

215. 腸管上皮細胞の自然免疫に非古典的 MAPK が果たす役割

伴戸 寛徳

*東北大学 大学院農学研究科 複合生態フィールド教育研究センター

Key words : 非古典的 MAPK, MAPK4, 腸管上皮細胞, クリプトスポリジウム, 人獣共通感染症

緒言

Cryptosporidium parvum は、ヒトや家畜の腸管上皮細胞に寄生する原虫である [1]。宿主細胞内では寄生胞と呼ばれる胞構造を形成し、その中で無性もしくは有性生殖を行う過程で、腸管組織の損傷や下痢を主徴とした人獣共通感染症を引き起こす。国内外において、医学のみならず獣医学的にも重要な病原体であるにもかかわらず、未だ有効な予防法や治療薬は存在しないため、新規薬剤開発に向けて、宿主-原虫間相互作用に関わる分子機構の解明が喫緊の課題となっている。

腸管上皮細胞における自然免疫機構に重要な因子として、MAP キナーゼが知られている [2]。我々はこれまでに、ヒト腸管上皮癌細胞株 (HCT-8) に *C. parvum* を感染させた際の遺伝子発現変化を網羅的に解析した結果、非古典的 MAPK の一つである *MAPK4* の発現量が *C. parvum* の感染時特異的に増加することを見出している。しかし、病原体感染細胞における MAPK4 の役割は明らかになっておらず、宿主 MAPK4 が *C. parvum* の感染において果たす役割は全く不明である。加えて、MAPK4 は癌の重症化に関与することが近年明らかになってきており、医学的重要性が評価されつつある [3, 4]。したがって、MAPK4 が病原体感染細胞において何らかの機能を持つとすれば、医学・細胞生物学的に重要な知見となる。そこで本研究では、原虫が感染した腸管上皮細胞において宿主細胞の MAPK4 が果たす役割を明らかにすることを目的とした。

本研究ではまず、*MAPK4* を欠損させた HCT-8 細胞を作製して、宿主細胞の MAPK4 の有無が原虫感染に与える影響を検討した。その結果、宿主の MAPK4 非存在下では、原虫の感染量が減少することが明らかとなった。これは、原虫と宿主 MAPK4 の関連性を示した初めての報告であることから、MAPK4 の新たな機能やその分子機構解明に資する重要な知見だと考えられる。そこで、MAPK4 が原虫に及ぼす影響の作用機序解明を目指して、まずは MAPK4 が *C. parvum* 感染時の宿主細胞の細胞死と、Caspase3/7 の活性化に与える影響を調べた。その結果、*MAPK4* 欠損細胞では原虫感染時特異的に、Caspase 活性を介した細胞死であるアポトーシスが有意に増加していることが明らかとなった。次に、MAPK4 が原虫の各感染ステージ (接着・侵入・増殖) に与える影響調べた。その結果、MAPK4 は原虫の宿主細胞膜への接着には影響を及ぼさない一方、原虫の宿主細胞への侵入と寄生胞内での増殖には有意に影響を及ぼすことが明らかとなった。さらに、MAPK4 が持つリン酸化活性が、原虫感染への影響に関与していることを明らかにした。

以上の結果から我々は、未だその機能のほとんどが不明である非古典的 MAPK の病原体感染にかかわる新たな役割を見出した。さらに、腸管上皮細胞の MAPK4 およびその関連シグナル伝達経路は、原虫由来の腸管感染症に対する新規薬剤ターゲットとなる可能性も示した。今後の研究により、MAPK4 の機能や分子機構を明らかにすることで、腸管感染症の制圧に向けた研究開発が促進され、医学や獣医学領域の発展に大きく貢献することが期待される [5]。

方法

1. *MAPK4* を欠損した HCT-8 細胞の作製

gRNA を 2 箇所設計して、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により *MAPK4* を欠損した HCT-8 細胞を作製し、シーケンス解析によってゲノム上の *MAPK4* コーディング領域の欠失を確認した。

2. 感染 24 時間後の原虫感染量の評価

野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、その 24 時間後に免疫蛍光染色または qRT-PCR に供した。免疫蛍光染色ではポリクローナル抗体 (Sporo-Glo) で *C. parvum* を、DAPI で宿主細胞の核を染色し、ランダムな視野で計数した総宿主細胞数あたりの原虫感染数を感染量として評価した。qRT-PCR ではインターカレーター法を用い、原虫 18S rRNA の発現量を感染量として評価した。レスキュー実験として、*MAPK4* 欠損細胞に野生型 *MAPK4* の強制発現ベクターを導入し、同様の方法で野生型細胞と感染量を比較した。

3. 原虫感染に伴う宿主細胞の細胞死および Caspase3/7 活性の評価

野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、その 24 時間後に乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定して細胞死の頻度を、Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay kit (Promega) で Caspase3/7 の活性を評価した。

4. 各細胞における原虫の接着、侵入、増殖の評価

原虫の宿主細胞膜への接着は、事前に 4% PFA で固定した野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、30 分後に免疫蛍光染色に供し、方法 2 と同様の計数方法で評価した。原虫の宿主細胞への侵入は、野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、3 時間後に免疫蛍光染色に供し、方法 2 と同様の計数方法で評価した。原虫の寄生胞内での増殖は、野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後に免疫蛍光染色に供し、Sporo-Glo によって染色された寄生胞内に、DAPI によって染色された原虫核をひとつ持つ「分裂していない原虫＝未分裂虫体」と、核を複数持つ「分裂に成功した原虫＝分裂虫体」を区別して計数することで、計数した総原虫数あたりの分裂虫体の割合を増殖率として評価した。

5. *MAPK4* のドミナントネガティブ変異体を強制発現させた細胞における原虫感染量の評価

MAPK4 の K49A・K50A 変異体 (既知のキナーゼド変異体) の強制発現ベクターを、野生型の HCT-8 細胞に導入し、その後 *C. parvum* を感染させ、24 時間後に免疫蛍光染色に供し、方法 2 と同様の計数方法で評価した。

結果および考察

1. 宿主細胞の *MAPK4* が原虫感染に与える影響

MAPK4 を欠損させた HCT-8 細胞を作製し、宿主細胞の *MAPK4* の有無が原虫感染に与える影響を検討した。その結果、*MAPK4* 欠損細胞では感染 24 時間後の感染量が有意に減少していること (免疫蛍光染色 : 50%、図 1a ; qRT-PCR : 45%、図 1b) が明らかになった。また、*MAPK4* 欠損細胞に野生型 *MAPK4* の強制発現ベクターを導入するレスキュー実験を行ったところ、感染量は野生型細胞と同等まで回復した (図 1c)。以上の結果より、腸管上皮細胞の *MAPK4* は、原虫の感染に影響を及ぼすことが明らかとなった。近年、MAP キナーゼのひとつである p38/MAPK の存在は、*C. parvum* 感染に抑制的に機能することが報告されている [6]、一方、本研究では *MAPK4* の存在下でより多くの原虫感染が見られた。この結果は、*MAPK4* は古典的 MAP キナーゼとは異なる新規の機能を持つことを示唆している。

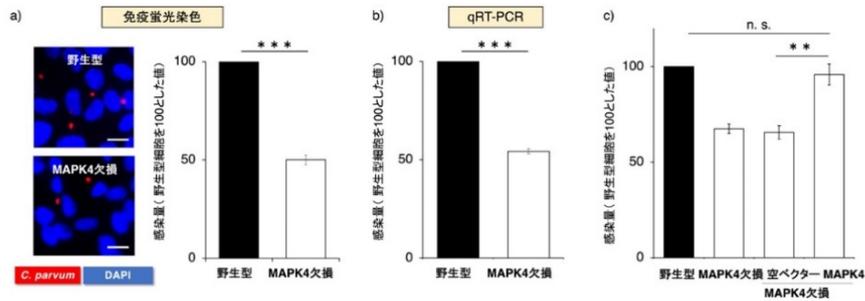


図 1. 原虫感染 24 時間後の HCT-8 細胞における原虫感染量の評価

- 原虫感染 24 時間後の免疫蛍光染色による感染量の評価。野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後に Sporo-Glo (赤) で *C. parvum*、DAPI (青) で宿主細胞の核を免疫染色し、感染量を評価した。*** : $p < 0.001$ (t 検定)。スケールバー : $10 \mu\text{m}$ 。
- 原虫感染 24 時間後の qRT-PCR による感染量の評価。野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後に qRT-PCR で感染量を評価した。*** : $p < 0.001$ (t 検定)。
- 野生型 *MAPK4* のレスキュー実験。*MAPK4* 欠損細胞に空ベクターまたは野生型 *MAPK4* 強制発現ベクターを導入し、*C. parvum* を感染させ、24 時間後の免疫蛍光染色により感染量を評価した。* : $p < 0.01$, n.s. : $p = 0.9005$ (Tukey HSD 検定)。

2. 宿主細胞の MAPK4 が原虫感染時特異的な宿主細胞の細胞死に与える影響

細胞死は、宿主細胞の重要な自然免疫機構の一つである。そこで、MAPK4 が宿主細胞の細胞死に与える影響を検討した。まず原虫感染時に培養上清に放出される LDH を測定した。その結果、*MAPK4* 欠損細胞では野生型細胞と比較して 1.5 倍の LDH が確認され、*MAPK4* 欠損細胞では野生型細胞と比較して強く細胞死が起こっていることが明らかとなった (図 2a)。次に、細胞死の一種であるアポトーシスに関わる酵素 (Caspase3/7) の活性を評価したところ、原虫が感染した *MAPK4* 欠損細胞では、野生型細胞と比較して 1.7 倍の酵素活性を示すことが明らかとなった (図 2b)。以上の結果から、宿主細胞の MAPK4 は原虫感染時に、Caspase を介して誘導されるアポトーシスに対して抑制的に機能していることが明らかとなった。これまでに、*C. parvum* 感染に伴うアポトーシスが宿主免疫応答として重要であり、原虫はこれを抑制する寄生メカニズムを有していることが明らかになっている [7]。したがって、*MAPK4* 欠損細胞では原虫がアポトーシスを制御できなかったことが、感染量が減少した原因の一つであると考えられる。

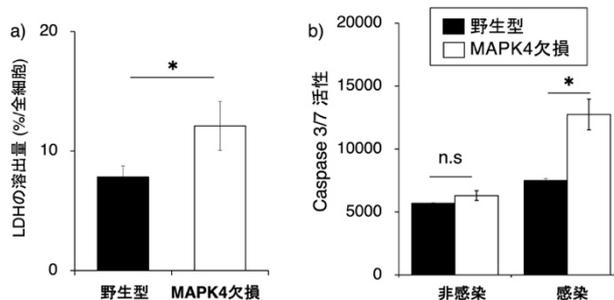


図 2. 原虫感染 24 時間後における宿主細胞の細胞死の評価

- 原虫感染 24 時間後における宿主細胞の細胞死量の評価。野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後の細胞上清中の LDH 量を測定した。界面活性剤により全細胞を溶出させた上清の LDH 量を 100%とした。* : $p < 0.05$ (t 検定)。
- 原虫感染 24 時間後における宿主細胞内の Caspase3/7 活性の測定。野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後の細胞集団を溶出して Caspase3/7 活性を測定した。* : $p < 0.05$, n.s. : $p = 0.1412$ (Tukey HSD 検定)。

3. 宿主細胞の MAPK4 が原虫の各感染ステージに与える影響

宿主細胞の MAPK4 が、原虫の各感染ステージ（接着・侵入・増殖）に与える影響を評価した。その結果、MAPK4 は原虫の宿主細胞膜への接着に影響を及ぼさないが（図 3a）、一方、MAPK4 欠損細胞では原虫の宿主細胞への侵入（図 3b）と寄生胞内での増殖（図 3c）が減少することを見出した。以上の結果から、*C. parvum* が宿主細胞へ正常に侵入あるいは増殖するために、宿主細胞の MAPK4 が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

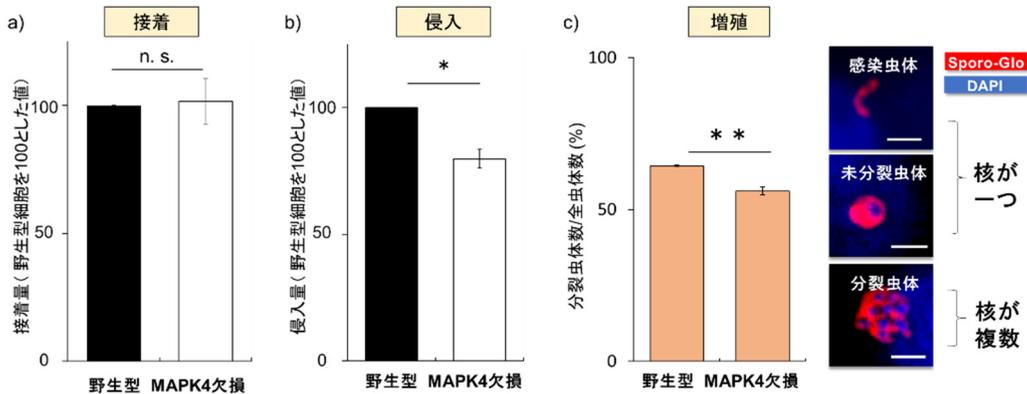


図 3. 宿主細胞の MAPK4 は原虫の接着、侵入、増殖に与える影響

- 原虫感染 30 分後における原虫の宿主細胞膜への接着量の評価。野生型細胞と MAPK4 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、30 分後の接着率を、免疫蛍光染色で評価した。n.s. : $p=0.4495$ (t 検定)。
- 原虫感染 3 時間後における原虫の宿主細胞への侵入量の評価。野生型細胞と MAPK4 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、3 時間後の侵入率を、免疫蛍光染色で評価した。* : $p<0.05$ (t 検定)。
- 原虫感染 24 時間後における原虫の寄生胞内での増殖量の評価。野生型細胞と MAPK4 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後の分裂虫体の割合を、原虫寄生胞内の核の数をもとに、免疫蛍光染色で評価した。** : $p<0.01$ (t 検定)。スケールバー : $2\mu\text{m}$ 。

4. 宿主細胞の MAPK4 のリン酸化活性が原虫感染に与える影響

キナーゼはリン酸化酵素であり、酵素活性を持つことが知られている。そこで、MAPK4 が原虫感染に与える影響に酵素活性が関わっているかを検討するため、野生型細胞に MAPK4 の K49A・K50A 変異体（既知のキナーゼデッド変異体 [8]）を強制発現させることで酵素活性を阻害した HCT-8 細胞を作製し、この細胞を用いて原虫感染量を評価した。その結果、野生型細胞や野生型 MAPK4 を強制発現した細胞と比べて MAPK4 変異体を強制発現した細胞では、原虫感染量が有意に減少した（図 4）。したがって、宿主細胞の MAPK4 が持つリン酸化活性が、原虫感染時に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

以上の結果から MAPK4 は、自然免疫応答に重要な古典的 MAPK の機能とは全く異なり、むしろ原虫の持続的な感染に利用されている可能性が示唆された。本研究は、MAPK4 を介した宿主-原虫間相互作用の解明を今後を進めることで、クリプトスポリジウムをはじめとする腸管上皮細胞へ感染する病原体に対する新規薬剤開発研究へと繋がり、腸管感染症の制圧に貢献することが期待される。

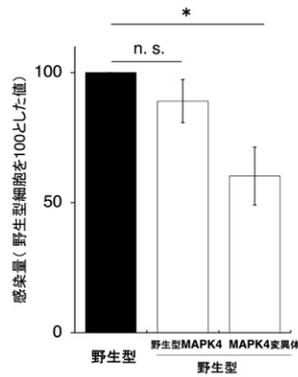


図 4. 宿主細胞の MAPK4 が持つリン酸化活性が原虫感染に与える影響

原虫感染 24 時間後の免疫蛍光染色による感染量の評価。野生型細胞、野生型 MAPK4 を強制発現した細胞、MAPK4 のドミナントネガティブ変異体を強制発現した細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後の免疫蛍光染色により原虫感染量を評価した。

* : $p < 0.05$ (t 検定)。

共同研究者・謝辞

本研究は、東北大学大学院農学研究科複合生態フィールド教育研究センターおよび旭川医科大学医学部感染症学講座寄生虫学分野で行われたものであり、加藤健太郎教授、福田康弘助教、村越ふみ助教、Mohammad Hazzaz Bin Kabir 博士、また実験を行って頂いた修士課程 2 年の渡邊仁奈氏をはじめとする学生の皆様に心より感謝を申し上げます。

文献

- 1) A. Guérin, B. Striepen, The Biology of the Intestinal Intracellular Parasite *Cryptosporidium*, *Cell Host & Microbe*. 2020 Oct 7;28(4):509-515. PMID: 33031769 DOI: 10.1016/j.chom.2020.09.007
- 2) Y. Liu, E.G. Shepherd, L.D. Nelin, MAPK phosphatases - Regulating the immune response, *Nat Rev Immunol*. 2007 Mar;7(3):202-12. PMID: 17318231 DOI: 10.1038/nri2035
- 3) W. Wang, T. Shen, B. Dong, C.J. Creighton, Y. Meng, W. Zhou, Q. Shi, H. Zhou, Y. Zhang, D.D. Moore, F. Yang, MAPK4 overexpression promotes tumor progression via noncanonical activation of AKT/mTOR signaling, *J Clin Invest*. 2019 Mar 1;129(3):1015-1029. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30688659 DOI: 10.1172/JCI97712
- 4) W. Wang, D. Han, Q. Cai, T. Shen, B. Dong, M.T. Lewis, R. Wang, Y. Meng, W. Zhou, P. Yi, C.J. Creighton, D.D. Moore, F. Yang, MAPK4 promotes triple negative breast cancer growth and reduces tumor sensitivity to PI3K blockade, *Nat Commun*. 2022 Jan 11;13(1):245. PMID: 35017531 DOI: 10.1038/s41467-021-27921-1
- 5) N. Watanabe, H. Bando, F. Murakoshi, R. Sakurai, M. Hazzaz, B. Kabir, Y. Fukuda, K. Kato, The role of atypical MAP kinase 4 in the host interaction with *Cryptosporidium parvum*, *Sci Rep*. 2023 Jan 19;13(1):1096. PMID: 36658270 DOI: 10.1038/s41598-023-28269-w
- 6) W. He, J. Li, A.Y. Gong, S. Deng, M. Li, Y. Wang, N.W. Mathy, Y. Feng, L. Xiao, X.M. Chen, *Cryptosporidial* infection suppresses intestinal epithelial cell mapk signaling impairing host anti-parasitic defense, *Microorganisms*. 2021 Jan 12;9(1):151. PMID: 33445463 DOI: 10.3390/microorganisms9010151

- 7) J. Liu, S. Enomoto, C.A. Lancto, M.S. Abrahamsen, M.S. Rutherford, Inhibition of apoptosis in *Cryptosporidium parvum* - infected intestinal epithelial cells is dependent on survivin, *Infect Immun*. 2008 Aug;76(8):3784-92. PMID: 18519556 DOI: 10.1128/IAI.00308-08
- 8) Kant S, Schumacher S, Singh MK, Kispert A, Kotlyarov A, Gaestel M. Characterization of the atypical MAPK ERK4 and its activation of the MAPK-activated protein kinase MK5. *J Biol Chem*. 2006 Nov;281(46):35511-35519. PMID: 16973613 DOI:10.1074/jbc.M606693200