

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07493

研究課題名（和文）LPSプレコンディショニングによるマラリア重篤化抑制手法の確立

研究課題名（英文）The effect of LPS preconditioning on the lethal malaria infection

研究代表者

小野 岳史（Ono, Takeshi）

防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・国際感染症学・助教

研究者番号：20535182

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：LPSプレコンディショニングは生体の炎症反応を抑制しつつ、マクロファージの殺菌能、すなわち貪食能を増強させる非常に魅力的な感染防護対策で、細菌感染の予防に関して最近注目されている。マラリア原虫に対する自然免疫応答において、原虫の排除に働いているものの一つが貪食作用であることから、貪食能の亢進をもたらすLPSプレコンディショニングをマラリア重篤化阻止に応用可能が検討した。その結果、LPSプレコンディショニングを施すことによってマラリア原虫感染マウスの生存率の改善が認められ、骨髄由来のF4/80+ CD11b+ マクロファージの貪食能亢進がマラリア感染重篤化阻止に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体の炎症反応を抑制しつつ、マクロファージの殺菌能を増強させるLPSプレコンディショニングは、多剤耐性菌の感染予防に有効であることが明らかになりつつある。マラリア感染制御においては薬剤耐性原虫の出現、マラリアワクチン開発の遅れ等の問題を抱えている。そのため、感染の回避や軽減化を含めた、抗マラリア薬に頼らない、しかも効力の強い重症感染症対策の確立が求められている。貪食能の亢進をもたらすLPSプレコンディショニングによって薬剤耐性マラリア感染の感染防護が可能になれば、海外渡航者における感染症防護に資する所が極めて大きい。

研究成果の概要（英文）：We investigated the protective effects of LPS preconditioning against lethal murine Plasmodium infection, focusing on liver macrophages, which are increased by LPS preconditioning. Mice were subjected to LPS preconditioning by intraperitoneal injections of low-dose LPS for 3 consecutive days, they were infected with pRBCs of *P. yoelii* 17XL. LPS preconditioning markedly increased the murine survival and reduced parasitemia. An in vitro phagocytic clearance assay of pRBCs showed that the CD11b^{high} F4/80^{low} liver macrophages in the LPS-preconditioned mice had significantly augmented phagocytic activity against pRBCs. The adoptive transfer of CD11b^{high} F4/80^{low} liver macrophages from LPS-preconditioned mice to control mice significantly improved survival after Plasmodium infection. We conclude that LPS preconditioning stimulated CD11b^{high} F4/80^{low} liver macrophages to augment the phagocytic clearance of pRBCs, which may play a central role in resistance against Plasmodium infection.

研究分野：感染症学

キーワード：マラリア マクロファージ LPSプレコンディショニング trained innate immunity

1. 研究開始当初の背景

マラリアは AIDS や結核とともに世界三大感染症の一つとされており、撲滅に向けた活動が精力的に行われている。しかしながら、薬剤耐性原虫の出現、マラリアワクチン開発の遅れ等の問題を抱えている。そのため、感染の回避や軽減化を含めた、抗マラリア薬に頼らない、しかも効力の強い重症感染症対策の確立が喫緊の課題となっている。

脳マラリアを併発し重篤化しやすい熱帯熱マラリア流行地における犠牲者は、マラリアに対する免疫を獲得していない5歳以下の小児が60~80%を占めること、また、日本を含めた流行地外からの旅行者が初感染で重篤しやすいことが問題となっている。したがって、自然免疫を刺激し、マラリア原虫を排除することで症状を軽減することができれば、死亡率が低減し、薬剤耐性マラリアへの対応も可能となる可能性がある。一方、これまでに報告されている自然免疫を賦活化する手法は、同時に炎症性サイトカインの産生といった炎症応答も過剰に誘導し、臓器障害をもたらすことが問題となっていた。我々は、極微量のLPSの3日間投与で、炎症反応を抑制しつつ貪食細胞活性を大幅に増強すること、および大腸菌敗血症の予後が劇的に改善することをマウスで見出した(1)。これはLPSプレコンディショニングというべき現象で、ネズミマラリア原虫致死株によるマラリアの予後も改善する可能性が想定された(図1)。本研究では、本来は感染に伴う炎症により誘導される貪食能の活性化を、炎症応答を抑制しつつ誘導する手法が果たしてマラリアの重篤化を阻止できるのかを学術的「問い」として設定し、マラリア重篤化対策として臨床で有用なものとすることを目指した。

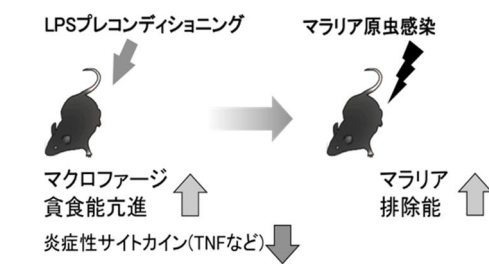


図1 マラリア原虫感染におけるLPSプレコンディショニング効果

2. 研究の目的

本研究では LPS プレコンディショニングによるマラリア重篤化阻止を目的とし、以下の3項目を実施目標に定めた。

- (1) ネズミマラリア重篤化阻止機構の解明
- (2) 脳マラリア発症阻止の検討
- (3) 弱毒性 LPS による安全な LPS プレコンディショニング導入

- (1) では、LPS プレコンディショニングで活性化する貪食細胞について分離・解析を行い、移入実験によりマラリア重篤化を阻止できるか検討する。
- (2) では、脳マラリアマウスモデルを用いて、LPS プレコンディショニングを施したマウスで脳マラリア発症が阻止できるかを検討し、そのメカニズムを明らかにする。
- (3) では、弱毒性の合成 Lipid A 化合物を用いて、大腸菌由来 LPS のようなプレコンディショニング効果をもたらすことができるか検討する。

3. 研究の方法

(1) ネズミマラリア重篤化阻止機構の解明

感染実験および活性化された貪食細胞の機能解析を中心に、下記の項目について研究を進めた。

LPS プレコンディショニング施行マウスにおけるマラリア原虫感染重篤化阻止の解析
LPS(0.5mg/kg)を3日間腹腔投与後、ネズミマラリア原虫 *P.yoelii* 17XL 致死株を接種した。生存率・原虫寄生率を指標として、LPS コンディショニング効果を検討した。採取した血清を用いて、IFN- γ 、TNF の血中濃度を ELISA 法にて測定した。また、貪食されたマラリア原虫感染赤血球について、単核球マーカーとともに組織免疫染色を行い、貪食細胞の組織学的解析を行った。

LPS プレコンディショニング施行マウスより単離した単核球の貪食能の解析
LPS 投与マウスの肝臓および脾臓より単核球を分離した。研究開始当初、すでに LPS プレコンディショニングにより骨髄由来マクロファージが誘導され、貪食能が増強されることを見出しており、その分類マーカーである F4/80、CD11b 陽性を指標としてセルソーターにて分取を行った。得られた細胞集団について、マラリア原虫感染赤血球に対する貪食能を *in vitro* で測定した。

LPS プレコンディショニング施行マウスより分取した単核球の移入実験
セルソーターにて分取した細胞集団を野生型マウスへ移入し、マラリア原虫を感染、マラリア重篤化を阻止できるか生存率・原虫寄生率を指標として確認した。

(2) 脳マラリア発症阻止の検討

脳マラリアモデルとして、ネズミマラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株感染 C57BL/6 マウスを使用した。マラリア原虫感染後、脳マラリア発症から後期に至るまでの各段階において、原虫寄生率、臨床スコアを判定した。さらにマラリア原虫感染マウスにエバンスブルーを投与し、脳から漏出した色素の量を測定することで血管損傷を定量化し、LPS プレコンディショニングの脳マラリア発症に対する効果の検討を行った。

(3) 弱毒性 LPS による安全な LPS プレコンディショニング導入

弱毒性の合成 lipid A である MPLA(monophosphoryl lipid A)は TLR4 agonist であり、LPS と同様の細胞内シグナル伝達系を刺激する。MPLA で、大腸菌 LPS のようなプレコンディショニング効果が誘導できるか、マウスで検討した。

4. 研究成果

(A) ネズミマラリア重篤化阻止機構の解明

LPS プレコンディショニング施行マウスにおけるマラリア原虫感染重篤化阻止の解析

LPS(0.5mg/kg) を3日間腹腔投与することによって免疫賦活化現象である LPS プレコンディショニングをマウスに誘導した後、ネズミマラリア原虫 *P. yoelii* 17XL 致死株を接種したところ、血中原虫率の減少および生存率の改善が得られた(図2)。また、感染マウスの血中サイトカインを測定したところ、TNFの産生量は減少せず、IFN- γ のピークを遅らせるだけであった。

LPS プレコンディショニング施行マウスより単離した単核球の貪食能の解析

LPS プレコンディショニングにより骨髄由来の CD11b^{high}F4/80^{low} マクロファージが肝臓で誘導され、貪食能が増強されることから、これらの細胞をセルソーターで分取し、マラリア原虫感染赤血球に対する貪食能を *in vitro* で解析した。その結果、LPS プレコンディショニング施行マウスにおける CD11b^{high}F4/80^{low} マクロファージにおいて、マラリア原虫感染赤血球に対する貪食能が亢進していることが明らかとなった(図3)。

さらに、セルソーターにて分取した前述の細胞集団を野生型マウスへ移入し、ネズミマラリア原虫を感染後の重篤化を阻止できるか生存率・原虫寄生率を指標として検討を行なった結果、LPS プレコンディショニングを施したマウスから分取した骨髄由来 CD11b^{high}F4/80^{low} マクロファージの移入によって、マラリア原虫感染マウスの生存率が改善することが明らかとなった(図4)。

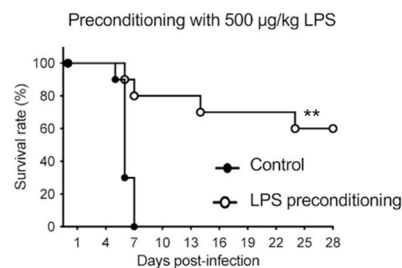


図2 LPSプレコンディショニングによるマラリア原虫感染マウスの生存率及び原虫寄生率

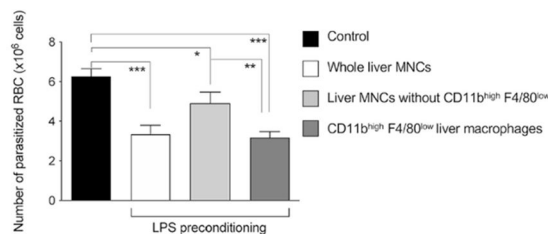


図3 CD11b^{high}F4/80^{low}肝マクロファージにおけるマラリア原虫感染赤血球貪食能の解析

(2) 脳マラリア発症阻止の検討

(1)で *P. yoelii* 17XL 致死株を用いた実験と同様に LPS プレコンディショニングを行った後、脳マラリアモデルとして、ネズミマラリア原虫 *P. berghei* ANKA を C57BL/6 マウスに感染させた。その結果、生存率の延長が認められたものの、脳マラリア発症阻止に対する効果は低かった。

そこで、LPS の投与方法について詳細な検討を行ったところ、*P. berghei* ANKA 株感染モデルにおいても LPS プレコンディショニングによって原虫寄生率の減少、生存率の改善が認められた(論文準備中)。

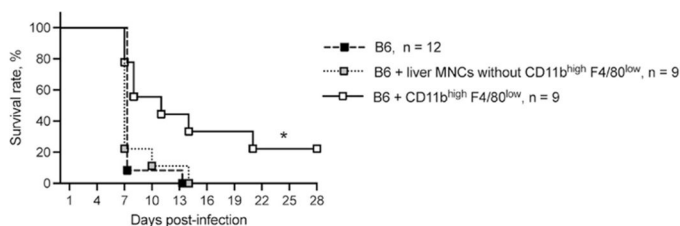


図4 CD11b^{high}F4/80^{low}肝マクロファージ移入によるマラリア原虫感染マウスの生存率向上

(3) 弱毒性 LPS による安全な LPS プレコンディショニング導入

弱毒性の合成 lipid A である MPLA(monophosphoryl lipid A)は TLR4 agonist であり、LPS と同様の細胞内シグナル伝達系を刺激する。MPLA で、大腸菌 LPS のようなプレコンディショニング効果が誘導できるか、マラリア原虫感染マウスで検討したところ、MPLA プレコンディショニングによっても原虫寄生率の減少および生存率の改善認められた(論文準備中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono Takeshi, Yamaguchi Yoko, Nakashima Hiroyuki, Nakashima Masahiro, Ishikiriyama Takuya, Seki Shuhji, Kinoshita Manabu	4. 巻 89
2. 論文標題 Lipopolysaccharide Preconditioning Augments Phagocytosis of Malaria-Parasitized Red Blood Cells by Bone Marrow-Derived Macrophages in the Liver, Thereby Increasing the Murine Survival after Plasmodium yoelii Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	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） 10.1128/IAI.00249-21	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Ono, Manabu Kinoshita, Yoko Yamaguchi, Yasushi Miyahira
2. 発表標題 The effect of LPS preconditioning on the lethal malaria infection
3. 学会等名 The 48th Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Ono, Yoko Yamaguchi, Manabu Kinoshita
2. 発表標題 Lipopolysaccharide preconditioning augments phagocytosis of malaria-parasitized red blood cells by bone marrow-derived macrophages in the liver, thereby increasing the murine survival after Plasmodium yoelii infection
3. 学会等名 International Endotoxin and Innate Immunity Society 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Ono, Yoko Yamaguchi, Manabu Kinoshita
2. 発表標題 Lipopolysaccharide preconditioning augments phagocytosis of malaria-parasitized red blood cells by bone marrow-derived macrophages in the liver, thereby increasing the murine survival after Plasmodium yoelii infection
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	木下 学 (Kinoshita Manabu) (70531391)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、 動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・免疫・ 微生物学・教授 (82406)	

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
---------	---------