

【目的】 *Cryptosporidium parvum* は、ヒトや家畜の腸管上皮細胞に寄生する原虫であり、下痢を主徴とする人獣共通感染症を引き起こす。特に日本では仔ウシの下痢症の一大要因でもあり、国内外において医学・獣医学的に重要な病原体である。しかしながら、未だ有効な予防・治療法は存在せず、新規薬剤開発に向けた研究基盤の構築が喫緊の課題となっている。我々はこれまでに、ヒト腸管上皮癌細胞株 HCT-8 に *C. parvum* を感染させて、HCT-8 細胞中の RNA 発現量の変化を網羅的に解析した。その結果、*C. parvum* の感染時特異的に発現が増加する遺伝子の一つとして、*MAPK4* を見出している。MAP キナーゼは、腸管上皮細胞の自然免疫に重要な因子であることが明らかになっているが、中でも非典型的なリン酸化モチーフを持つ非古典的 MAPK である *MAPK4* は、未だにその機能の多くが明らかとなっておらず、病原体が感染した細胞における *MAPK4* の役割に至っては全く不明である。そこで本研究では、*C. parvum* 感染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。

【方法】 CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により *MAPK4* を欠損した HCT-8 細胞を作製した。そして、宿主細胞の *MAPK4* が原虫感染に与える影響を評価するため、野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後の原虫感染量を免疫蛍光染色と qRT-PCR で評価した。次に、原虫の感染制御に重要な自然免疫応答である細胞死に *MAPK4* が与える影響を評価するため、原虫感染時の細胞培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 量と、宿主細胞の Caspase3/7 活性を評価した。また、原虫の各感染ステージに与える影響を評価するため、感染 30 分後の宿主細胞膜への接着量、感染 3 時間後の宿主細胞への侵入量、そして感染 24 時間後の寄生胞内での増殖量を免疫蛍光染色で評価した。さらに、*MAPK4* が持つリン酸化活性の役割を明らかにするため、野生型 HCT-8 細胞に *MAPK4* のドミナントネガティブ変異体を強制発現させ、*MAPK4* の酵素活性を阻害した状態で、感染 24 時間後の原虫感染量を免疫蛍光染色で評価した。

【結果】 *MAPK4* 欠損 HCT-8 細胞の作製に成功した。1) *MAPK4* 欠損細胞への感染 24 時間後の原虫感染量は、野生型細胞と比較して有意に減少した。2) *MAPK4* 欠損細胞では野生型細胞と比較して、原虫感染に伴う宿主細胞死と Caspase3/7 活性が増加した。3) *MAPK4* の有無に関わらず、原虫の宿主細胞膜への接着量に差は見られなかった。4) 原虫の宿主細胞への侵入量と寄生胞内での増殖量は、野生型細胞と比較して *MAPK4* 欠損細胞において有意に減少した。5) *MAPK4* のリン酸化活性を阻害した細胞では、野生型細胞と比較して原虫感染量が有意に減少した。本研究の結果、*C. parvum* が感染した宿主腸管上皮細胞では、宿主の *MAPK4* が原虫感染の成立や維持に重要な役割を果たすことが初めて明らかとなった。この結果は、*MAPK4* は自然免疫応答に重要な因子としてではない、未知の機能の存在を示唆している。

本研究の概念図

