

令和元年6月19日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08441

研究課題名(和文) 赤芽球感染をめぐる宿主マラリア原虫相互関係の解明

研究課題名(英文) Host-parasite interaction in erythroblastic infection during malaria

研究代表者

久枝 一 (Hisaeda, Hajime)

国立感染症研究所・寄生動物部・部長

研究者番号：50243689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：当初の目的であった、1) CD8 T細胞による感染赤芽球の認識、2) マラリア原虫が赤芽球内での発育、3) CD8 T細胞による感染赤芽球に対する防御メカニズムを明らかにすることができた。すなわち、CD8 T細胞は感染赤芽球を認識し、FasLを介した細胞傷害活性を発揮し、感染赤芽球にフォスファチジルセリンを表出させマクロファージに貪食させやすくすることで、感染赤芽球を排除し感染抵抗性に貢献していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでよく分からなかったCD8 T細胞の赤血球ステージのマラリアに対する防御機構の詳細を明らかにすることで、新たなワクチン戦略を提唱できる。これまでは抗体を誘導することを目的とし、細胞表面の分子を標的としたが、免疫による選択圧で多型を示すものが多く、ワクチン効果は限定的であった。一方、CD8 T細胞は細胞内部の多型性の少ない抗原も認識できるので、抗原の多様性に制限を受けない幅広い効果を発揮するワクチンとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)： The proposed aims, 1) recognition of infected erythroblasts by CD8 T cells, 2) growth of malaria parasites in erythroblasts, and 3) protective mechanisms of CD8 T cells against infected erythroblasts, have been achieved. We clarified that CD8 T cells recognize infected erythroblasts and exert cytotoxicity mediated by FasL to translocation of phosphatidylserine to surface of infected erythroblasts, resulting in higher susceptibility to phagocytosis by macrophages. Thus, CD8 T cells play protective roles in blood-stage malaria by enhancing clearance of infected erythrocytes in collaboration with macrophages.

研究分野：寄生虫学、免疫学

キーワード：マラリア CD8 T細胞 赤芽球

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

### 1. 研究開始当初の背景

マラリアは年間2億以上の感染者、80万もの死者を出す寄生性原虫による世界最大規模の感染症である。マラリアが今もなお猛威を奮い続けている要因として、特効薬であったクロロキンに対する薬剤耐性を持つ原虫株が拡散したことに加え、**有効なワクチンが皆無であることが挙げられる。ワクチンの開発のためにはマラリアに対する防御免疫を詳細に理解する必要があるが、赤内マラリア原虫は巧みな免疫回避機構を持ち、防御免疫の理解は不十分でありワクチン開発は困難を極めている。**

我々は、赤内マラリアに対する**CD8 T細胞の防御的役割を世界に先駆けて明らかにしてきた。**その防御メカニズムには、IFN- $\gamma$ によるマクロファージの活性化が重要であると同時に、細胞傷害活性を司る分子、パーフォリン、も部分的にはあるが関与していた。したがって、何らかの細胞に対する細胞傷害活性が防御的に働いていることが示唆されるが、MHC クラス I を発現しない赤血球に感染する赤内マラリア原虫に対してどのように防御効果を発揮するのかは不明である。申請者らはこれらの疑問に答えるべく、**マウスマラリア原虫が MHC class I 分子を発現する赤芽球に感染することを見出し、CD8 T細胞の防御メカニズムとして感染赤芽球が関与する、との着想に至った。**

### 2. 研究の目的

本研究では、マラリア原虫が MHC class I を発現する赤芽球にも感染することに着目し、CD8 T細胞の感染赤芽球を標的とした防御メカニズムを解析する。加えて、赤芽球感染がマラリア原虫の寄生戦略となっている可能性を検証することで、宿主とマラリア原虫の双方向から赤芽球感染の関わるマラリアにおける宿主病原体相互作用の全貌を明らかにすることを目指す。具体的には、1) CD8 T細胞が感染赤芽球を認識すること、2) CD8 T細胞の感染赤芽球に対する細胞傷害活性が防御に関与すること、3) マラリア原虫が赤芽球内でも生活史を全うできるのか、を明らかにする。

### 3. 研究の方法

マラリアにおける赤芽球感染の意義を、宿主防御と寄生適応の観点からマウスモデルを用いて解析する。**マウスにネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* (Py) を感染させ、脾臓や骨髄中の赤芽球を解析する。**

### 4. 研究成果

#### 1) CD8 T細胞による感染赤芽球の認識

モデル抗原である卵白アルブミン OVA を発現し、かつ GFP も発現する OVA 発現組換えマラリア原虫 (Py-GFP-OVA) を作製し、マウスに感染させ、脾臓・骨髄から溶血した後 GFP 陽性感染赤芽球を精製する。OVA を認識する OT-I CD8 T細胞と感染赤芽球と共培養すると、OT-I の IFN- $\gamma$  の分泌が認められ、CD8 T細胞の抗原特異的感染赤芽球の認識が示された。

#### 2) マラリア原虫が赤芽球内での発育

感染赤芽球でのマラリア原虫の発育ステージを顕微鏡下で、あるいは感染赤芽球中の原虫の核含量をフローサイトメトリーで解析したところ、原虫の分裂・増殖が起こっていることが確認できた。さらに Py-GFP-OVA を感染させたマウスから、溶血後 GFP 発現を指標に精製した感染赤芽球をマウスに接種すると、感染が成立したことから感染赤芽球が感染源となることも明らかとなった。

#### 3) CD8 T細胞による感染赤芽球に対する防御メカニズム

CD8 T細胞を除去したマウス、FasL を欠損するマウスの両者で感染した**赤芽球が増加すること、増加していた感染赤芽球には Fas が発現していたことから、CD8 T細胞は Fas-FasL 依存的細胞傷害活性を介して赤芽球を排除していることが明らかとなった。**CD8 T細胞が作用した感染赤芽球がアポトーシスを起こしているのかを検討したところ、早期アポトーシス細胞に特徴的な細胞膜外葉へのフォスファチジルセリンの反転が認められた。一方で、細胞膜上のフォスファチジルセリンはアポトーシス細胞の目印として貪食細胞の標的となる。また、マラリア原虫が感染した赤血球はマクロファージに取り込まれて処理されることが知られている。そこで、感染赤芽球もフォスファチジルセリン特異的にマクロファージに貪食されるかを検討した。正常マウスと FasL 欠損マウスから精製した感染赤芽球を試験管内でマクロファージと培養したところ、正常マウスの感染赤芽球はマクロファージによく貪食されていたが、フォスファチジルセリンを表出しない FasL 欠損マウスの感染赤芽球は貪食されにくかった。マウスにマクロファージを除去するクロドロネートリポソームを投与すると、マラリアに対する抵抗性が激減した。以上のことから、CD8 T細胞は感染赤芽球に FasL を作用させ、フォスファチジルセリンを表出させマクロファージに貪食させやすくすることで、感染抵抗性に貢献していることが明らかとなった。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Imai T, Ishida H, Suzue K, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, and Hisaeda H: Cytotoxic

activities of CD8<sup>+</sup> T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. **Elife** 4, doi: 10.7554/eLife.04232, 2015.

2. Okada H, Suzue K, Imai T, Taniguchi T, Shimokawa C, Onishi R, Hirata J, and Hisaeda H: A transient resistance to blood-stage malaria in interferon- $\gamma$ -deficient mice through impaired production of host cells preferred by malaria parasites. **Frontiers Microbiol.** 6:600. doi: 10.3389/fmicb.2015.006600. eCollection 2015.
3. Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, Hirai M, Suzue K, Imai T, Nomura T, Handa T, Okada H, Shimokawa C, Onishi R, Ochia A, Hirata J, Tomita H, Ohno H, Horii T, and Hisaeda H: *Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. **Sci Rep** 5: 15699, doi: 10.1038/srep15699, 2015.
4. Shimokawa C, Kanaya T, Hachisuka M, Ishiwata K, Hisaeda H, Kurashima Y, Kiyono H, Yoshimoto T, Kaisho T, and Ohno H: Mast cells are crucial for induction of group 2 innate lymphoid cells and clearance of helminth infections. **Immunity**, 46: 863-874, 2017.
5. Nagayasu E, Aung MPPTH, Hortiwakul T, Hino A, Tanaka T, Higashiarakawa M, Ochia A, Taniguchi T, Win SMT, Ohashi I, Odongo-Aginya EI, Aye KM, Mon M, Win KK, Ota K, Torisu Y, Panthuwong S, Kimura E, Palacpac NMQ, Kikuchi T, Hirata T, Torisu S, Hisaeda H, Horii T, Fujita J, Htike WW, and Maruyama H: A possible origin population of pathogenic intestinal nematodes, *Strongyloides stercoralis*, unveiled by molecular phylogeny. **Sci Rep**, 7: 4844, DOI:10.1038/s41598-017-05049-x, 2017.
6. Shimokawa C, Senba M, Kobayashi S, Kikuchi M, Obi S, Ochia A, Hamano S, and Hisaeda H. Intestinal inflammation-mediated clearance of amebic parasites is dependent on IFN- $\gamma$ . **J Immunol**, 200: 1101-1109, 2018.
7. Shaulov Y, Shimokawa C, Trebicz-Geffen M, Nagaraja S, Methling K, Lalk M, Weiss-Cerem L, Lamm AT, Hisaeda H, Ankri S. *Escherichia coli* mediated resistance of *Entamoeba histolytica* to oxidative stress is triggered by oxaloacetate. **PLoS Pathog**, 14: e1007295, 2018.
8. Shimokawa C, Obi S, Shibata M, Ochia A, Imai T, Suzue K, Hisaeda H. Suppression of obesity by an intestinal helminth through interactions with intestinal microbiota. *Infect Immun*, 87: e00042-19, 2019.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：今井 孝

ローマ字氏名：Imai Takashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。