

令和元年6月19日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08764

研究課題名(和文) 転写因子IRF8の発現抑制を介したマラリアによる樹状細胞分化阻害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Inhibition of dendritic cell development via the suppression of transcription factor IRF8 by malaria

研究代表者

市野 素英 (ICHINO, Motohide)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：60271368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：寄生虫感染症のマラリアに対しては防御免疫が起こりづらい。その理由のひとつに、マラリア原虫による免疫細胞の機能抑制が挙げられるが、メカニズムは十分に理解されていない。本研究では、マラリアで免疫抑制される宿主の因子と免疫細胞を解析した。その結果、マラリア原虫感染マウスの脾臓において、免疫応答で中心的な役割を果たす樹状細胞(DC)の割合が、DCの分化に重要な転写因子IRF8の発現低下とともに減少していること、そしてDCの中でもとくにXCR1陽性細胞が減少していることを見出した。このようにして、マラリア原虫はDCを標的として分化・機能阻害を起こし、免疫抑制を起こ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

マラリアは死者数の最も多い寄生虫感染症である。ノーベル賞を受賞した抗マラリア薬に対してすら薬剤耐性原虫の出現が問題となっており、開発されたワクチンも残念ながら効果は限定的である。本研究は、マラリア原虫による免疫抑制に着目し、免疫抑制のメカニズムを明らかにすることを目的とする。免疫細胞の中でもとくに重要な樹状細胞の分化機能不全でマラリアをとらえる視点が新しく、新しい治療法開発につなげるために、免疫抑制を解除して防御的な免疫応答誘導を目指すものである。

研究成果の概要(英文)：Malaria parasites suppress host immune responses during its infection to evade host immunity. To understand the molecular and cellular mechanisms of the suppression of dendritic cell (DC) development, we analysed DC subsets in the spleen of malaria parasite-infected mice. We found that the reduced ratio of cDC1 subset in the spleen of the parasite-infected mice accompanied by the decreased expression of transcription factor IRF8 compared with the spleen cells in the uninfected mice. Also, we found that the bone marrow cells cultured with the parasite-infected red blood cells in vitro developed fewer amount of cDC1. Especially, few splenic XCR1+ DCs were detected in the parasite-infected mice. These results suggest that malaria parasites inhibit the development of XCR1+ DCs, suppressing the expression of IRF8 during infection.

研究分野：免疫学

キーワード：マラリア 樹状細胞 IRF8 免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

(1) マラリアと樹状細胞・転写因子に関する研究

樹状細胞 (DC) は抗原提示細胞であり、免疫応答において自然免疫から獲得免疫にいたるまでとても重要な役割を果たしている。研究代表者は寄生虫感染症のマラリアに興味を抱き、マウスモデル (マウスマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA) 感染 C57BL/6 マウス) を用いて免疫抑制現象に注目して研究を行ってきた。そしてマウス脾臓中の DC 集団 (サブセットと呼ぶ) が、マラリア原虫に感染していないマウスと比べて感染マウスで異なり、機能的にもその抗原提示能が低下していることを見出してきた (臨床免疫・アレルギー科 50;709, 2008)。このようにして、マラリア原虫は免疫を回避するために DC の分化と機能を抑制していると考えられるようになってきた。

連携研究者の田村は、DC やマクロファージの分化・増殖や機能に転写因子 Interferon Regulatory Factor (IRF) が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた (Tamura *et al.*, Annu Rev Immunol 26: 535, 2008)。研究代表者と連携協力者はこれまでに協力して、マラリアで DC サブセットに異常見られること、そして IRF8 と IRF4 の発現低下が関与することを報告してきた (Tamura and Ichino, The Waksman Foundation Report of Researches, 2011)。

(2) マラリアによる免疫抑制の他の解析

マラリアで見られる免疫抑制に関しては、DC の成熟・機能の不全や、制御性 T 細胞の誘導に関する報告などがあるものの、免疫抑制に関わる分子やメカニズムは十分に理解されているとは言えない。マラリア原虫が免疫を回避する仕組みを理解することは、マラリア撲滅のために明らかにすべき重要な課題のひとつである。

2. 研究の目的

寄生虫感染症のマラリアでは宿主のさまざまな免疫細胞の機能が抑制され、そのことによりマラリア原虫が免疫から回避していると考えられるが、抑制メカニズムは十分に明らかではない。これまでに研究代表者は、マラリアのマウスモデルにおいて転写因子 IRF8 の発現減少を伴う樹状細胞 (DC) の分化阻害を見出している。本研究では、血球系細胞の分化不全の観点からマラリアをとらえ、DC の分化阻害メカニズムを解き明かすために、マウスモデルと骨髓細胞からの DC 培養系を用いて、マラリアによる IRF8 の発現抑制と DC の分化阻害に関与する宿主タンパク質分子を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マラリア原虫感染マウスの脾臓の DC サブセットの解析

C57BL/6 マウスにマウスマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA) を感染させる実験系はヒトのマラリアを模した良いモデルである。これまでの研究では DC サブセットを CD8⁺ DC、CD4⁺ DC、DNDC、PDC に分類し、マラリアにおける DC サブセット異常を報告してきた。本研究では近年の分類に従い、cDC1 (*in vivo*では CD8⁺ DC、*in vitro*では CD24⁺ SIRP α ⁻ DC)、cDC2 (*in vivo*では CD4⁺ DC、*in vitro*では CD24⁻ SIRP α ⁺ DC) として DC サブセットを詳細に解析する。このとき、cDC1 の分化に重要な IRF8 をモニターするために、IRF8-GFP マウスも使用する。cDC1 はクロスプレゼンテーション機能を有する DC サブセットで、マラリアに対する免疫応答で重要と考えられており、IRF8-GFP マウスを用いれば、cDC1 サブセットを GFP 発現によりモニターすることが可能である。

(2) *in vitro*におけるマラリア原虫感染赤血球による DC 分化阻害の解析

マウス骨髄細胞に *in vitro*で DC の増殖因子である Flt3L を加えて培養すると、骨髄細胞は DC に分化する。培養される DC には cDC1、cDC2、DNDC、PDC が含まれる。マラリア原虫感染赤血球をこの DC 培養系に添加し、どのような DC サブセットが分化阻害されるか、また cDC1 の分化に重要な IRF8 の発現がどのように変化するかを詳細に解析する。対照として、通常の DC 培養と、非感染マウス由来の正常な赤血球を添加した DC 培養を行い、比較検討する。

(3) 遺伝子導入を利用した DC 培養による分化阻害の解除の検討

これまでの研究から DC の分化阻害とともに転写因子 IRF8 の発現低下が観察されている。そこで、あらかじめマウス骨髄細胞に *Irf8* 遺伝子を導入し、マラリア原虫感染赤血球を添加して *in vitro*における DC 培養を行う。通常の DC 培養、あるいは正常赤血球添加時における DC と比較し、cDC1 が正常に分化してくるか検討する。

(4) マラリア原虫感染マウスの脾臓における XCR1 発現 DC サブセットの解析

ケモカイン受容体 XCR1 を発現する XCR1⁺ DC は、cDC1 に含まれる DC サブセットで、細胞傷害性 T 細胞を誘導する能力や、クロスプレゼンテーション能の高いことが知られている。XCR1⁺ DC は腫瘍やウイルス感染に対する防御的な免疫応答に重要であることが示されつつあるが、マラリアの防御免疫における役割は明らかでない。そこで、IRF8-GFP トランスジェニックマウスを用いたマウスマラリアモデルを用いて、XCR1⁺ DC に着目して解析する。

4. 研究成果

(1) マラリアにより脾臓 cDC1 サブセットの割合が減少する

IRF8-GFP トランスジェニックマウスを用いたマラリアモデルの解析により、脾臓における

cDC1、cDC2の各サブセットの割合の減少が認められた。この結果はマラリア原虫感染マウスの脾臓でCD8⁺ DC、CD4⁺ DCの各サブセットの減少を見出したこれまでの研究結果と矛盾しない。また、cDC1の減少に伴い、脾臓細胞でIRF8発現の低下も認められた。

(2) *in vitro*にてマラリア原虫感染赤血球はDCの分化を阻害する

マウス骨髄細胞を *in vitro*にてDCへ分化させる培養系にマラリア原虫感染赤血球を添加すると、DCの分化阻害の起こることが認められた。とくにcDC1の分化が阻害されており、培養細胞ではIRF8発現の低下も認められた。

(3) マラリア原虫感染赤血球存在下における *Irf8* 遺伝子導入骨髄細胞のDCへ分化

マウス骨髄細胞に *Irf8* 遺伝子を導入しIRF8を強制発現させた。そしてこの遺伝子導入骨髄細胞からのDC培養を、マラリア原虫感染赤血球を添加して *in vitro*にて行った。大部分のIRF8発現細胞がcDC1へ分化すると予想されたが、DCへの分化は依然阻害されており、IRF8発現ではcDC1への分化阻害を救済することはできなかった。

(4) マラリアにおける脾臓XCR1⁺ DCの選択的消失

cDC1に属するXCR1⁺ DCは高いクロスプレゼンテーション能を有し、免疫応答を引き起こす抗原提示細胞として非常に重要な役割を果たす細胞である。IRF8-GFPトランスジェニックマウスのマラリアモデルを用いて、脾臓DCサブセット中のXCR1⁺ DCを解析したところ、選択的にXCR1⁺ DCが減少していることを見出した(図)。マラリア原虫は、自身の生存のためにIRF8発現を抑制するとともに、cDC1の中でもとくにXCR1⁺ DCの分化を阻害し、抗マラリア免疫応答を阻害する可能性が示唆された。

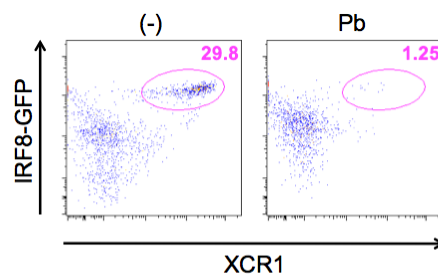


図 マラリア原虫感染マウスの脾臓ではXCR1⁺ DCが減少する
Pb: マラリア原虫感染マウス
(-): 非感染マウス
CD11c⁺ MHC II⁺ DCIにゲートしている

(5) まとめ

本研究により、マラリアのマウスモデルで、XCR1⁺ DCが選択的に消失することが初めて明らかにされ、マラリアによる免疫抑制においてXCR1分子が重要な標的分子であることが示された。このようにして、マラリア原虫は、IRF8発現を抑制するとともに、防御免疫で重要な役割を果たすXCR1⁺ DCを選択的に分化阻害して免疫抑制を起こしていると考えられる。今後、XCR1⁺ DCの抗マラリア免疫における役割を明らかにし、XCR1⁺ DCを回復させるような制御方法を確立することでマラリアの新しい治療戦略につながる事が期待できる。

<引用文献>

1. 市野素英: マラリアにおける樹状細胞の抗原提示機能低下の機序、臨床免疫・アレルギー科、第 50 巻 6 号、p709-714、科学評論社、東京、2008.
2. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T: The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 26, 535-584, 2008
3. Tamura T, Ichino M: Aberrant differentiation of dendritic cells in malaria infection. The Waksman Foundation of Japan Inc. Report of Researches in 2010, 21-27, 2011.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ban T, Sato GR, Nishiyama A, Akiyama A, Takasuna M, Umehara M, Suzuki S, Ichino M, Matsunaga S, Kimura A, Kimura Y, Yanai H, Miyashita S, Kuromitsu J, Tsukahara K, Yoshimatsu K, Endo I, Yamamoto T, Hirano H, Ryo A, Taniguchi T, Tamura T: Lyn kinase suppresses the transcriptional activity of IRF5 in the TLR-MyD88 pathway to restrain the development of autoimmunity. *Immunity*, 査読有, 45 (2), 319-332, 2016.

[学会発表] (計 1 件)

1. Harada I, Sasaki H, Ichino M, Nishiyama A, Tamura T: Soluble factors derived from leukemic cells compromise anti-tumor immunity by inhibiting IRF8-dependent dendritic cell development in chronic myeloid leukemia. 第 41 回日本分子生物学会, 横浜, 2018.
2. Harada I, Sasaki H, Nishiyama A, Ichino M, Tamura T: Soluble factors produced by BCR-ABL-positive leukemic cells may compromise antitumor immunity in chronic myeloid leukemia. 第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台, 2017.
3. 佐々木 悠, 原田生起, 金子尚史, 西山 晃, 市野素英, 田村智彦: BCR-ABL が誘導する IL-6 は共存する非腫瘍性細胞における IRF8 発現と樹状細胞分化を抑制する. 第 79 回日本血液学会学術集会, 東京, 2017.
4. Harada I, Ichino M, Nishiyama A, Tamura T: Soluble factors derived from BCR-ABL-expressing hematopoietic cells inhibit the development of dendritic cells in mice. 第 45 回日本免疫学会学術集会, 宜野湾, 2016.

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 田村 智彦

ローマ字氏名: (TAMURA Tomohiko)

研究協力者氏名: 西山 晃

ローマ字氏名: (Nishiyama Akira)

研究協力者氏名：中林 潤

ローマ字氏名：(NAKABAYASHI Jun)

※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。