

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15124

研究課題名(和文) 寄生体センサーの活性化を指標にした宿主・寄生体相互作用解析法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the host parasite interaction by monitoring the activation of parasite sensor

研究代表者

由井 克之 (YUI, Katsuyuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：90274638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内刺激伝達系をFRETセンサーで検出するトランスジェニックマウスと、蛍光タンパク陽性マラリア原虫スポロゾイトを用い、多光子レーザー顕微鏡で原虫感染細胞と免疫細胞の生体イメージングを行い、宿主・寄生体相互作用を明らかにすることを目的とした。FRETセンサーマウスに直接感染させた実験では、感染肝細胞周囲の原虫特異的CD8+ T細胞のクラスター部位に一致して、宿主細胞にFRET陽性細胞が観察された。細胞種の同定には至らなかったが、肝細胞期感染防御における細胞活性化を、カルシウムシグナルを検出するFRETセンサーでモニターすることが可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Host parasite interaction is one of the main theme of the infection research. We used transgenic mice expressing FRET sensor that detect intracellular calcium signaling and Plasmodium sporozoites that express fluorescent protein, and performed intravital imaging of the interaction between immune cells and parasites as well as their activation using two-photon microscopy.

In mice expressing FRET sensor, we identified FRET positive host cells in the region where parasite-specific CD8+ T cells formed clusters around the infected hepatocytes. Although we were unable to identify the cell type of those which were FRET positive, this study showed the potential of intravital imaging in identifying the functional activation of host cells during liver-stage infection with Plasmodium parasites using FRET sensor that detect calcium signaling.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア イメージング 肝臓 T細胞 感染防御

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫感染の肝細胞期は、蚊の吸血により体内に侵入したマラリア原虫が最初に体内で増殖する時期である。肝細胞から出たマラリア原虫は、再び肝細胞に感染することはないため、感染する肝細胞数は最大でも吸血時に体内に侵入した原虫数に限られる。そのため、感染のボトルネックとも言われ、ワクチン開発の主要な標的となっている。肝細胞期感染防御の主要なエフェクターは、原虫抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞であることが示されている。しかしながら、原虫特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞により肝細胞に感染したマラリア原虫が排除されるメカニズムについては十分に理解されていない。

我々は、多光子レーザー顕微鏡を用いてマラリア肝細胞期 CD8<sup>+</sup>T 細胞による感染防御の生体イメージング手法を開発してきた

(Kimura et al., *Inf Imm*, 81: 3825, 2013)。この系では、モデルマラリア原虫抗原として、卵白アルブミン (OVA) と蛍光タンパク gfp を発現するマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA-gfpOVA) と、蛍光タンパク DsRed を発現する OVA 特異的な T 細胞受容体 (TCR) トランスジェニックマウス由来の OT-I 細胞を用い、抗原特異的に CD8<sup>+</sup>T 細胞が肝細胞期マラリア原虫を排除する現場を、生体イメージングで捉えたものである。感染肝細胞内周囲に特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞が集まり、両者相互作用の中で、肝細胞内の原虫が排除される映像を撮影することに成功した。しかしながら、この手法では細胞動態と同時に細胞機能をモニターすることはできなかった。

近年、細胞内刺激伝達に関わるカルシウムセンサーとして、蛍光共鳴エネルギー移動

(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 技術の発達が著しい。FRET センサーのトランスジェニックマウスも複数種類開発されており、生体イメージングで細胞内カルシウム濃度の変動を観察することにより、細胞活性化を観察することができる。マラリア原虫肝細胞期の感染防御のイメージングに FRET センサーを用い、病原体と免疫応答機能の現場をイメージングで捉えることが可能になった。

### 2. 研究の目的

細胞内刺激伝達系を FRET センサーで検出するトランスジェニックマウスを用い、FRET マウスに蛍光タンパク陽性マラリア原虫スポロゾイトを感染させ、多光子レーザー顕微鏡を用いて原虫感染細胞と免疫細胞生体イメージングを行う。動態と機能を同時にモニターすることにより、宿主・寄生体相互作用を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス

Ca<sup>2+</sup> センサー Yellow Cameleon 3.60 (YC3.60) トランスジェニックマウス (Yoshikawa et al, *Scient Rep*, 6:6:18738, 2016) は、東京医科歯科大学難治疾患研究所の安達貴弘准教授から供与された。このマウスは、蛍光タンパク CFP と YFP をカルモジュリン変異体などで結びあわせた YC3.60 を発現する。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇すると、CFP と YFP の間で FRET が発生する。このマウスを OT-I マウスと交配し、YC3.60/OT-I マウスを作成した。

#### (2) スポロゾイトの調整

ハマダラカは、長崎大学動物実験施設内で飼育維持している。PbA-gfpOVA をマウスに腹腔内注入により感染させた。原虫血症上昇後、このマウスをハマダラカに吸血させた。約 2 週間後、蚊の唾液腺から感染性マラリア原虫スポロゾイトを採取した。

#### (3) 抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞の Ca<sup>2+</sup>シグナリング

YC3.60/OT-I マウスから CD8<sup>+</sup>T 細胞を精製し、試験管内で OVA ペプチドを用いて抗原刺激し、3 日間培養し活性化させた。この T 細胞を C57BL/6 マウスに受け身移入した。翌日、このマウスにスポロゾイトを静注により感染させた。約 4 4 時間後、麻酔下でマウスの腹部皮膚を切開して肝臓の一部を引き出し、倒立型多光子レーザー顕微鏡で観察した。

#### (4) 肝臓内免疫細胞の Ca<sup>2+</sup>シグナリング

YC3.60/OT-I マウスに直接スポロゾイトを静注により感染させた。約 4 4 時間後、麻酔下でマウスの肝臓の生体イメージングを行った。

#### (5) イメージング解析

FRET の結果は、YFP/CFP の比率により判定する。これらイメージング結果の解析は、Metamorph ソフトウェアを用いて行った。

#### (6) フローサイトメトリー

蛍光タンパクの発現強度の確認は、FACS Canto II を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) OT-I モデルを用いた抗原特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化イメージング

YC3.60/OT-I マウスの活性化 CD8<sup>+</sup>T 細胞を移入したマウスに PbA-gfpOVA スポロゾイトの感染を行い、イメージング解析を行ったが、OT-I 細胞の感染細胞周囲へのクラスター形成を明確に捉えることができなかった。原因としては、CD8<sup>+</sup>T 細胞の YC3.60 発現がイメージングを行うのに十分ではない可能性が考えられ

た。そこで、YC3.60/OT-I マウス脾臓細胞のフローサイトメトリー解析を行い、CFP と YFP 発現レベルを調べたところ、両蛍光タンパクとも樹状細胞で最も高く、B 細胞とマクロファージがそれに次ぎ、T 細胞の発現は最も低かった。このことから、YC3.60 トランスジェニックマウスの T 細胞の蛍光タンパク発現は、生体イメージングを行うには低すぎると結論し、T 細胞のカルシウムシグナルを調べる実験をこのマウスで行うことは断念した。

(2) 肝臓内の細胞活性化モニタリング  
樹状細胞やマクロファージの YC3.60 発現は比較的高かったため、これらの細胞の活性化状態を調べることにした。YC3.60 マウスに活性化 DSRed/OT-I 細胞を移入し、翌日 PbA-gfpOVA スポロゾイトを感染させた。約 4 4 時間後に肝臓の生体イメージング解析を行い、Metamorph ソフトウェアを用いて YFP/CFP 比率を計算して画像として表示させた。YFP/CFP 比率が高い部位は  $Ca^{2+}$  濃度が高まっていると考えられる。DSRed/OT-I 細胞がクラスター形成をした部位と、OT-I 細胞がない部位を比較してみると、OT-I クラスター形成のある部位で  $Ca^{2+}$  濃度が高い領域が観察された。別の実験から、 $CD8^+$  T 細胞がクラスター形成する領域では、樹状細胞やマクロファージも集簇してくることが観察されている。これらの細胞に、何らかのシグナルが入り、細胞質内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇している可能性が示唆された。

### (3) まとめ

YC3.60 トランスジェニックマウスをマラリア原虫肝細胞期の感染防御モデルに導入し、T 細胞の動態に加えて機能を同時にモニターすることを旨とした。T 細胞における YC3.60 タンパクの発現が十分ではなかったため、T 細胞の活性化をモニターすることができなかったのは残念であった。しかしながら、樹状細胞、マクロファージなどの自然免疫系細胞の活性化状態をモニターできる可能性が示された。これらの細胞の活動は、貪食やサイトカイン産生などのエフェクター機能をもって活性化状態を推測するのが一般的であるが、 $Ca^{2+}$  シグナルという細胞内の状態をモニター可能である利点は大きい。一方で、イメージング中の細胞の同定には他の蛍光タンパクを特定の細胞に発現させるなど、さらに改善工夫が必要である。また、FRET では CFP/YFP 比率をソフトで計算して解析するため、解像度も十分とはいえない。マラリア肝細胞期の感染防御における細胞活性化を FRET でモニター可能であることを示すことができたのは成果であったが、まだ技術的な改善の余地は大きい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文] (計 5 件)

1. M. Akbari, K. Kimura, JT Houts, K. Yui, Intravital imaging of the immune responses during liver-stage malaria infection: an improved approach for fixing the liver. *Parasit Int*, 査読有、65 (5) 502-505, 2016  
doi: 10.1016/j.parint.2016.02.011.
2. Henrietta, T D, Kimura, D, Miyakoda, M., Kimura K., Akbari, M, Yui, K, Expression of PD-1/LAG-3 and cytokine production by  $CD4^+$  T cells during infection with *Plasmodium* parasites, *Microbiol. Immunol.*, 査読有、60(2), 121-131, 2016.  
doi: 10.1111/1348-0421.12354.
3. Kimura, D, Miyakoda, M., Kimura K., Honma, K., Hara, H., Yoshida, H., Yui, K, Interleukin-27-producing  $CD4^+$  T cells regulate protective immunity during malaria parasite infection, *Immunity*, 査読有、44: 672-682, 2016.  
doi: 10.1016/j.immuni. 2016.02.011.
4. D My-Nhi, N Tien Huy, K Ohyama, D Kimura, N Thi Phuong Lan, L Uchida, N Van Thuong, C Thi My Nhon, L Hong Phuc, N Thi Mai, S Mizukami, L Quoc Bao, N Ngoc Doan, N Van Thanh Binh, L Chan Quang, J Karbwang, K Yui, K Morita, V Thi Uoe Huong, K Hirayama, A Proteomic Approach identifies candidate early Biomarkers to Predict Severe Dengue in Children, *Plos Neg Dis.*, 査読有、0004435, 1-15. 2016  
doi: 10.1371/journal.pntd.0004435.
5. Tamura, T, Kimura, K, Yui, K, Yoshida, S, Reduction of conventional dendritic cells during *Plasmodium* infection is dependent on activation induced death by type I and II interferons, *Exp. Parasitol.*, 査読有、159: 127-135, 2015.  
doi: 10.1016/j.exppara.2015.09.010.

### [学会発表] (計 12 件)

1. Regulation of the protective immune responses by IL-27 producing  $CD4^+$  T cells (Tr27 cells) during malaria infection, K. Yui, D. Kimura, M Miyakoda, K. Kimura, H Hara, H Yoshida, 第 45 回日本免疫学会学術集会、沖縄コンベンションセンター・ラグナガーデンホテル、沖縄県那覇市、12 月 5-7 日、2016 年
2. マラリア原虫抗原的 Foxp3 $CD4^+$ T 細胞による防御免疫応答の制御、由井克之、第 69 回日本寄生虫学会南日本支部大会、佐賀

- 大学、佐賀県佐賀市、11月5～6日、2016年
3. D Kimura, M Miyakoda, K Kimura, H Hara, Hi Yoshida, K Yui, Regulation of the immune responses by Tr27 cells during malaria infection、第15回あわじしま感染症・免疫フォーラム(特別講演)淡路夢舞台国際会議場、兵庫県淡路市9月6日～9日、2016年
  4. IL-27-producing CD4<sup>+</sup> T cells regulate protective immune responses during malaria infection, D Kimura, Doe H T, M Miyakoda, K Kimura, H Hara, H Yoshida, K Yui, 16<sup>th</sup> International Congress of Immunology, Melbourne, Australia, 21-26 August, 2016.
  5. Immune responses of CD8<sup>+</sup> T cells during blood stage of malaria infection, Bayarsaikhan, G, 都田真奈、山本一男、木村大輔、Akbari M, 木村一美、由井克之、第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、長崎大学良順会館、長崎県長崎市、5月13-14日、2016年
  6. Intravital imaging of CD8 T cell-mediated protective immunity at liver stage of malaria infection. Akbari M, KIMURA K, KIMURA D, MIYAKODA M, Yuda, M, Amino, R, YUI K、第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、長崎大学良順会館、長崎県長崎市、5月13-14日、2016年
  7. Protection against the liver stage of malaria infection by CD8 T cell-mediated immunity. Akbari M, 木村一美、木村大輔、都田真奈、油田正夫、Rogerio Amino、由井克之、第85回日本寄生虫学会大会、宮崎市民プラザ、宮崎県宮崎市、3月19-20日。2016年
  8. IL-27-producing CD4<sup>+</sup> T cells induced during malaria infection are distinct from Tr1 cells, KIMURA D, MIYAKODA Ma, DOE Henrietta T, KIMURA K, HARA H, YOSHIDA H, YUI K、第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市、11月18-20日、2015年
  9. Immune response of specific CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen during blood stage of malaria infection, G Bayarsaikhan, M Mana, D Kimura, M Akbari, K Kazumi, K Yui, 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市、11月18-20日、2015年
  10. Intravital imaging of CD8 T cell-mediated protective immunity at liver stage of malaria infection. Akbari M, KIMURA K, KIMURA D, MIYAKODA M, Rogerio Amino, YUI K, 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市、11月18-20日、2015年
  11. Regulation of immune responses by IL-27-producing CD4<sup>+</sup> T cells during malaria infection, K. Yui, The 12<sup>th</sup> NUS-Nagasaki joint symposium, NUS, Singapore, June 11&12, 2015
  12. IL-27-producing CD4<sup>+</sup> T cells regulate protective immune responses during malaria infection, KIMURA D, MIYAKODA M, DOE Henrietta T, KIMURA K, Hara, H, Yoshida, H, YUI K, 25<sup>th</sup> Annual molecular parasitology vector biology Symposium, Athens, GO USA, April 28-29, 2015
- 〔その他〕  
ホームページ等
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
由井 克之 (YUI, Katsuyuki)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授  
研究者番号：90274638
- (2)研究分担者  
アキバリ マスード (AKBARI, Masoud)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教  
研究者番号：60736396