

平成21年 4月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19590430
 研究課題名（和文） 人工抗原組換え原虫を用いたマラリア防御免疫エフェクター機構の解析
 研究課題名（英文） Host effector mechanisms against malaria infection
 -Study using recombinant parasites expressing model antigens-
 研究代表者
 由井 克之（YUI KATSUYUKI）
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：90274638

研究成果の概要：

マラリアは、世界的には最も重要な感染症であるが、ワクチン開発は遅れており、また宿主（ヒト）の感染防御や感染病態についての理解は不十分である。本研究では、マラリア抗原特異的な宿主の免疫応答について解析するために、モデル抗原として免疫学解析によく用いられる人工抗原・卵白アルブミンを発現する組換えマラリア原虫を作成した。この組換えマラリア原虫を用いて、マラリア感染におけるT細胞の免疫応答と病態に関する基礎研究を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：寄生虫学（含医動物学）

キーワード：原虫、マラリア、感染症、免疫、抗原、T細胞

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、年間患者数2～3億人、死者100～200万人といわれ、世界的に最も重要な感染症のひとつであるが、未だに有効なワクチンは開発されていない。ワクチン候補抗原は従来から患者血清（抗体）を用いて行われており、原虫表面に発現される分子のみがワクチン候補抗原として採り上げられてきた。しかしながらT細胞は細胞内部の抗原でも検出し、攻撃することができる。例えばマ

ラリア感染においても肝細胞期の原虫排除はT細胞により行われるし、赤血球期の防御でもT細胞は重要な役割を担っていることが知られている。赤血球内に感染した原虫は、赤血球構造を改変し原虫蛋白を赤血球の細胞内部や膜表面にも発現する。このような分子から防御抗原が明らかになれば、ワクチン候補抗原の中は大きく広がる。しかしながら、赤血球内や原虫細胞質内に発現される原虫蛋白が防御免疫の標的になりうるのか、感染の各

ステージに於いてどのような免疫応答がエフェクターとして有効なのかについては、明確な解析はなされていない。

我々は、有効なマラリアワクチンの開発を目指し、マウスマラリアの実験系を用いて基礎的な研究を進めてきた。マラリア抗原を宿主ストレス蛋白hsp70と融合することによりT細胞の強い防御免疫応答を誘導できること、代表的な赤内型ワクチン標的抗原MSP1に対するT細胞免疫応答が肝細胞期でも有効であること、MSP1を標的とする肝細胞期防御免疫は、抗体ではなく細胞性免疫により担われていることを明らかにしてきた。T細胞のマラリア防御免疫における重要性を踏まえ、マラリア感染に対するエフェクターとその機構を明らかにするために、抗原発現部位と特異的な免疫エフェクター機構をモニターする実験系の確立を目指すことにした。

2. 研究の目的

赤血球内に感染したマラリア原虫蛋白は、原虫細胞質内、parasitophorous membrane内、赤血球細胞内 (Mauer's cleftsなど)、赤血球表面などに輸送されて分布し、赤血球構造の修飾を行っている。熱帯熱マラリアにおいて、これら分子の細胞内輸送を担う移行シグナルが明らかにされたことを踏まえ、本研究では抗原発現を原虫あるいは宿主赤血球の特定部位にターゲットし、抗原発現部位と防御免疫応答との関連を明らかにすることを目標にした。

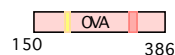
3. 研究の方法

- (1) DHFRtsを選択マーカーとするマラリア原虫発現ベクターは油田らが作成した。
- (2) OVAに発現部位をターゲットするリーダー配列等を付加し、原虫の特定の部位に発現させるため、以下の4種類の

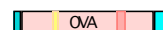
遺伝子コンストラクトを作製した。

- ① 原虫細胞質内～OVAのみ
- ② メロゾイト細胞表面～OVAのN末にMSP1のリーダー配列、C末にMSP1のGPIアンカー配列を各々PCRプライマーに含めコンストラクトを作製した。
- ③ 赤血球細胞内発現～*P. falciparum*のKAHRP (Dr. Alan Cowmanより供与) のN末1-69に赤血球内への蛋白移行モチーフが存在するので、この配列をOVAのN末に付加した。
- ④ 赤血球膜表面発現～*P. falciparum* Rifin (Dr. Alan Cowmanより供与) の蛋白移行モチーフを利用する。OVAをRifinの細胞外ドメインに入れ替えた。

1. 原虫細胞質内発現



2. メロゾイト細胞表面発現



3. 赤血球細胞質内発現



4. 赤血球細胞表面発現

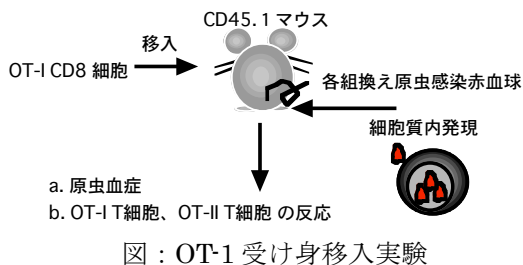


- MSP1リーダー配列 (N末)
- MSP1 GPIアンカー付加配列 (C末)
- KAHRP1-69 (赤血球細胞質内発現モチーフ)
- Rifin MEMEモチーフ
- Rifin膜貫通、細胞質内ドメイン

図：遺伝子コンストラクト

- (3) プラスミドを*P. berghei*ANKAに導入し、ラットに感染させて耐性遺伝子DHFRをピリメサミンで選択後、マウスを用いて原虫のクローニングを行った。
- (4) 作成した組換え原虫のOVA発現については、ウェスタンブロット、RT-PCR法により解析した。
- (5) 完成したOVA組換え原虫を用いて、赤血球期マラリア原虫感染に対するT細胞の免疫応答に関する研究を行った。

- ① T細胞受容体トランスジェニックマウスOT-1のCD8細胞を精製し、CFSEラベル後C57BL/6マウスに移入した。
- ② 組換え原虫或いはコントロール野生型原虫を感染させ、7-8日後、原虫血症上昇後脾T細胞の表現型と機能を解析した。
- ③ *P.berghei* ANKA感染に伴う脳マラリア発症に関しては、症状及びマウスの生死の観察、脳内に集積する細胞の解析を行った。



4. 研究成果

(1) 組換え蛋白の発現について

原虫細胞質内発現コンストラクトについては、ウェスタンブロットで OVA の発現を確認した。メロゾイト表面、赤血球内発現用コンストラクトについては、発現を確認できなかった。原虫蛋白発現移行シグナルは熱帯熱マラリアで解析されたもので、これらのコンストラクトはそのままマウスマラリア *P.berghei* ANKA には応用できないことが示唆された。移行シグナルや、原虫蛋白の各部位への発現の機構についてはさらなる研究が必要であると考えられた。

(2) マラリア感染マウスT細胞の応答について

原虫細胞質内発現コンストラクトの発現が確

認されたので、以降の実験はこの組換え原虫を用いて行った。OVA特異的CD8細胞OT-Iの移入実験から、赤内型マラリア抗原特異的CD8⁺T細胞は、抗原提示細胞（主として樹状細胞）によりTAP分子（transporter of antigen presentation、小胞体膜にあり、細胞質内ペプチドを小胞体内へ転送する分子）依存性にクロスプレゼンテーションされたマラリア抗原により活性化され、細胞傷害性T細胞へと分化することが明らかになった。

一方、赤内型マラリア抗原に非特異的なCD8⁺T細胞も一部活性化されて細胞傷害性T細胞へと分化しうることが明らかになった。この活性化には、NK細胞が関与していた。ただし、活性化の程度は特異的活性化に比較すると低かった。

(3) 脳マラリアについて

P.berghei ANKA は、C57BL/6 マウスに感染すると脳マラリアを発症する原虫である。OT-I 細胞を受け身移入後に組換えマラリア原虫を感染させた実験から、特異的に活性化されたCD8⁺T細胞は、脳へと特異的に集積し、宿主に対して病的に働くことが明らかになった。一方非特異的に活性化されたCD8⁺T細胞には、宿主に対する攻撃的な働きは観察されなかった。

(4) まとめ

抗原を様々な部位にターゲットする計画に関しては、細胞質内発現が成功したのみであった。しかしながら、この組換え原虫を用いた宿主免疫系の解析から、マラリア特異的T細胞の新たな知見が得られた。今後は、このモデルを用いて研究をCD4⁺T細胞免疫機能制御学分野応答の機能解析や、肝細胞期における免疫防御機構の解析へと広げていきたい。

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 4件)

1. Miyakoda, M., Kimura, D., Yuda, M., Chinzei, Y., Shibata, Y., Honma, K., Yui, K. Malaria-specific and non-specific activation of CD8⁺ T-cells during infection with *Plasmodium berghei*. J. Immunol., 181(2) : 1420-1428, 2008.

(査読有り)

2. Honma, K., Kimura, D., Tominaga, N., Miyakoda, M., Matsuyama, T., Yui, K. Interferon regulatory factor-4 differentially regulates the production of Th2 cytokine in naïve vs. effector/memory CD4⁺ T-cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105: 15890-15895, 2008. (長崎大学リポジトリ公開 <http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/handle/10069/20853>) (査読有り)

3. Yamano, T., Sugahara, H., Mizukami, S., Murata, S., Chiba, T., Tanaka, K., Yui, K., Udono, H. Allele-selective effect of PA28 in MHC class I antigen processing., J. Immunol., 181: 1655-1664, 2008. (査読有り)

4. Mizukami, S., Kajiwara, C., Ishikawa, H., Katayama, I., Yui, K., Udono, H. Both CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes fused to heat shock cognate protein 70 (hsc70) can function to eradicate tumors. Cancer Science. 99(5):1008-1015, 2008. (査読有り)

[学会発表] (計 12件)

1. M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, M. Chinzei, K. Yui, Inhibition of the malaria-specific memory CD8⁺ T-cell memory responses during infection with *Plasmodium berghei*, 43rd U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases, 2009年1月7-8日、東京

2. M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, K. Yui, Activation of CD8⁺ T cells and its consequences in mice infected with blood stage malaria parasites, 日本免疫学会学術集会、2008年12月1日～3日、京都,

3. D. Kimura, M. Miyakoda, K. Honma, K. Kimura, K. Yui, Malaria infection modulates IFN- γ production of memory CD4⁺ T-cells in an antigen-non-specific manner, 日本免疫学会学術集会、2008年12月1日～3日、京都,

4. 都田真奈、木村大輔、本間季里、木村一美、油田正夫、鎮西康雄、由井克之 マラリア特異的及び非特異的CD8⁺細胞の活性化と赤内型感染病態への効果 第61回日本寄生虫学会南日本支部大会 第58回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会 沖縄 2008年11月1日、2日

5. D. Kimura, M. Miyakoda, K. Kimura, K. Honma, Y. Yuda, Y. Chinzei, K. Yui. Malaria infection modulates cytokine responses of CD4⁺ T-cells in an antigen-non-specific manner. Keystone symposia, Malaria: Immunology, Pathogenesis and Vaccine Perspectives. p71, 209, June 8-13, 2008

6. M. Miyakoda, D. Kimura, Y. Yuda, Y. Chinzei, K. Kimura, K. Honma, K. Yui. Malaria-specific and non-specific activation of CD8⁺ T cells during blood stage of *Plasmodium berghei* infection, Keystone symposia, Malaria: Immunology, Pathogenesis and Vaccine Perspectives. p88, 339, June 8-13, 2008.

7. 都田真奈、木村大輔、本間季里、木村一美、
油田正夫、鎮西康雄、由井克之マラリア感
染におけるCD8⁺ T細胞の活性化および感
染病態・防御における役割 第77回日本寄
生虫学会大会 長崎 2008年4月3、4
日
8. 木村大輔、都田真奈、本間季里、木村一美、
油田正夫、鎮西康雄、由井克之 マラリア
原虫感染によりCD4⁺ T細胞のサイトカイン
産生は抗原非特異的に修飾される 第77
回日本寄生虫学会大会 長崎 2008年
4月3、4日
9. Regulation of T-cell responses during blood
stage of Plasmodium berghei infection: an
approach using OVA as a surrogate malaria
antigen, K. Yui, 2nd Nagasaki Symposium on
Tropical and Emerging Infectious Diseases,
2007年11月26、27日、長崎大学
10. Specific and non-specific activation of CD8⁺
T-cells during malaria infection; implication
for the pathogenesis of cerebral malaria, M.
Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura,
K. Yui, 日本免疫学会学術集会、2007年11
月20日～22日、東京
11. Malaria infection induce cytokine
modulation of CD4⁺ T-cell in an
antigen-non-specific manner, D. Kimura, M.
Miyakoda, K. Honma, K. Kimura, K. Yui, 日
本免疫学会学術集会、2007年11月20日～
22日、東京
12. マラリア原虫感染により抗原非特異的に
CD4⁺ T細胞のサイトカイン産生は修飾さ
れる、木村大輔、都田真奈、木村一美、油
田正夫、鎮西康雄、本間季里、由井克之 第
60回日本寄生虫学会南日本支部大会第57
回日本衛生動物学会南日本支部大会合同
大会 2007年10月27日28日 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由井 克之

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90274638

(2) 研究分担者

都田 真奈

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30398151

木村 大輔

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：5023637

油田 正夫

三重大学・大学院医学研究科・助教授
90293779