

称号及び氏名	博士（獣医学）	加藤 美穂子
学位授与の日付	平成23年8月31日	
論文名	マウスにおける <i>Toxoplasma</i> 特異的ヘルパーT細胞 type-1 型免疫応答誘導に関わる <i>Toxoplasma</i> 溶解抗原に含有するタンパク質成分に関する研究	
論文審査委員	主査	久保 喜平
	副査	小崎 俊司
	副査	児玉 洋
	副査	大西 義博

論文要旨

【目的】 偏性細胞内寄生原虫 *Toxoplasma gondii* (以下 Tp) は、アピコンプレックス門 (Apicomplexa)、孢子虫綱 (Sporozoasida)、真コクシジウム目 (Eucoccidiorida)、アイメリア亜目 (Eimeriorina) に属し、ヒトを始めとした多くのほ乳類や鳥類などの温血動物を中間宿主として感染する。妊婦が Tp に感染すると、母体から胎盤を経由して胎児への感染が成立し、流産、死産あるいは水頭症などの新生児機能不全症を引き起こすことが報告されている。さらに、Tp 初感染に耐過した状態でも、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immuno-Deficiency Virus; HIV) 感染に伴う後天性免疫不全症候群 (Acquired Immuno-Deficiency Syndrom; AIDS) の発症により、免疫機能が抑制され脳などの組織内で Tp が再増殖して致死的なトキソプラズマ脳炎を発症することが報告されている。Tp 感染に対する生体内の防御機能が誘導されるには、細胞性免疫応答が亢進される必要がある。

そこで本研究では、マウスに Tp 特異的細胞性免疫応答を誘導することが報告されている *Toxoplasma* 溶解抗原 (*Toxoplasma gondii* lysate antigen; TLA) に着目した。TLA を投与されたマウスでは、マラリア原虫やバベシア原虫の感染に対して Th1 細胞型免疫応答が誘導され、感染抵抗性を示すことから、TLA には Tp 特異的 Th1 細胞型免疫応答に関連するタンパク質成分が存在すると考えた。Th1 型細胞性免疫応答の誘導に関わる Tp の抗原領域が特定出来れば、Tp 感染に対する予防法を確立する上で有益な情報となる。マウスにおいて Tp 特異的 Th1 細胞型免疫応答を誘導する可能性が考えられる Tp の抗原成分として p24 (GRA1) および p30 (SAG1) に着目し、TLA 中の Tp 特異的細胞性免疫応答、すなわち Th1 細胞型免疫応答誘導に関連するタンパク質成分とその二次構造的特徴を検討することを目的とした。

【 I 章】 Tp 溶解抗原 (TLA) に対するマウス脾臓 T 細胞の特異的増殖反応における p24 (GRA1) および p30 (SAG1) の関与

TLA が投与されたマウス脾臓 T 細胞は、TLA 特異的な増殖反応を示し細胞性免疫を誘導する。この TLA 特異的な増殖反応を誘導する Tp の抗原成分として p24 および p30 の関与を検討した。まず、TLA 中における両抗原の存在と各々の含有率を確認するため、SDS-PAGE およびウェスタン-ブロッティングを行った。Tp の total RNA を材料として、p24 および p30 の CDS 領域を RT-PCR にて増幅し、発現ベクターへクローニングした。作製した発現ベクターを用いて組み換えタンパク質 (rp24 および rp30) を回収した後、マウスに投与し、抗 rp24 および rp30 血清を得た。TLA を SDS-PAGE し、PVDF 膜に転写した後、得られた抗血清を用いて反応させたところ、TLA 中に p24 および p30 の存在が確認された。さらに TLA の SDS-PAGE 染色像から、TLA 中の総タンパク質量に対する p24 および p30 の含有率を求めた結果、各々約 3.0%、1.2%であった。

次にマウス脾臓 T 細胞における TLA 特異的増殖反応に対する p24 および p30 の関与を検討した。TLA 感作マウス脾臓内 T 細胞と付着性細胞を共培養し、各々同一濃度の TLA、rp24 および rp30 を添加した群と、抗原無添加培養群を 5 日間培養後、増殖活性の指標となる細胞内 ATP 活性を測定した。TLA 感作マウス脾臓 T 細胞の増殖反応は、無添加培養群に対して TLA、rp24 および rp30 添加培養群はいずれも有意に増殖反応を示したが、rp24 に比較して rp30 の方が添加抗原濃度依存的で、なおかつ TLA 添加群に類似した増殖活性が確認された。

【 II 章】 p24 および p30 の Th1 細胞型免疫応答誘導能の比較

rp24 および rp30 抗原感作マウス脾臓 T 細胞と付着性細胞におけるサイトカイン mRNA の発現を比較した。rp24 および rp30 を同一濃度で感作したマウス脾臓内 T 細胞と付着性細胞に対し、*in vitro* において感作抗原と同一抗原で刺激して増殖反応を確認した。感作抗原と同一抗原で刺激したマウス脾臓内 T 細胞と付着性細胞においては、rp24、rp30 共に抗原濃度依存的な増殖活性を示したことから、同一条件で脾臓 T 細胞と付着性細胞を調整後、細胞から total RNA を回収し、IFN- γ および IL-12 の各サイトカイン mRNA の発現を RT-PCR により確認した。また各培養群においてハウスキーピング遺伝子である mouse β actin mRNA の発現も RT-PCR で確認し、得られた PCR 産物を対照として各抗原刺激におけるサイトカイン mRNA 発現との比較を行った。rp24 および rp30 感作マウスともに IFN- γ と IL-12 mRNA の発現が認められた。しかし両サイトカインと対照となる mouse β actin の mRNA の発現を比較すると、rp30 感作マウスの方が p24 感作マウスよりも IFN- γ および IL-12 共に mRNA の発現が高い傾向を示した。

次に、p24 および p30 抗原感作マウス血清に産生される感作抗原特異的 IgG サブクラスを比較した。感作抗原特異的に産生される血清中の総 IgG、IgG1 ならびに IgG2a 抗体価を、間接 ELISA 法により測定した。総 IgG 抗体価においては、双方の感作マウスにおいて感作抗原特異的な産生が確認され、両抗原間に有意な差は認められなかった。次に Th2 細胞型のサブクラスである IgG1 では、rp24 感作マウスに比較して rp30 感作マウスの方が有意に低値を示したが、一方 Th1 細胞型のサブクラスである IgG2a では、rp30 感作マウスの方が有意に高値を示した。I 章ならびに II 章の TLA 感作マウスおよび各抗原感作マウスを用いた増殖反応の結果より、p24 および p30 共に TLA 特異的マウス脾臓内 T 細胞の増殖に関与するが、p24 は TLA に含有した状態では他の抗原成分との相互作用により増殖活性に影響を受ける可能性が高く、p30 よりも TLA 特異的増殖反応に

おける関与が低い傾向にあることが判明した。また Th1 細胞から産生される IFN- γ および Th1 細胞の分化誘導を担う IL-12 のいずれのサイトカイン mRNA の発現も p30 による刺激を受けたマウスの方が高く、さらに Th1 細胞が産生に関与する IgG2a の抗体価も p30 感作マウスの方が有意な差を示したことから、TLA の Th1 細胞型免疫応答誘導における p30 の関与が考えられた。

【Ⅲ章】 Th1 細胞型免疫応答を誘導する p30 ペプチド領域と構造的特徴

Th1 細胞型免疫応答の誘導に関係する p30 のペプチド領域とその二次構造的特徴を明らかにすることを目的として、合成ペプチドを用いて評価を行った。p30 のシグナル配列 (アミノ酸 No.1-47) を除くアミノ酸全領域 (アミノ酸 No.48-336) に対し、1 ペプチドあたり 20 アミノ酸残基数程度で、前後配列を 3-6 アミノ酸ずつオーバーラップするようにデザインし 20 本のペプチドを合成した。この合成ペプチドをマイクロプレートに塗布したものをを用い、rp30 感作マウス血清中の IgG2a が特異的に反応するアミノ酸領域を間接 ELISA 法により検討した。アミノ酸 No.120-136 の領域で特異的反応が確認された。さらにマウス脾臓 T 細胞において IFN- γ の産生を誘導するペプチド領域を検討した。rp30 感作マウス脾臓内 T 細胞に各合成ペプチドを *in vitro* で添加培養し、培養上清中に分泌される IFN- γ 濃度をサンドイッチ ELISA 法により測定した。アミノ酸 No. 76-136 の領域が陽性コントロールとなる rp30 添加培養群よりも有意に IFN- γ の産生が高値であった。中でもアミノ酸 No.120-136 の領域が他のペプチド領域と比較して IFN- γ 産生に関与している傾向を示した。

p30 の 2 次構造モデル予測と抗原性検索を実施した。T 細胞エピトープが予測される領域は、アミノ酸 No.48-150 までの範囲に集約していた。また rp30 感作マウス血清中の IgG2a の反応性と IFN- γ 産生への関与が確認されたアミノ酸 No.120-136 の付近は、turn 構造を取る可能性が高く、電荷を帯びたアミノ酸が連続し親水性に富む領域である。この領域は、細胞表面に表現されるため抗原性が高く、エピトープとして認識され易い二次構造的特徴と一致していた。

【総括】

1. TLA には分泌型抗原である p24 と膜結合型抗原の p30 がいずれも存在しており、マウス脾臓内 T 細胞の TLA 特異的増殖反応には、p30 の関与が示された。
2. 脾臓内 T 細胞と付着性細胞におけるサイトカイン mRNA の発現および感作抗原特異的に産生された IgG サブクラスより、p30 は TLA が誘導するマウス脾臓内 T 細胞における Th1 細胞型免疫応答に関与すると考えられた。
3. rp30 感作血清中 IgG2a が反応する p30 ペプチド領域と IFN- γ の産生に関与するペプチド領域をスクリーニングした結果、p30 の Th1 型細胞免疫応答に関与する領域は、アミノ酸 No. 120 から 136 の領域に集約していることが判明した。

審査結果の要旨

偏性細胞内寄生原虫 *Toxoplasma gondii* (以下 Tp) は、アピコンプレックス門 (Apicomplexa)、孢子虫綱 (Sporozoasida)、コクシジウム目 (Eucoccidiorida)、アイメリア亜目 (Eimeriorina) に属し、ヒトを始めとした多くのほ乳類や鳥類などの温血動物を中間宿主として感染する。Tp 感染に対する生体内の防御機能が誘導されるには、細胞性免疫応答が亢進される必要がある。マウスに Tp 特異的細胞性免疫応答を誘導することが報告されている *Toxoplasma* 溶解抗原 (*Toxoplasma gondii* lysate antigen; 以下 TLA)には Tp 特異的 Th1 細胞型免疫応答に関連するタンパク質成分が存在すると考えられる。本研究では、Tp の抗原成分として分泌型抗原である p24 (GRA1)および膜結合型抗原である p30 (SAG1) に着目し、TLA 中の Tp 特異的細胞性免疫応答、すなわち Th1 細胞型免疫応答誘導に関連するタンパク質成分とその二次構造的特徴を検討することを目的とした。

第一章では、TLA 特異的な増殖反応を誘導する Tp の抗原成分として p24 および p30 の関与を検討した。報告されている塩基配列をもとに作製した p24 および p30 の組み換えタンパク質 (rp24 および rp30)を、BALB/c マウスに投与して、抗血清を得た。これらの抗血清を用いて、TLA 中の p24 および p30 の存在を確認した。TLA によって感作したマウスより分離した脾臓内 T 細胞と付着性細胞を共培養し、各々同一濃度の TLA、rp24 および rp30 を添加した群と、抗原無添加培養群を 5 日間培養後、増殖活性を検討した。この結果、無添加培養群に対して rp24 および rp30 はいずれも TLA 感作マウス脾臓 T 細胞の増殖を促すことが明らかとなった。また、rp24 に比較して、rp30 の方が TLA 添加群に類似した濃度依存的な増殖活性を示すことを明らかにした。

第二章では、p24 および p30 の Th1 細胞型免疫応答誘導能について比較検討を行った。rp24 および rp30 で感作したマウスの脾臓内 T 細胞と付着性細胞を、*in vitro* において感作抗原で刺激して増殖反応を確認後、細胞より total RNA を回収し、RT-PCR により IFN- γ および IL-12 の各サイトカイン mRNA の発現を調べた。その結果、rp24 および rp30 感作マウスともに IFN- γ と IL-12 mRNA の発現が認められること、さらに、rp30 感作マウス由来細胞の方が、高い IFN- γ および IL-12mRNA の発現を示すことを明らかにした。マウスにおいては、Th1 細胞型および Th2 細胞型免疫応答では、それぞれ IgG2a および IgG1 イムノグロブリンの産生が有意に高いことが知られている。そこで、p24 および p30 抗原感作マウス血清に産生される感作抗原特異的 IgG サブクラスを比較した結果、rp24 感作マウスでは有意に IgG1 高値を示し、一方、rp30 感作マウスの方が有意に IgG2a 高値を示した。これらの結果より、TLA の Th1 細胞型免疫応答誘導において、p30 が大きな役割を担うことが強く示唆された。

第三章では、Th1 細胞型免疫応答の誘導に関係する p30 のペプチド領域とその二次構造上の特徴を明らかにすることを目的として、合成ペプチドを用いた評価を行った。p30 のシグナル配列 (アミノ酸 No.1-47) を除くアミノ酸全領域 (アミノ酸 No.48-336) に対し、前後 3-6 アミノ酸ずつ重複させた 20 本のペプチドを合成した。rp30 感作マウス血清中の IgG2a が特異的に反応するアミノ酸領域を間接 ELISA 法により検討した結果、アミノ酸 No.120-136 の領域で特異的反応が確認された。さらにマウス脾臓 T 細胞において IFN- γ の産生を誘導するペプチド領域を検討した。rp30 感作マウス脾臓内 T 細胞に各合成ペプチドを添加し、培養上清中に分泌される IFN- γ 濃度をサンドイッチ ELISA 法により測定した。この結果、アミノ酸 No. 76-136 の領域を含むペプチドが陽性

対照の rp30 添加培養群に比べて有意に IFN- γ の産生が高値を示した。また、これらの中で、アミノ酸 No.120-136 のペプチド添加群が最も高い IFN- γ 産生を示した。そこで、p30 の二次構造モデル予測と抗原性検索を実施した結果、T 細胞エピトープが予測される領域は、アミノ酸 No.48-150 までの範囲に集約していた。この中でも、rp30 感作マウス血清中の IgG2a の反応性と IFN- γ 産生への関与が確認されたアミノ酸 No.120-136 の付近は、turn 構造を取る可能性が高く、電荷を帯びたアミノ酸が連続し、親水性に富む領域であった。この領域は、細胞表面に表現されるため抗原性が高く、エピトープとして認識され易い二次構造的特徴を有すると考えられる。

以上、本研究は、TLA に含まれる分泌型抗原である p24 と膜結合型抗原の p30 のうち、p30 が TLA 特異的増殖反応に関与し、TLA が誘導するマウス脾臓内 T 細胞における Th1 細胞型免疫応答に大きく寄与することを明らかにした。さらに、p30 の Th1 型細胞免疫応答に関与する候補領域が、アミノ酸 No. 120 から 136 の領域に存在することを明らかにした。

これらの成果は、獣医学および医学領域の疾病制御学研究的発展に貢献するものであり、本論文の審査および学力確認試験の結果から博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。