴⁾。また、③ $CD8^+$ および $CD4^+$ CTLによる細胞傷害機構は、perforin/granzymeのcytotoxic granulesに比し、Fas/Fas Ligandを介する傷害機構が優位であった。本ワクチン後は $CD8^+$ および $CD4^+$ T細胞からのIFN- γ 産生も増加しており、ワクチンが誘導する $CD8^+$ および $CD4^+$ T細胞は、共に、IFN- γ 産生と感染細胞特異的CTL機能によりトキソプラズマ感染に対する防御免疫を担っていることが解析された⁴⁾。

以上の結果を踏まえ、現在、先天性トキソプラズマ症に対し、特に胎児画像所見に異常のない感染妊婦と不顕性新生児を対象として、MHC分子結合*T. gondii* HSP70ペプチドCTLエピトープの*ex vivo*パルスによる自己DCワクチン導入を進めている。

VI おわりに

私はかつて本学に在籍しておりました。昨年より30年振りに再び古巣で研究させて頂いており、この場を

拝借して研究継続の機会を与えて下さいました中山 　　たします。
淳教授，高本雅哉特任教授，信大医学部諸氏に深謝い

文 献

- 1) Yang TH, Aosai F, Norose K, Mun HS, Yano A : Heat shock cognate protein 71-associated peptidess function as an epitope for *T. gondii*-specific CD4⁺ CTL. *Microbiol Immunol* 41 : 553-561, 1997
 - 2) Aosai F, Rodriguez Pena MS, Mun HS, Fang H, Mitsunaga T, Norose K, Kang HK, Bae YS, Yano A : *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70 stimulates maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 4. *Cell Stress Chaperones* 11 : 13-22, 2006
 - 3) Makino M, Uemura N, Moroda M, Kikumura A, Piao LX, Mohamed RM, Aosai F : Innate immunity in DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-heat shock protein 70 gene that induces DC activation and Th1 polarization. *Vaccine* 29 : 1899-1905, 2011
 - 4) Chu D, Moroda M, Piao LX, Aosai F : CTL induction by DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-HSP70 gene. *Parasitol Int* 63 : 408-416, 2014
-