

ヒトの脳におけるトキソプラズマ潜伏感染機構の包括的な解明

旭川医科大学 感染症学講座 寄生虫学分野 准教授
伴戸 寛徳

要旨

寄生虫トキソプラズマ *Toxoplasma gondii* は、ヒトの脳内に侵入後、緩増虫体（ブラディゾイト）としてシストを形成し、宿主免疫の低下に伴って再活性化することで重篤なトキソプラズマ症を引き起こす人獣共通感染症の病原体である。近年、患者数は増加傾向にある一方で、潜伏感染および再活性化機構の詳細は未解明であり、根治的治療法はいまだ確立されていない。本研究では、ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 実験モデルを構築し、トキソプラズマの脳侵入から潜伏感染、再活性化に至る過程を、非侵襲的かつ時系列的に評価可能な実験基盤を確立した。さらに、本実験系を用いた解析により、再活性化に関与するトキソプラズマ分泌タンパク質 CLP1 を同定し、その機能的役割を明らかにした。これらの成果は、ヒト脳内における宿主-原虫間相互作用の理解を進めるとともに、新規創薬戦略の創出に向けた研究基盤の構築に貢献するものである。

背景・目的

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) は、食品や動物との接触を介してヒトに感染し、中枢神経系に潜伏寄生する人獣共通感染症の原因となる原虫である[1]。近年、食品流通の拡大や食生活の多様化、ヒトと動物の生活環境の重なり増加により、トキソプラズマ症の感染リスクおよび患者数は世界的に増加傾向にある[2, 3]。特に免疫不全患者や妊婦では、重篤な神経症状や先天性感染を引き起こす可能性があり、公衆衛生上の重要課題となっている。

一方で、本原虫はヒト脳内で長期間潜伏感染を維持し、免疫状態の変化により再活性化する特性を有するにもかかわらず、その分子機構や宿主細胞との相互作用は十分に解明されていない[4,5]。このことが、予防薬や根治的治療薬の開発が進まない主要な要因となっている。

本研究では、ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 実験モデルを構築し、ヒト脳環境を模倣した実験系を確立する。このモデルにトキソプラズマを感染させ、潜伏感染の成立過程および再活性化の分子メカニズムを解析することで、従来の動物モデルや単一細胞系では困難であったヒト脳内における宿主-寄生体相互作用を解明する。最終的に、得られた知見を基盤として新規予防戦略および治療標的の同定につなげ、次世代の創薬開発に向けた研究基盤を構築することを目的とする。

方法

1. 遺伝子組換えトキソプラズマ原虫 (*T. gondii* Dual) の作製

再活性化を非侵襲的かつリアルタイムに評価するため、急性感染期（タキゾイト）特異的遺伝子 *SAG1* のプロモーター下で RFP を、潜伏感染期（ブラディゾイト）特異的遺伝子 *BAG1* のプロモーター下で

GFP をそれぞれ発現する二重レポーター遺伝子組換え原虫 (*T. gondii* Dual) を作製した。CRISPR/Cas9 システムを用いてレポーター遺伝子を原虫ゲノムへ導入し、薬剤選択およびクローニングにより安定発現株を樹立した。

2. 潜伏感染および再活性化誘導培養系の構築

T. gondii Dual タキゾイトを宿主細胞に感染させた後、pH8.2 のアルカリ性培地を用いてブラディゾイトへのステージ変換を誘導し、潜伏感染モデルを構築した。再活性化誘導時には培地条件を pH7.2 へ切り替え、タキゾイトへの再変換を促した。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて、GFP および RFP の発現変化をライブイメージングにより連続的に観察した。

3. CLP1 欠損株の機能解析

CRISPR/Cas9 法により CLP1 遺伝子欠損株を作製し、野生型原虫と比較して、宿主細胞侵入率の定量評価・宿主細胞内増殖率の比較解析・潜伏感染率およびシスト壁形態の評価・再活性化率の定量評価を行った。

結果

1. 二重レポーター原虫による再活性化評価系の確立

T. gondii Dual タキゾイトは RFP を発現し、pH8.2 条件下で培養することで GFP を発現するブラディゾイトへとステージ変換した。さらに、pH7.2 条件へ移行すると GFP 発現が消失し、再び RFP を発現するタキゾイトへの再活性化が確認された (図 1)。これにより、蛍光シグナルの変化を指標として、非侵襲的に再活性化を評価可能な実験系を確立した。

2. CLP1 の機能解析

潜伏感染状態のブラディゾイトおよび再活性化誘導後の原虫から RNA を抽出し、RNA-seq 解析により発現変動遺伝子を同定した。その結果、再活性化過程において複数遺伝子の発現上昇が認められた。HA タグ付加原虫を用いた免疫染色により、TGME49_293770 (CLP1)、TGME49_022300、TGME49_062930、TGME49_112950 の 4 種タンパク質が再活性化時に発現していることを確認した。このうち CLP1 に着目して機能解析を行った結果、CLP1 欠損 (CLP1-KO) 原虫と野生型原虫の間で宿主細胞への侵入率および細胞内増殖率に有意な差は認められなかった。

一方、潜伏感染率およびシスト壁形態には差が認められなかったが (図 2A)、再活性化率は CLP1-KO 原虫において有意に低下していた (図 2B)。これらの結果から、CLP1 は潜伏感染の成立には関与せず、再活性化過程に特異的に重要な役割を果たす分子であることが示唆された。

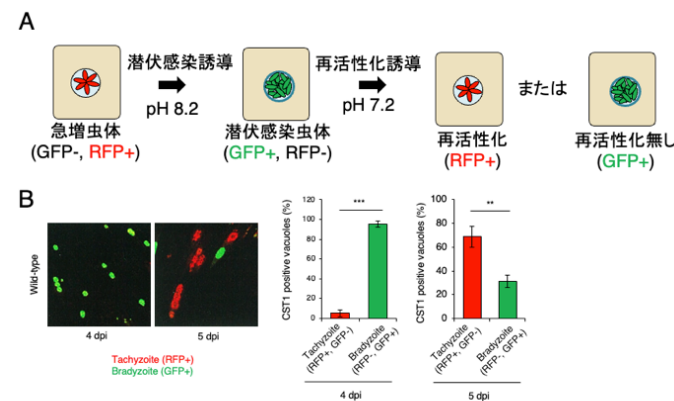


図1: 潜伏感染と再活性化の評価系の構築

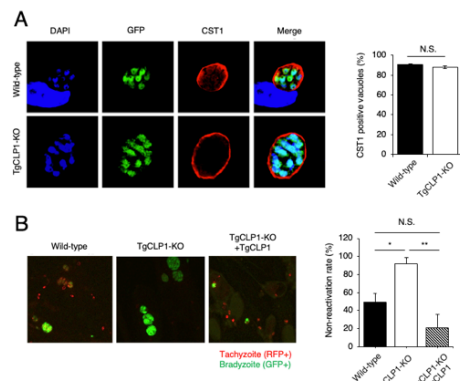


図2: CLP1欠損原虫の表現系解析(ブラディゾイト)

考察

本研究では、ヒト脳内環境を模倣した *in vitro* モデルと二重レポーター遺伝子組換えトキソプラズマを組み合わせることで、従来困難であった再活性化過程を評価する実験系の構築に成功した。この技術的基盤は、トキソプラズマ研究分野において再活性化メカニズムの解明を加速させる汎用的プラットフォームとなることが期待される。さらに、本研究により、CLP1 を含む複数の再活性化関連分子を同定し、特に CLP1 が再活性化過程に特異的に関与することを明らかにした点は、国内外において新規性および学術的インパクトが高い。これまで、トキソプラズマの再活性化を標的とした分子レベルの研究や創薬研究はほとんど行われておらず、本成果は新たな治療戦略の創出につながる重要な知見である。

今後は、CLP1 を中心とした関連シグナル経路および相互作用分子の同定を進めるとともに、化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングを実施し、再活性化を選択的に阻害する低分子化合物の探索を行う予定である。これにより、トキソプラズマ症に対する革新的な予防・治療薬開発への道を切り拓くことが期待される。本研究成果は、免疫不全患者や妊婦などハイリスク集団における重症化予防に資するだけでなく、食品安全対策や人獣共通感染症対策といった公衆衛生分野への波及効果も大きいと考えられる。

共同研究者

該当なし

引用論文

- [1] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000. 30:1217–1258.
- [2] Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004. 363:1965–1976.
- [3] Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012. 25:264–296.
- [4] Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, et al. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin Microbiol Rev.* 2018. 31:e00057-17.
- [5] Weiss LM, Kim K, eds. *Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan—Perspectives and Methods. 2nd ed. *Academic Press*; 2014. 1–40.

助成研究に関連した発表論文

1. Bando H, Murata Y, Han Y, et al. *Toxoplasma gondii* chitinase-like protein TgCLP1 regulates the parasite cyst burden. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024.
2. Ishii K, Akahoshi E, Adeyemi OS, et al. Goethite and Hematite Nanoparticles Show Promising Anti-Toxoplasma Properties. *Pharmaceutics.* 2024.