

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07093

研究課題名(和文) 脂肪組織を基軸とした新たな妊娠マラリア病態発症機構の解明

研究課題名(英文) Pathophysiology of malaria during pregnancy

研究代表者

新倉 保 (Nikura, Mamoru)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：30407019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中のマラリアの病態の重症化には、妊娠による免疫抑制が主な原因であるものの、妊娠関連ホルモンの作用による造血亢進や脂肪組織の変化とマラリア病態重症化との関係については明らかにされていない。本研究で、妊娠中のマラリアのマウスモデルを詳細に解析することにより、妊娠誘導性の網状赤血球症が妊娠中の原虫血症の増悪に関与することが示唆された。また、乳腺組織の比較プロテオーム解析を行ったところ、マラリア原虫感染マウスの乳腺組織においてIFNGR1シグナル関連分子の発現増加が認められた。これらの結果から、乳腺組織におけるIFNGR1シグナル関連分子は、流産や死産を予測するバイオマーカーになると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠中のマラリアは母体だけでなく胎児にも重大な影響を与えることから、マラリア流行地において社会問題となっている。本研究で、妊娠中のマラリアのマウスモデルを詳細に解析することにより、妊娠マラリアの重症化に関与すると考えられる新たな因子を見出した。さらに、乳腺組織の比較プロテオーム解析により、流産や死産を予測するバイオマーカーになると期待される分子を見出した。本研究成果は、妊娠中のマラリアの早期診断や重症化の予防・対策強化する上で有用な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Pregnancy-associated hormones are involved in physiological changes, such as immune tolerance and metabolic adaptations, during pregnancy. However, the effect of metabolic adaptations during pregnancy on the increased susceptibility to infection with malaria parasites during pregnancy is not fully understood, while immune tolerance by pregnancy-associated hormones has been considered to be involved in the susceptibility. Here, we found that pregnancy-induced reticulocytosis is a risk factor for a rapid increase in parasitemia during malaria in pregnancy. Moreover, increased levels of IFN- signaling pathway-related proteins were observed in mammary gland tissue of pregnant mice infected with Plasmodium berghei ANKA, suggesting that IFN- signaling pathway-related proteins would be a biomarker for predicting of adverse pregnancy outcomes such as fetal growth restriction, stillbirth, premature delivery.

研究分野：寄生虫学、原生生物学、分子生物学、感染免疫学

キーワード：マラリア 妊娠 網状赤血球症 乳腺組織 比較プロテオーム IFNGR1

1. 研究開始当初の背景

妊娠中にマラリアに罹患すると、非妊娠時より症状が増悪することが知られている。妊娠中のマラリアの病態の重症化は、妊娠による免疫抑制が主な原因であると考えられている。一方、妊娠中には、妊娠関連ホルモンの作用によって乳腺組織の増加や赤血球の造血が亢進することが知られている。これらの因子は、妊娠中のマラリアの病態の重症化に関わると推測されるが、妊娠中のマラリアの病態重症化との関係は明らかにされていない。

2. 研究の目的

- (1) 妊娠中のマラリアのマウスモデルを用いて、妊娠中の乳腺組織の増加と病態重症化との関係を明らかにする。
- (2) 妊娠中の赤血球造血亢進と病態重症化との関係を明らかにする。
- (3) マラリア原虫感染赤血球の乳腺組織への蓄積による乳腺組織の分子発現変化を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) マウス：8-10 週齢のメスの C57BL6/J を使用した。また、赤血球造血を亢進させるために眼窩静脈から脱血 (200 μ L) し、脱血マウスとして使用した。
- (2) マラリア原虫：強毒株マウスマラリア原虫である *Plasmodium berghei* (*Pb*) ANKA およびルシフェラーゼを発現する *Pb* ANKA を使用した。また、SMAC を欠損させた接着不全原虫 (SMAC 欠損原虫) を作出し、使用した。
- (3) 感染方法：交配後 12 日目のマウスまたは脱血後 1 日目のマウスに *Pb* ANKA を感染させた。
- (4) 病態解析：感染後 3 日目から原虫血症および出生仔の体重の推移を解析した。また、感染後 5 日目 (交配後 17 日目) に乳腺組織を採取し、All-in-One Fluorescence Microscope (BZ9000; KEYENCE Japan, Osaka, Japan) を用いて組織学的解析を行った。
- (5) 生体イメージング解析：宿主体内におけるマラリア原虫の局在を解析するために、マウスにルシフェラーゼ発現 *Pb* ANKA を感染させた。感染後 3 日目のマウスにルシフェリンを静脈内投与し、Photon IMAGER system (Biospace Lab, Nesles-la-Vallée, France) で生体イメージング解析を行った。
- (6) 比較プロテオーム解析：乳腺組織の分子発現変化を明らかにするために、感染後 5 日目 (交配後 17 日目) の乳腺組織からタンパク質を抽出し、LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて比較プロテオーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 妊娠中の乳腺組織の増加と病態重症化との関係

これまでの研究成果によって、妊娠マウスの乳腺組織には非妊娠マウスの乳腺組織と比較して 7~8 倍ものマラリア原虫感染赤血球が蓄積することを生体イメージング解析により見出している (図 1)。

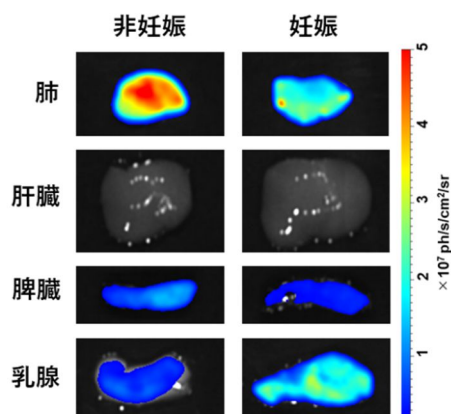


図 1. 妊娠マラリアのマウスモデルの生体イメージング解析

本研究では、まず、妊娠による乳腺組織への影響を明らかにするために、乳腺組織の組織学的解析を行った(図2)。その結果、妊娠マウスの乳腺組織では乳腺が形成されていることが明らかになった(図2C,D)。次に、マラリア原虫を感染させた妊娠マウスの乳腺組織の組織学的解析を行ったところ、乳腺組織の毛細血管に感染赤血球が集積していることを見出した(図2E,F)。

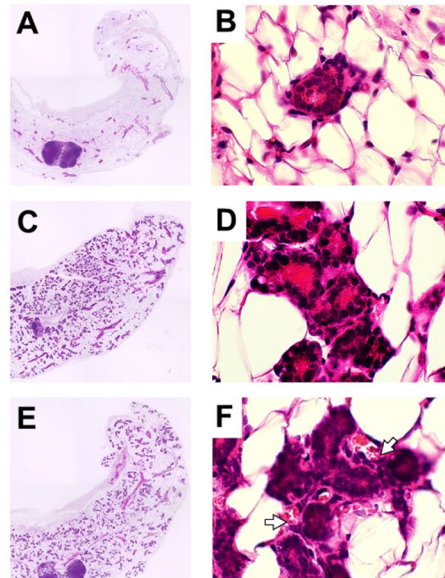


図2. 乳腺組織の組織学的解析 (HE 染色)

A,B. 非妊娠マウスの乳腺組織. C,D. 妊娠マウスの乳腺組織
E,F. マラリア原虫を感染させた妊娠マウスの乳腺組織.
B,D,F. 拡大図. 矢印は血管内皮に接着したマラリア原虫感染赤血球を示す.

妊娠による乳腺組織の分子発現変化を明らかにするために、非妊娠マウスと妊娠マウスの乳腺組織からそれぞれタンパク質を抽出し、比較プロテオーム解析を行った。その結果、妊娠マウスの乳腺組織において、leukemia inhibitory factor receptor や alpha-1B- glycoprotein が著しく増加していることが明らかになった。これらの分子は膜タンパク質であることから、感染赤血球の乳腺組織への蓄積に関わると推測される。

マラリア原虫感染赤血球の表面には、原虫由来の接着関連分子である schizont membrane-associated cytoadherence protein (SMAC) などが発現しており、それらの分子を介して宿主の血管内皮細胞などに感染赤血球が接着する。そこで、感染赤血球の乳腺組織への蓄積と妊娠中のマラリア病態重症化との関係を明らかにするために、SMAC を欠損させた接着不全原虫 (SMAC 欠損原虫) を作出し、野生型原虫の病態との比較解析を行った。その結果、SMAC 欠損原虫を感染させた妊娠マウスにおいて、感染赤血球の乳腺組織への蓄積が野生型原虫を感染させた乳腺組織と比較して著しく減少した。しかしながら、SMAC 欠損原虫を感染させた妊娠マウスの原虫血症は、野生型原虫を感染させたマウスと同様、非妊娠マウスと比較して著しく増悪した(図3)。これらの結果から、妊娠中のマラリア原虫感染赤血球の乳腺組織への蓄積は、原虫血症の増悪には関与しないことが示唆された。

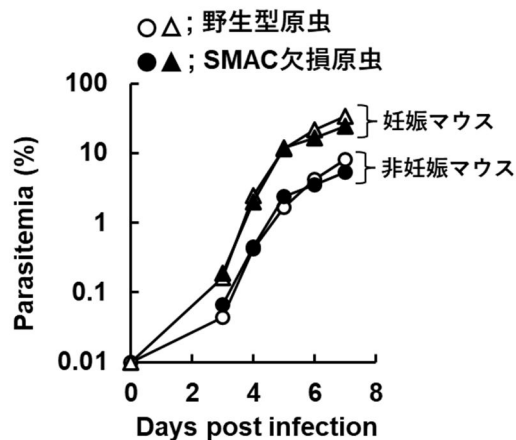


図3. 妊娠による原虫血症の増悪.

(2) 妊娠中の赤血球造血亢進と病態重症化との関係

妊娠による赤血球造血への影響を明らかにするために、交配後 15 日目のマラリア原虫を感染させていない妊娠マウスと非妊娠マウスの血球数を比較解析した。その結果、妊娠マウスの網状赤血球数は、非妊娠マウスと比較して著しく増加していることが明らかになった。妊娠中の造血亢進と病態重症化との関係を明らかにするために、脱血により網状赤血球数を増加させたマウスに *Pb ANKA* を感染させ、原虫血症の推移を解析した。その結果、*Pb ANKA* を感染させた脱血マウスの原虫血症は、非妊娠マウスと比較して増悪し、その増加パターンはマラリア原虫を感染させた妊娠マウスの原虫血症と同様であった (図 4)。これらの結果から、妊娠中の原虫血症の増悪には網状赤血球数の増加が関与することが示唆された。

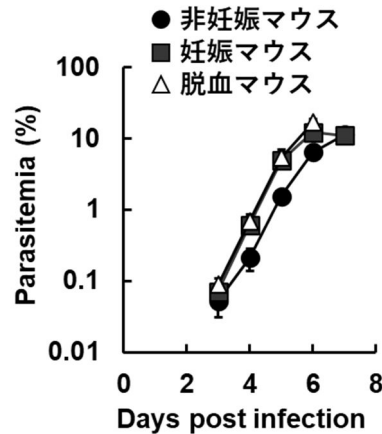


図 4. 脱血による原虫血症の増悪.

(3) マラリア原虫感染赤血球の蓄積による乳腺組織の分子発現変化

乳腺組織に感染赤血球が蓄積することによって乳腺組織の分子発現が変化するのはどうかを明らかにするために、*Pb ANKA* を感染させた妊娠マウスの乳腺組織と非感染妊娠マウスの乳腺組織からタンパク質を抽出し、比較プロテオーム解析を行った。その結果、マラリア原虫を感染させた妊娠マウスの乳腺組織において、Signal transducer and activator of transcription 1 や Interferon-inducible GTPase 1 などの IFN- γ によって発現が誘導される分子が著しく増加することを見出した。これらの結果から、マラリア原虫を感染させた妊娠マウスの乳腺組織において、IFNGR1 依存的な炎症反応が誘導されることが示された。

総括

マラリア原虫は、全世界で約 2 億人に健康被害を与え、年間 40 万人を超える人々を死に至らしめる、人類にとって未だに脅威の病原体である。特に、妊娠中のマラリアは、母体だけでなく胎児にも重大な影響を与えることから、マラリア流行地において社会問題となっている。妊娠マラリアによる胎児の流産や死産を未然に防ぐためには、マラリア原虫の早期検出とともに、流産や死産を予測する徴候やバイオマーカーを用いた新たな診断法の確立が必要不可欠である。

妊娠マウスにおけるマラリア原虫感染赤血球の乳腺組織への蓄積は感染早期から認められることから、妊娠マラリアの早期検出に有用である (Niikura, PLoS One, 2017)。一方、本研究結果によって、妊娠中の網状赤血球の増加が原虫血症の増悪にかかわることが示唆された。これらの結果から、妊娠中のマラリアの病態の重症化には妊娠による免疫抑制だけでなく造血亢進も重要な因子であると考えられ、網状赤血球の増加は病態重症化を予測する指標の 1 つになる可能性がある。

さらに、本研究結果により、マラリア原虫を感染させた妊娠マウスの乳腺組織において、IFNGR1 依存的な炎症反応が誘導されることが示された。これらの結果から、マラリアに罹患した妊婦においても乳腺組織で炎症が誘導され、乳腺炎による乳房の痛みや腫れなど、病態重症化の徴候となる症状を示していると推測される。

マラリアでは、IFN- γ によって誘導される全身性の炎症が起こることが知られている。妊娠マラリアにおいても、妊娠転帰の不良の原因となる胎盤絨毛組織の変性には IFNGR1 が重要な役割を果たしていることが明らかにされている。乳腺組織における IFNGR1 シグナル関連分子の増加は、流産や死産を予測するバイオマーカーになると期待される。

本研究で、マラリア原虫感染赤血球の乳腺組織への蓄積は原虫血症の増悪に直接関与しないことが示唆された。しかし、乳腺組織で IFNGR1 依存的な炎症反応が誘導されたことから、乳腺組織が全身性の炎症に寄与している可能性がある。今後、乳腺組織が全身性の炎症の起点となる臓器またはブースターとなる臓器であるかどうかを明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Niikura M, Fukutomi T, Mineo S, Mitobe J, Kobayashi F	4. 巻 20
2. 論文標題 The association between acute fatty liver disease and nitric oxide during malaria in pregnancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12936-021-03999-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Niikura M, Fukutomi T, Mineo S, Mitobe J, Kobayashi F	4. 巻 16
2. 論文標題 Malaria in the postpartum period causes damage to the mammary gland	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0258491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0258491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Niikura M, Fukutomi T, Mitobe J, Kobayashi F	4. 巻 11
2. 論文標題 Roles and Cellular Localization of GBP2 and NAB2 During the Blood Stage of Malaria Parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 737457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2021.737457	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 新倉保, 小林富美恵	4. 巻 37
2. 論文標題 2030年までのマラリア根絶を目指して ~分子寄生虫学研究成果からの発信~	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 呼吸器内科	6. 最初と最後の頁 618-624
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niikura M, Fukutomi T, Fukui K, Inoue SI, Asahi H, Kobayashi F	4. 巻 -
2. 論文標題 G-strand Binding Protein 2 is Involved in Asexual and Sexual Development of Plasmodium berghei	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue SI, Niikura M, Asahi H, Kawakami Y, Kobayashi F	4. 巻 155
2. 論文標題 T cells modulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 519 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imm.12997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 新倉保, 朝日博子, 井上信一, 小林富美恵
2. 発表標題 マウスモデルを用いた授乳期特異的なマラリア病態の解明
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新倉保, 福富俊之, 福井花菜, 井上信一, 朝日博子, 小林富美恵
2. 発表標題 赤内期マラリア原虫におけるG-strand Binding Protein 2の役割
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 朝日博子, 井上信一, 新倉保, 小林富美恵, 仙道富士郎, 和田章
2. 発表標題 Artemisinin 誘導体による赤内型熱帯熱マラリア原虫の分化増殖抑制とzinc homeostasisは密接に関連する
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上信一, Ganchimeg B, Jiun-Yu J, Sukhbaatar O, Mbaya N, Sanjaadorj T, Maccalino M, 木村一美, 朝日博子, 新倉保, 小林富美恵, 由井克之
2. 発表標題 マラリアによる T細胞疲弊の分子基盤解明に向けた研究
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inoue SI, Ganchimeg B, Jiun-Yu J, Sukhbaatar O, Mbaya N, Sanjaadorj T, Kimura K, Niikura M, Kobayashi F, Yui K
2. 発表標題 T cells play a crucial role for protective immunity to Plasmodium infection
3. 学会等名 ID-RiPS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊從光洋, 小川良平, 新倉保, Emran TB, 丹保秀太, 井上信一, 小林富美恵, 吉田栄人
2. 発表標題 バキュロウイルス筋肉内接種による肝臓期マラリア原虫の殺傷と遺伝子発現解析
3. 学会等名 第75回日本寄生虫学会西日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新倉保, 小林富美恵
2. 発表標題 マラリア原虫感染赤血球の乳腺組織への蓄積
3. 学会等名 第79回日本寄生虫学会東日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上信一, Ganchimeg B, Jiun-Yu J, Sukhbaatar O, Mbaya N, Sanjaadorj T, 木村一美, 新倉保, 小林富美恵, 由井克之
2. 発表標題 マラリアによる T 細胞疲弊の誘導
3. 学会等名 第 72 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 69 回日本衛生動物学会南日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue SI, Niikura M, Kobayashi F, Yui K
2. 発表標題 T cells modulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新倉保, 朝日博子, 井上信一, 小林富美恵
2. 発表標題 乳腺組織を基軸とした新たな妊娠マラリア病態発症機構の解明
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue SI, Niikura M, Asahi H, Kobayashi F, Yui K
2. 発表標題 T cells modulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue SI, Niikura M, Asahi H, Kobayashi F, Yui K
2. 発表標題 T cells regulate humoral immune responses against Plasmodium berghei infection
3. 学会等名 第 12 回 寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue SI, Niikura M, Asahi H, Kobayashi F, Yui K
2. 発表標題 T cells modulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection
3. 学会等名 第71回 日本寄生虫学会南日本支部大会・第68回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新倉保, 井上信一, 朝日博子, 小林富美恵
2. 発表標題 脂肪組織が関わる新たな妊娠マラリア病態発症機構の解明
3. 学会等名 第26回分子寄生虫学ワークショップ&第16回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Niikura M, Inoue SI, Asahi H, Kobayashi F
2. 発表標題 Pathophysiology of rodent malaria during pregnancy
3. 学会等名 International Congress of Parasitology (ICOPA XIV) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue SI, Niikura M, Asahi H, Kobayashi F
2. 発表標題 T cell-related protective immunity against Plasmodium berghei
3. 学会等名 International Congress of Parasitology (ICOPA XIV) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

杏林大学医学部 教室紹介 http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/infection/#para 杏林大学大学院 医学研究科 研究室・研究グループ紹介：感染症学教室 http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/infect-dis/ 杏林大学 教員紹介 http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/staff/detail/?id=med65001

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 富美恵 (Kobayashi Fumie) (20118889)	麻布大学・生命・環境科学部・客員教授 (32701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	井上 信一 (Inoue Shin-Ichi) (20466030)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授 (17301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連 携 研 究 者	福富 俊之 (Fukutomi Toshiyuki) (30439187)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関