

学位論文題名

Studies on the molecular mechanisms underlying
host lymphocyte-transformation by *Theileria parva*

(*Theileria parva* 感染による宿主リンパ球トランスフォーメーションの
分子機構解明に関する研究)

学位論文内容の要旨

*Theileria parva*はウシ、アフリカ水牛を宿主としマダニによって媒介される細胞内寄生原虫であり、アフリカ諸国での家畜生産に与える本原虫感染の被害は甚大である。しかし現在のところ実施可能な予防、治療対策には様々な制約があり、より実行可能な対策の確立が望まれている。その基盤となるタイレリア原虫の生物学的特性、特に病態形成に重要なリンパ球内寄生ステージの研究は有効な治療、予防法を開発する上で重要である。

本原虫感染による死因はリンパ球増多症による多臓器障害であるが、これはシゾント期タイレリア原虫が寄生したリンパ球が不死化し無限増殖能を獲得、あたかも癌化細胞の様に分裂増殖を繰り返す事に起因する。タイレリア原虫は細胞に侵入した後は寄生虫胞から脱出して直接宿主細胞質に接していることから、宿主細胞トランスフォーメーションに寄与する分子は、虫体の膜表面に局在する蛋白質あるいは分泌蛋白質である事が予想されているが、未だ宿主細胞に作用を及ぼす原虫分子は同定されていなかった。本研究は*T. parva*原虫感染で見られる特徴的な細胞トランスフォーメーション機構を解明することを目的に実施した。

第一章ではシゾント期蛋白質TpSCOP (*T. parva* schizont-derived cytoskeleton binding protein)の発現が宿主細胞シグナル伝達系に及ぼす影響について解析を行った。TpSCOPは、良性タイレリアである*T. orientalis*と*T. parva*の比較ゲノム解析を行う過程において*T. orientalis*のメロゾイト期蛋白質として知られるToMRPのオルソログとして同定された。TpSCOPは*T. parva*のシゾント期で原虫膜表面に局在していた事、およびオルソログであるToMRPが赤血球膜骨格系蛋白質であるBand3への結合性を示す事から、TpSCOPも宿主細胞質に直接作用している可能性があるかと推測した。まず、免疫沈降法により本分子と相互作用する宿主分子の同定を試みた結果、アクチン分子との結合能が確認できた。さらに、TpSCOPを強制発現させたマウスT細胞株 (3A9/TpSCOP) を作製

し、本細胞株がFasおよびTCR刺激誘導性アポトーシスに抵抗性を示すこと、また細胞内でMAPK群およびNF- κ B経路活性化が起きており、最終的にNF- κ Bが活性化されていることを明らかにした。タイレリア感染細胞では原虫周囲にアクチンが集積していること、およびサイトカラシンによるアクチン処理により抗アポトーシス経路であるNF- κ B経路が活性化することが報告されており、感染細胞内におけるアクチン分子の変化と感染細胞不死化との関連性が近年指摘されてきている。これらの結果から、TpSCOPは宿主アクチンに作用する事で、NF- κ B経路の活性化を誘導している事が示唆された。一方、TpSCOPを発現させたIL-2依存性細胞株CTLL-2/TpSCOPではIL-2に対する反応性は高まったものの、完全には非依存性とはならなかった。この事から感染細胞の無限増殖能という現象に、NF- κ B活性化による刺激誘導性アポトーシス抑制機構が関与しているが、この機構とIL-2非依存性増殖とはそれぞれ独立した細胞現象である事が考えられ、タイレリア感染による宿主細胞トランスフォーメーション機構の全体像の把握にはTpSCOPと共同して機能する原虫分子のさらなる探索が必要であると考えられた。

第二章では*T. parva*感染細胞においてその増殖を制御しているシグナル分子を同定する目的で、抗癌作用を有する190種類の阻害剤のスクリーニングを行い、MDM2に対する阻害剤が極めて高い特異性で増殖を阻害することを明らかにした。MDM2はp53に結合してプロテアソーム依存性の分解を引き起こす事で、p53誘導性のアポトーシスを抑制するとされている。また、MDM2は多くの癌細胞で過剰発現している事が知られていることから、タイレリア感染細胞においてもMDM2の異常発現やMDM2-p53経路の破綻が起きていると推測した。そこで、タイレリア感染細胞におけるMDM2の発現動態の解析を行ったところ、タイレリア感染細胞において*mdm2*遺伝子の転写の亢進、*mdm2*の異常スプライスmRNA産物の出現、およびMDM2蛋白の過剰発現が起こっている事を明らかにした。また、DNA障害によるp53誘導性アポトーシスを*T. parva*感染細胞に誘導したところ、感染細胞ではp53蓄積が認められず、p53誘導性アポトーシスが抑制されていた。一方ではMDM2阻害剤を添加する事により細胞内にp53蛋白が蓄積される事が示された。これらの結果から、*T. parva*感染細胞では正常なMDM2分子の過剰発現あるいは異常構造を持つMDM2発現によりp53蛋白質が分解され、アポトーシスが抑制されている可能性が示唆された。

上述のように本研究では①*T. parva*原虫シゾン期の膜蛋白質であるTpSCOPが宿主NF- κ B経路を活性化し宿主リンパ球の細胞死を抑制している事、および②タイレリア感染細胞内においてMDM2の異常発現が起こっておりp53経路による細胞死が抑制されている事を明らかにした。これらの研究の成果はタイレリア原虫による宿主細胞トランスフォーメーション機構の解明に重要な知見を提供するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 本 千 尋

副 査 教 授 片 倉 賢

副 査 教 授 大 橋 和 彦

副 査 教 授 澤 洋 文

学 位 論 文 題 名

Studies on the molecular mechanisms underlying host lymphocyte-transformation by *Theileria parva*

(*Theileria parva* 感染による宿主リンパ球トランスフォーメーションの
分子機構解明に関する研究)

*Theileria parva*はウシ、アフリカ水牛を宿主としマダニによって媒介される細胞内寄生原虫であり、アフリカ諸国での家畜生産に与える本原虫感染の被害は甚大である。しかし現在のところ実施可能な予防、治療対策には様々な制約があり、より実行可能な対策の確立が望まれている。その基盤となるタイレリア原虫の生物学的特性、特に病態形成に重要なリンパ球内寄生ステージの研究は有効な治療、予防法を開発する上で重要である。本原虫感染による死因はリンパ球増多症による多臓器障害であるが、これはシゾント期タイレリア原虫が寄生したリンパ球が不死化し無限増殖能を獲得、あたかも癌化細胞の様に分裂増殖を繰り返す事に起因する。タイレリア原虫は細胞に侵入した後は寄生虫胞から脱出して直接宿主細胞質に接している事から、宿主細胞トランスフォーメーションに寄与する分子は虫体の膜表面に局在する蛋白質あるいは分泌蛋白質である事が予想されているが、未だ宿主細胞に作用を及ぼす原虫分子は同定されていなかった。本研究は*T. parva*原虫感染で見られる特徴的な細胞トランスフォーメーション機構を解明する事を目的に実施した。

第一章ではシゾント期蛋白質TpSCOP (*T. parva* schizont-derived cytoskeleton binding protein)の発現が宿主細胞シグナル伝達系に及ぼす影響について解析を行った。まず、免疫沈降法により本分子と相互作用する宿主分子の同定を試みた結果、アクチン分子との結合能が確認できた。さらに、TpSCOPを強制発現させたマウスT細胞株 (3A9/TpSCOP)を作製し、本細胞株がFasおよびTCR刺激誘導性アポトーシスに抵抗性を示す事、また細胞内でMAPK群およびNF- κ B経路活性化が起きており、最終的にNF- κ Bが活性化されている事を明らかにした。これらの結果から、TpSCOPは宿主アクチンに作用する事で、NF- κ B経路の活性化を誘導している事が示唆された。一方、TpSCOPを発現させたIL-2依存性細胞株CTLL-2/TpSCOPではIL-2 に対する反応性は高まったものの、完全には非依存性とは

ならなかった。この事から感染細胞の無限増殖能という現象に、NF- κ B活性化による刺激誘導性アポトーシス抑制機構が関与しているが、この機構とIL-2 非依存性増殖とはそれぞれ独立した細胞現象である事が考えられ、タイレリア感染による宿主細胞トランスフォーメーション機構の全体像の把握にはTpSCOPと共同して機能する原虫分子のさらなる探索が必要であると考えられた。

第二章では *T. parva* 感染細胞においてその増殖を制御しているシグナル分子を同定する目的で、抗癌作用を有する190種類の阻害剤のスクリーニングを行い、MDM2に対する阻害剤が極めて高い特異性で増殖を阻害する事を明らかにした。MDM2はp53に結合してプロテアソーム依存性の分解を引き起こす事で、p53誘導性のアポトーシスを抑制するとされている。また、MDM2は多くの癌細胞で過剰発現している事が知られている事から、タイレリア感染細胞においてもMDM2の異常発現やMDM2-p53経路の破綻が起きていると推測した。そこで、タイレリア感染細胞におけるMDM2の発現動態の解析を行ったところ、タイレリア感染細胞において *mdm2* 遺伝子の転写の亢進、*mdm2* の異常スプライス mRNA 産物の出現、およびMDM2蛋白の過剰発現が起こっている事を明らかにした。また、DNA障害によるp53誘導性アポトーシスを *T. parva* 感染細胞に誘導したところ、感染細胞ではp53蓄積が認められず、p53誘導性アポトーシスが抑制されていた。一方ではMDM2阻害剤を添加する事により細胞内にp53蛋白が蓄積される事が示された。これらの結果から、*T. parva* 感染細胞では正常なMDM2分子の過剰発現あるいは異常構造を持つMDM2発現によりp53蛋白質が分解され、アポトーシスが抑制されている可能性が示唆された。

上述のように本研究では① *T. parva* 原虫シゾン期の膜蛋白質であるTpSCOPが宿主NF- κ B経路を活性化し宿主リンパ球の細胞死を抑制している事、および②タイレリア感染細胞内においてMDM2の異常発現が起こっておりp53経路による細胞死が抑制されている事を明らかにした。これらの研究の成果はタイレリア原虫による宿主細胞トランスフォーメーション機構の解明に重要な知見を提供するものである。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者林田京子君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。