

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15051

研究課題名(和文) マラリア肝障害を引き起こす免疫応答の解明

研究課題名(英文) Immunopathology of liver injury during malaria

研究代表者

後藤 康之 (Goto, Yasuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：50553434

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)：肝障害はマラリアにおける代表的な症状であるが、その発症メカニズムは不明な点が多い。MRP14はミエロイド細胞に豊富に発現している蛋白質であり、様々な炎症性疾患との関わりが報告されている。そこで、本研究ではMRP14がマラリア肝障害に与える影響について明らかにするために、原虫感染マウスに対して組換えMRP14の投与を行った。結果、投与群では肝臓へのMRP14陽性細胞の浸潤が増強され、肝臓の壊死、それに伴う血中肝酵素の上昇が見られた。以上より、マラリアにおいてMRP14陽性細胞の浸潤にともなうMRP14の分泌が炎症反応の亢進による肝障害の悪化に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hepatic dysfunction is one of the clinical features in severe malaria. However, the mechanism of hepatic injury during malaria is still unknown. MRP14 is abundantly expressed by myeloid cells and involved in various inflammatory diseases. In order to verify whether extracellular MRP14 is involved in the pathology of hepatic injury during rodent malaria, we intravenously administrated recombinant MRP14 (rMRP14) to mice infected with *Plasmodium berghei*. The administration of rMRP14 exacerbated the hepatic injury during the infection, and their serum concentration of hepatic enzymes increased significantly more than PBS-treated controls. More MRP14+ macrophages accumulated in rMRP14-treated mice than PBS-treated controls after infection. The results indicate that MRP14 promotes the accumulation of MRP14+ cells and the up-regulation of pro-inflammatory molecules, which amplify inflammatory cascade leading to hepatic injury.

研究分野：免疫学、寄生虫学

キーワード：マラリア 肝障害 MRP14

### 1. 研究開始当初の背景

マラリアは *Plasmodium* 属原虫によって引き起こされる感染症で、世界 70 か国以上で年間 3 - 5 億人の患者と 100 万人近い死者をもたらしている。マラリアの症状として発熱、貧血、脾腫、肺水腫、黄疸、脳マラリアなどがあるが、その病態形成メカニズムについては不明な点が多い。我々は、ヒトと同様の病態を呈するマラリア原虫感染マウスの臓器では MRP14 陽性マクロファージ (MRP14+ M $\phi$ ) の集簇が強く誘導されることを明らかにした (Mizobuchi et al., 2014, Exp Parasitol)。MRP14+ M $\phi$  は炎症性マクロファージとして知られ、感染症のみならず動脈硬化やがんなど慢性炎症性疾患においてもその集簇が報告されているが、MRP14+ M $\phi$  は活性化刺激により MRP14 を分泌することも報告されている。

感染症において、どういった免疫応答が病態の原因となっているのか、病原体の排除など直接的な方法以外にどうすれば症状の改善につながるのか、など病気の根幹とも言える部分が不明な点が多く残されている。特に、内因性 TLR アゴニストが炎症を介した病態形成に果たす役割についてはここ 10 年で研究が進んだ分野であり、原虫感染症の病態形成時におけるこれら内因性因子の役割については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、宿主因子の一つである MRP14 がマラリアにおける肝障害を引き起こすメカニズムの解明を目的とした。MRP14 による肝障害誘導のメカニズムを明らかにするため、in vitro ならびに in vivo 系を用いた、MRP14 によるマクロファージ活性化ならびにマクロファージ遊走のメカニズム解析を行った。また、肝障害誘導における MRP14 の重要度を明らかにするために、MRP14-KO マウスを作製して感染実験を行った。

本研究は、世界で年間 100 万人もの命を奪う本症の理解ならびに治療法の確立に繋がる重要な研究である。同時に、がんや自己免疫疾患など同様に MRP14 が病態形成に関与すると考えられる疾患への応用も期待できる。

### 3. 研究の方法

前述のマラリア原虫感染マウスにおいて、血中 MRP14 濃度が上昇していたため (Mizobuchi et al., 2014, Exp Parasitol)、細胞外 MRP14 の分泌が炎症反応の促進を介して肝障害の悪化を誘導することが考えられた。そこで、大腸菌を用いて組換え MRP14 (rMRP14) の作製を行い、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* を感染させたマウスに静脈内投与を行った。また、MRP14 による細胞集簇や炎症反応の亢進について解析するために、非感染マウスへの rMRP14

の投与も同様に行った。MRP14 投与感染マウスにおける肝障害について解析を行うとともに、肝臓の病理学的・免疫組織化学的手法を中心に、肝臓に集簇する免疫細胞の同定ならびに各種サイトカイン・炎症関連因子の発現解析を行った。さらに、MRP14 による M $\phi$  活性化をより詳細に解析するため、MRP14 刺激による M $\phi$  のサイトカイン・ケモカイン産生 (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、CCL2 等) および M $\phi$  膜受容体の発現 (サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、接着因子、貪食受容体等) を解析した。さらに、BALB/cA 背景の MRP14 ノックアウト (MRP14-KO) マウスを作製して、マラリア肝障害における内因性 MRP14 の役割について解析を行った。

合わせて、MRP14 が炎症性反応を起こす分子カスケードを明らかにすることを目指して、ヒトマラリア患者におけるトランスクリプトームデータを用いて、MRP14 と発現に相関がみられる分子の探索を行った。それら因子について、マラリア感染マウスモデルならびに MRP14 投与モデルを用いて、MRP14 との相互作用についてより詳細な解析を行った。

### 4. 研究成果

*P. berghei* 感染マウスに rMRP14 を投与したところ、血中肝酵素の上昇や肝臓の壊死の増強が見られ、MRP14 がマラリア肝障害の悪化に寄与することが明らかとなった (図 1)。

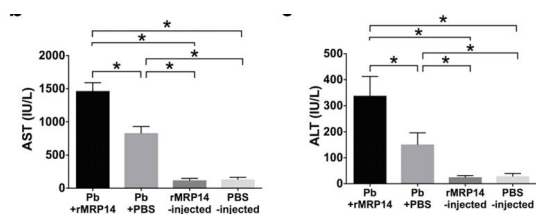


図 1 . *P. berghei* 感染マウスへの rMRP14 投与による肝酵素の上昇

また、肝障害の悪化には MRP14 陽性細胞の集簇の亢進が伴い、これら細胞集簇は非感染マウスに rMRP14 を投与するだけでも見られることから、分泌型 MRP14 の役割としてマクロファージの集簇があり、そのマクロファージがマラリアにおける肝障害を増悪することが示唆された。関連して、rMRP14 の投与により TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの増強や iNOS の発現上昇が見られたことから、MRP14 はマクロファージの集簇のみならず活性化も引き起こすことで、炎症性の肝障害に寄与することが示唆された。

一方、MRP14 を欠損した BALB/cA マウスに *Plasmodium berghei* を感染させたところ、予想に反して肝障害の重篤度は wild-type と MRP14-KO マウスで同等であった (図 2)。また、肝障害に関連すると考えられるサイトカインや一酸化窒素の発現量にも差が見られ

なかった。以上のことは、MRP14 の欠損が細胞外 MRP14 の欠失による炎症応答の抑制という方向だけでなく、細胞内での役割など他の機能の欠失による別の効果をもたらしたことが予想された。

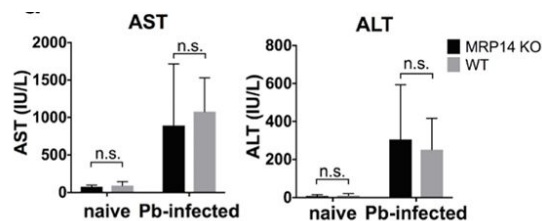


図 2 . MRP14 の欠損はマラリア肝障害に影響しない

そこで、炎症モデルとして LPS 誘導性ショックにおける MRP14 欠失の影響について解析を行ったところ、過去に C57BL/6 であった報告とは異なり、MRP14 欠失によるショック症状の改善は見られなかった (図 3)。これらの違いは骨髄細胞の性質という時点ですでにみられることから、遺伝系統の異なるマウスでは MRP14 の機能が異なることを示唆する初めての知見となった。

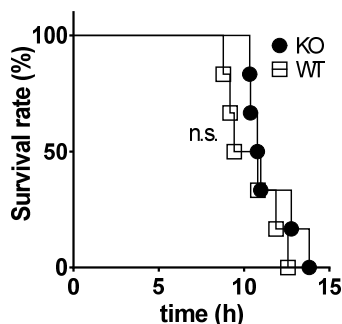


図 3 . MRP14 の欠損は BALB/cA マウスにおける LPS 誘導性ショックに影響しない

以上のように、分泌型 MRP14 はマラリア肝障害に影響する一方、内因性 MRP14 を完全に欠損した場合は肝障害に影響を与えないことから、MRP14 による肝障害が他の因子を介して起こっている可能性が考えられた。そこで、MRP14 との関連が高い因子を探索すべく、ヒトマラリア患者血液トランスクリプトームデータの相関解析を行ったところ、MRP8 や S100A12 といった既知の分子に合わせて、GMFG、CSTA といった、これまで MRP14 との関連性が知られてなかった分子を同定することに成功した (図 4)。そこで、前述の MRP14 投与マウスモデルを用いて、MRP14 が GMFG や CSTA の発現に与える影響を調べたところ、これら 2 つの因子は MRP14 の下流にあることが示唆された。

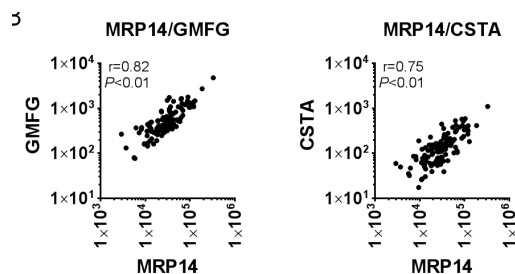


図 4 . ヒトマラリア患者における MRP14 と GMFG、CSTA の発現相関

## 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 2 件)

Mizobuchi H, Fujii W, Isokawa S, Ishizuka K, Wang Y, Watanabe S, Sanjoba C, Matsumoto Y, Goto Y. 2018. Exacerbation of hepatic injury during rodent malaria by myeloid-related protein 14. PLOS ONE Accepted for publication. 査読有

Mizobuchi H, Fujii W, Ishizuka K, Wang Y, Watanabe S, Sanjoba C, Matsumoto Y, Goto Y. 2018. MRP14 is dispensable for LPS-induced shock in BALB/c mice. Immunol Lett 194:13-20. 査読有  
doi: 10.1016/j.imlet.2017.12.003.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

後藤 康之 (GOTO, Yasuyuki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号 : 50553434

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

藤井 渉 (FUJII, Wataru)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号： 40708161

山岸 潤也 (YAMAGISHI, Junya)  
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン  
ター・准教授  
研究者番号： 80535328

(4)研究協力者  
なし