

令和元年6月18日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04724

研究課題名(和文)リーシュマニア症ワクチン開発に向けた宿主免疫記憶機構の包括的解明

研究課題名(英文) Comprehensive understandings of host immunological memory mechanism to develop an effective vaccine strategy for leishmaniasis

研究代表者

前川 洋一 (MAEKAWA, Yoichi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10294670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：内臓型リーシュマニア症はリーシュマニア症の最も重篤な病型である。リーシュマニア感染に対する防御免疫はTh1細胞に依存することが示されているが、感染におけるB細胞と抗体の役割は不明であった。本研究では、内臓型リーシュマニア症における分泌型免疫グロブリンの役割を明らかにした。分泌型免疫グロブリン欠損マウスでは感染により肝臓でのIFN- γ 非依存性NADPHオキシダーゼ活性が上昇し、ドノバンリーシュマニア感染に対する防御応答を誘導することから、分泌型免疫グロブリンはマウスにおける内臓型リーシュマニア症の制御において負の役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス感染モデルを用いて、内臓型リーシュマニア症における分泌型免疫グロブリンの役割を明らかにすることができた。このことは、内臓型リーシュマニア症のワクチン開発において、抗体に依存した免疫応答が必ずしも感染防御に寄与するわけではないことを示している。本研究の成果から、リーシュマニア特異的抗体産生を誘導しないワクチン開発が必要であると考えられる、またこのようなワクチンの開発が、南アジアや南米で流行している重篤な内臓型リーシュマニア症の制御に大きく寄与すると考えている。

研究成果の概要(英文)：Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of leishmaniasis. Immunity to Leishmania infection has been shown to depend on the development of Th1 cells; however, the roles of B cells and antibodies during infection remain unclear. In this study, we found that the mice lacking circulating immunoglobulins (clgs-deficient mice) became resistant to VL. IFN- γ depletion did not affect the rapid reduction of parasite burden, whereas NADPH oxidases was up-regulated in the livers of infected clgs-deficient mice. The inhibition of the reactive oxygen species pathway in vivo by a NADPH oxidase inhibitor resulted in a significant increase in the parasite burden in clgs-deficient mice. These results indicate that a circulating Ig deficiency induces a protective response against VL by elevating IFN- γ -independent NADPH oxidase activity, and also that clgs play a regulatory role in controlling murine VL.

研究分野：医学、寄生虫学、免疫学

キーワード：内臓型リーシュマニア症 遺伝子改変マウス AID μ s 分泌型免疫グロブリン インターフェロン 活性酸素種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

感染症には衛生管理や感染予防啓発、治療薬剤開発、病原体感染源のコントロールなど多面的な予防・治療戦略が必要である。なかでもワクチンは感染症を克服する最も重要な戦略のひとつである。終生免疫が成立すると考えられる感染症に対しては基本的にワクチンを確立できる。実際、ウイルスや細菌感染症に対しては有効なワクチンが開発され撲滅された病原体も存在する。これらの成功したワクチンはコンポーネントワクチンや弱毒化ワクチンであるが、マラリアをはじめとするすべての寄生虫感染では未だそのいずれのワクチンも確立されたものは存在しない。寄生虫はウイルスや細菌と比較して複雑な感染様式や多種多様な抗原性をもっている。寄生虫感染症に対しても特定の抗原を標的にしたコンポーネントワクチンの開発や発現量の増加を目指したワクチン法の開発が日本を始め世界各地で精力的に行われている。その中には実験的に有効なものも存在するが未だ実用化には至っていない。一方寄生虫の弱毒化ワクチンも有望なワクチン法として報告が見られる(Kahn SM, et al. Curr Opin Biotechnol. 2012, Gennavaram S, et al. Front Immunol. 2014)。しかし、安全性などの課題も多い。

ワクチンの基盤となるのは宿主免疫システムのもつ免疫学的記憶(免疫記憶)機構である。免疫記憶の働きは抗原特異的リンパ球(メモリーTおよびB細胞)が長期間生体内で生存し再感染に際し速やかかつ強力な免疫応答を発揮し病原体を排除することである。また、免疫記憶は同一微生物によって活性化・強化されていくという特徴もある。さらにメモリーT細胞にはエフェクターメモリー、セントラルメモリーなどが、またメモリーB細胞についても多層的なメモリーB細胞が存在する。このように複雑かつ精緻に制御されている免疫記憶機構を効率的かつ効果的に活用することが、ワクチン開発には必須である。本研究では終

生免疫が成立するとされるリーシュマニア症において、多様な各ワクチン法によって発動される免疫記憶機構を長期間時間軸に渡り質的・量的に解析し比較する。この解析によって長期間有効なワクチンとはどのような免疫基盤に立脚しているのかを明らかにすることができる。また、この解明に基づくあらたなワクチン評価法を確立することができ、適切な評価に則った新たなワクチン設計が可能になると考える。

私たちは従来の研究を通して宿主免疫記憶機構を解明する重要性に気づき、その解明に取り組んできた。結果として、新たな知見を得ることに成功した(Maekawa Y, et al. Nature Med. 2015)。

その知見のなかでメモリーT細胞の長期生存に必須のシグナル伝達経路を見出した。私たちが見出した知見(メモリーT細胞長期生存の分子基盤)を基にして、各種ワクチン法での免疫記憶の質的・量的評価ができるのではないかと考えるに至った。免疫記憶の質的・量的な評価法を確立することがリーシュマニア症をはじめとした難治性寄生虫感染症に対する有効なワクチン開発上非常に重要であり、早急に取り組まなければならない課題であると考えた。

2. 研究の目的

内臓型リーシュマニア症は重篤なリーシュマニア症で、治療を行わない場合には致死性である。この感染症の病原体であるリーシュマニア原虫はマクロファージやクッパー細胞などの細網内皮系細胞内に

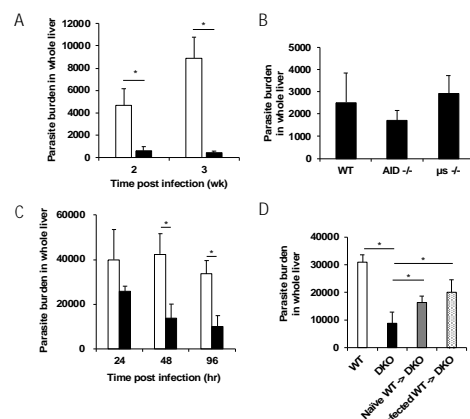


図1、AID、 μ s、および両遺伝子欠損(DKO)マウスにおけるLeishmania donovani感染

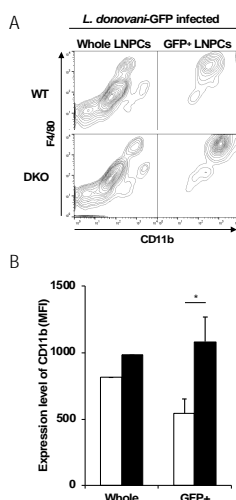


図2、L. donovani感染マウス肝臓での感染細胞の解析

寄生する。リーシュマニア原虫感染に対してはインターフェロン γ 産生と特徴とする I 型免疫応答、特に Th1 型 CD4 陽性 T リンパ球が感染防御に重要である。一方、内臓型リーシュマニア症患者では B リンパ球活性化が病態を悪化させること、また B リンパ球を欠損するマウスでは感染に対する抵抗性が高まることが報告されており、B リンパ球が感染病態を左右する因子であることが示唆されている。B リンパ球は、免疫グロブリンを産生するという機能に加え免疫を抑制的に制御することも明らかになっている。しかし、内臓型リーシュマニア症の感染病態に対して免疫グロブリンあるいは B リンパ球のいずれが影響を与えているのかについては依然決定されていなかった。本研究では、B リンパ球は有するが免疫グロブリンは分泌することができない遺伝子改変マウスを用い本課題の解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では AID 遺伝子欠損(AID-KO)マウス、 μ s 遺伝子欠損(μ s-KO)マウスおよびそれらの二重欠損 (DKO) マウスを用いた。いずれのマウスも B リンパ球を持つ。AID-KO マウスは血清中に IgM は存在するがクラス変換に依存する IgG、IgA、IgE を産生することはできない。一方、 μ s-KO マウスは分泌型 IgM を産生することができないため血清中に IgM は存在しないが、クラス変換依存性免疫グロブリンは存在する。また、DKO マウスは IgM もクラス変換依存性免疫グロブリンも有しない。これらのマウスに内臓型リーシュマニア症起因原虫である *Leishmania donovani*(*L. donovani*)を静脈接種し、以後の感染動態を観察した。なお、観察動態の観察を容易にするため、本研究で用いた *L. donovani* はルシフェラーゼあるいは GFP を恒常的に発現する。

肝臓での *L. donovani* 感染細胞を同定するために抗 CD11b 抗体および抗 F4/80 抗体を用いたフローサイトメトリー解析を行った。

肝臓での原虫排除機序を解明するために、感染マウスおよび非感染マウスの肝臓を試料として、NADPH oxidase 関連の遺伝子について定量 PCR を行った。また、NADPH oxidase 阻害剤 apocynin を感染マウスに投与し、原虫数を観察した。

4. 研究成果

DKO マウスは野生型対象マウスと比較し、感染 2 および 3 週後の肝臓での原虫数が低下していた (図 1 A)。しかし、AID-KO マウスならびに μ s-KO マウスでは同様に現象は観察されなかった (図 1 B)。DKO マウスで観察される肝臓での原虫数低下は原虫接種 4 8 時間後から認められた (図 1 C)。野生型マウスの血清を DKO マウス移入し原虫を接種すると、原虫数の低下は軽減した (図 1 D)。DKO マウスへの血清移入による原虫数低下の軽減は IgM が存在する AID-KO マウス由来血清では顕著であったが、IgM が存在しない μ s-KO マウス由来血清では限定的であった。

DKO マウスでの原虫接種後早期からの原虫数

低下は、GFP を発現する *L. donovani* 原虫を用いても観察された。DKO マウスも野生型マウスも肝臓での主要な原虫感染細胞は F4/80 と CD11b を共発現するクッパー細胞であった (図 2 A)。

DKO マウスで観察される早期原虫数低下は T、B リンパ球を欠損する Rag1 マウスでも同様に観察された。また、DKO マウスを遺伝的背景に持つ IFN- γ 遺伝子欠損マウスでも原虫数低下の解除は緩徐であった (図 3)。

原虫が肝臓で感染するクッパー細胞の CD11b 発現は野生型マウスクッパー細胞より亢進していた (図 2 B)。また感染 DKO マウスの肝臓では NADPH oxidase の主要構成分子の発現が野生型マウスと比較し優位に上昇していた。さらに、感染 DKO マウスに NADPH oxidase 阻害剤を投与すると、原虫数低下が顕著に解除された (図 4)。

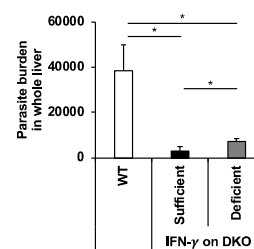


図 3、DKO マウスで認められる原虫排除亢進におけるインターフェロン γ の関与

血液中を循環している機能的免疫グロブリンを持たない DKO マウスは野生型マウスと比較し肝臓での原虫数が感染早期から低下することから、B リンパ球ではなく免疫グロブリンの欠如が原虫数低下と強く関連していると考えられた。DKO マウスでの原虫数低下には $\gamma\delta$ 型 T リンパ球や NKT リンパ球などの自然免疫系 T リンパ球は関与していないと考えられた。また、Th1 型サイトカインの代表であり細胞内寄生性

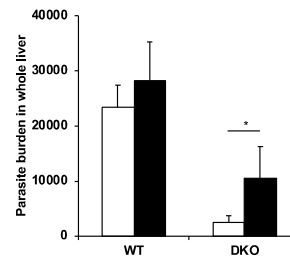


図4、DKOマウスで認められる原虫排除亢進における活性酸素種経路の関与

原虫排除に必須と考えられている IFN- γ の関与も限定的であった。一方、DKO マウスの肝臓で原虫が感染しているクッパー細胞では CD11b 分子の細胞表面発現が亢進し、また感染 cIgs 欠損マウスの肝臓では NADPH oxidase 関連遺伝子の発現が上昇していた。さらに、NADPH oxidase 阻害剤により DKO マウスでの原虫数低下が解除されることから、DKO マウス肝臓での原虫の早期排除には活性酸素種が関与していることが強く示唆された。

本研究から、循環免疫グロブリンは *Leishmania donovani* 感染マウスの肝臓において、活性酸素種の産生誘導を抑制することによって、宿主感染防御能に負の影響を与えていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kodai Suzuki, Hideshi Okada, Genzou Takemura, Chihiro Takada, Ayumi Kuroda, Hirohisa Yano, Ryogen Zaikokuji, Kentaro Morishita, Hiroyuki Tomita, Kazumasa Oda, Saori Matsuo, Akihiro Uchida, Tetsuya Fukuta, So Sampei, Nagisa Miyazaki, Tomonori Kawaguchi, Takatomo Watanabe, Takahiro Yoshida, Hiroaki Ushikoshi, Shozo Yoshida, Yoichi Maekawa, Shinji Ogura. Neutrophil Elastase Damages the Pulmonary Endothelial Glycocalyx in Lipopolysaccharide-Induced Experimental Endotoxemia. *Am J Pathol.* 2019 May 17. pii: S0002-9440(18)30993-3. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.05.002. (査読：有)

Chieko Ishifune, Shin-ichi Tsukumo, Yoichi Maekawa, Katsuto Hozumi, Doo Hyun Chung, Chihiro Motozono, Sho Yamasaki, Hiroyasu Nakano, Koji Yasutomo. Regulation of membrane phospholipid asymmetry by Notch-mediated flippase expression controls the number of intraepithelial TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ + T cells. *PLoS Biol.* 2019 May 9;17(5):e3000262. doi: 10.1371/journal.pbio.3000262. eCollection 2019 May. (査読：有)

Srinontong P., Wu Z., Sato K., Nagaoka H., Maekawa Y. The circulating immunoglobulins negatively impact on the parasite clearance in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice via dampening ROS activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;506(1):20-26. (査読：有)

Koyama S, Matsunaga S, Imanishi M, Maekawa Y., Kitano H, Takeuchi H, Tomita S. Tumour blood vessel normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumour mouse model. *Sci. Rep.* 2017;7:45621. (査読：有)

Asano T, Wu Z, Srinontong P, Ikeda I, Nagano I, Morita H, Maekawa Y. Non-encapsulated *Trichinella pseudospiralis* infection impairs follicular helper T cell differentiation with subclass-selective decreases in antibody responses. *Infect. Immun.* 2016;84(12):3550-3556. (査読：有)

Furukawa T, Ishifune C, Tsukumo S, Hozumi K, Maekawa Y., Matsui N, Kaji R, Yasutomo K. Transmission of survival signals through Delta-like 1 on activated CD4+ T cells. *Sci. Rep.* 2016;6:33692. (査読：有)

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y, Maekawa Y. Practical methods for collecting *Trichinella* parasites and their excretory-secretory products. *Parasitol. Int.* 2016;65(5):591-595. (査読：有)

Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Boonjaraspinyo S, Srinontong P, Ratusuwan P, Narong K, Nielsen

PS, Maekawa Y. Significance of S100P as a biomarker in diagnosis, prognosis and therapy of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Int. J. Cancer 2016;138(2):396-408. (査読：有)
〔学会発表〕(計 22 件)

前川洋一、田端みずほ、呉 志良、Plasmodium yoelii 感染における Activation-induced cytidine deaminase の役割、第 88 回日本寄生虫学会大会、長崎大学、2019 年

Yoichi Maekawa、CD4⁺ T cells are affected by the gravitational stress via the change of energy metabolism. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会、福岡国際会議場、2018 年

田端みずほ、呉 志良、前川洋一、AID 欠損マウスにおけるマラリアの解析、第 74 回日本寄生虫学会 西日本支部大会、山口大学、2018 年

中山さわ、呉 志良、高田依里佳、北山雄一、志知 豊、長野 功、前川洋一、旋毛虫(*Trichinella pseudospiralis*)感染による IgA 腎症の改善、第 74 回日本寄生虫学会 西日本支部大会、山口大学、2018 年

長田良雄、呉 志良、長野 功、前川洋一、金澤 保、旋毛虫の抗関節炎効果は STAT6 経路に依存しない、第 87 回日本寄生虫学会大会、国立国際医療センター研究所、2018 年

Piyarat Srinontong、Zhiliang Wu、Hitoshi Nagaoka、Yoichi Maekawa、Regulation of visceral leishmaniasis by secreted immunoglobulin deficiency. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会、仙台国際センター、2017 年

Mizuho Tabata、Zhiliang Wu、Yoichi Maekawa、Infection of parasitic nematode ameliorates imiquimod (IMQ)-induced psoriasis. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会、仙台国際センター、2017 年

Chieko Ishifune、Yoichi Maekawa、Shin-ichi Tsukumo、Koji Yasutomo、Notch signal controls the number of TCRab⁺CD8aa⁺ intraepithelial lymphocytes via phospholipid asymmetry by maintaining flips ATP8a2 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会、仙台国際センター、2017 年

Yoichi Maekawa、The immune responses of CD4⁺T cells are affected by hypergravity. 第 46 回日本免疫学会総会・学術集会、仙台国際センター、2017 年

田端みずほ、根笹みのり、服部真由、上野温代、呉 志良、長尾功、前川洋一、旋毛虫(*Trichinella pseudospiralis*)感染によるイミキモド誘導性乾癬の改善、第 73 回日本寄生虫学会 西日本支部大会、大阪市立大学医学部、2017 年

Srinontong Piyarat、呉 志良、前川洋一、分泌型抗体欠損は内蔵型リーシュマニア症の抵抗性に寄与する、第 86 回日本寄生虫学会大会、北海道大学、2017 年

呉 志良、Srinontong Piyarat、住吉孝允、高橋翔、長野 功、前川洋一、旋毛虫感染による花粉症アレルギーの抑制、及びその貴女の解明についての検討、第 10 回 寄生虫感染免疫研究会、徳島大学 藤井節郎記念医科学センター、2017 年

Srinontong Piyarat、Wu Zhiliang、Nagaoka Hitoshi、Maekawa Yoichi、Secreted immunoglobulin deficiency protects mice from visceral leishmaniasis. 第 10 回 寄生虫感染免疫研究会、徳島大学 藤井節郎記念医科学センター、2017 年

Srinontong Piyarat、Wu Zhiliang、Nagaoka Hitoshi、Maekawa Yoichi、Effect of secreted immunoglobulin deficiency in anti-leishmania immunity. 第 45 回 日本免疫学会総会・学術集会、沖縄コンベンションセンター、2016 年

住吉孝允、高橋翔、呉 志良、Srinontong Piyarat、長野 功、前川洋一、旋毛虫感染によるスギ花粉アレルギー反応の抑制、第 72 回日本寄生虫学会 西日本支部大会、岐阜大学サテライトキャンパス、2016 年

呉 志良、長野 功、Srinontong Piyarat、前川洋一、*Trichinella pseudospiralis* 由来 53KDa 分泌蛋白 Tpp53 はマクロファージの NF-κB シグナル経路を抑制する、第 72 回日本寄生虫学会 西日本支部大会、岐阜大学サテライトキャンパス、2016 年

Srinontong Piyarat、Wu Zhiliang、Nagaoka Hitoshi、Maekawa Yoichi、Effect of secreted immunoglobulin deficiency in anti-*Leishmania* immunity. 第 72 回日本寄生虫学会 西日本支

部大会、岐阜大学サテライトキャンパス、2016年

Srinontong Piyarat, Maekawa Yoichi、The role of secreted immunoglobulin in visceral leishmaniasis. 5th Joint Meeting (Tokushima Univ, KAIST, and NSU) 2016、ソウル国立大学医学部、2016年

Piyarat Srinontong, Zhiliang Wu, Hitoshi Nagaoka, Yoichi Maekawa、Restriction of anti-*Leishmania* immunity by secreted immunoglobulin in murine visceral leishmaniasis. 日本寄生虫学会、宮崎市民プラザ、2016年

呉 志良、長野 功、Srinontong Piyarat、浅野一信、前川洋一、宿主免疫機構を抑制する旋毛虫分泌分子 Tp53 の機能解析、日本寄生虫学会、宮崎市民プラザ、2016年

21 Maekawa Yoichi, Srinontong Piyarat, Wu Zhiliang, Ikeda Takahide, Nagaoka Hitoshi、Immunoglobulins are a susceptible factor in murine visceral leishmaniasis. 日本免疫学会、札幌コンベンションセンター、札幌、2015年

22 Ikeda Takahide, Taniuchi Ichiro, Morita Hiroyuki, Maekawa Yoichi、Runx3 controls the cytotoxic activity of CD8⁺ T cells in vivo. 日本免疫学会札幌コンベンションセンター、2015年

〔図書〕(計 1 件)

Maekawa Y, Ikeda T, Srinontong P. Notch controls the differentiation and function of cytotoxic CD8 T cells. (分担) Notch Signaling (Springer) 2017: 21-33.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.gifu-u.ac.jp/labo/parasite/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：濱野 真二郎

ローマ字氏名：HAMANO Shinjiro

所属研究機関名：長崎大学

部局名：熱帯医学研究所

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 70294915