

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34511

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07528

研究課題名（和文）マラリアにおける免疫記憶抑制 —IL-27依存的細胞死のメカニズム解明—

研究課題名（英文）Interleukin-27 dependent loss of memory CD4+ T-cells after malaria infection

研究代表者

木村 大輔 (Kimura, Daisuke)

神戸女子大学・健康福祉学部・教授

研究者番号：50423637

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マラリアの制圧が困難な理由として、マラリア原虫感染によって宿主免疫応答が抑制されることや、免疫記憶が持続しにくい問題があげられる。これまでに我々は、マラリア原虫感染マウスモデルにおいて、感染後に増加した活性化CD4陽性T細胞がその後早期に死滅するのに対し、IL-27受容体欠損マウスでは死滅しないことを明らかにした。また、興味深いことにこの現象は、薬剤による溶血性貧血マウスでも観察された。すなわち、マラリア原虫によって破壊された赤血球成分が、マラリア原虫特異的CD4陽性T細胞の長期生存を妨げていることが示唆された。現在は赤血球成分とIL-27受容体との関係について解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究目的である「IL-27による免疫記憶抑制メカニズム解明」は、これまでの我々独自の研究成果を発展させたものである。また、記憶T細胞の細胞死を誘発させる赤血球成分を特定できれば、記憶抑制メカニズムが明らかとなり、将来完成が期待されるワクチン効果を促進・維持させることで、マラリアワクチン開発へ向けて貢献ができる。また、これまで研究されてきた既存のワクチン候補中に本研究結果と組み合わせることで、効果が期待できる可能性も考えられる。

研究成果の概要（英文）：The reason why malaria is difficult to control is that Plasmodium falciparum infection does not maintain immune memory. Previously, we have shown that in a mouse model of malaria infection, activated CD4+ T cells die early after infection, but not in IL-27 receptor-deficient mice. Interestingly, this phenomenon was also observed in mice with drug-induced hemolytic anemia. This suggests that erythrocyte components destroyed by the malaria parasite prevent long-term survival of malaria-specific CD4+ T cells. The relationship between erythrocyte components and IL-27 signaling is currently being analyzed.

研究分野：感染免疫

キーワード：マラリア 免疫記憶 CD4陽性T細胞 アポトーシス 溶血性貧血

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアに対する有効なワクチンはこれまでに開発されていない。その理由として、マラリア原虫感染によって宿主免疫応答が抑制されることや、免疫記憶が持続しにくい問題がある。これら問題の機序は明らかでなかったが、近年 T 細胞上の PD-1 などの抑制性受容体の関与が示唆された (Butler et al. *Nat Immunol.* 2012)。一方、我々はマラリア原虫感染マウスモデルにおいて抑制因子 IL-27 を産生する新規制御性 CD4⁺T 細胞「Tr27」が誘導され、CD4⁺T の IL-2 産生およびクローン増殖を抑制することを報告した (Kimura et al. *Immunity* 2016)。さらに、Tr27 研究の延長線上において、IL-27 が記憶 CD4⁺T 細胞の細胞死を誘導する結果を得た。

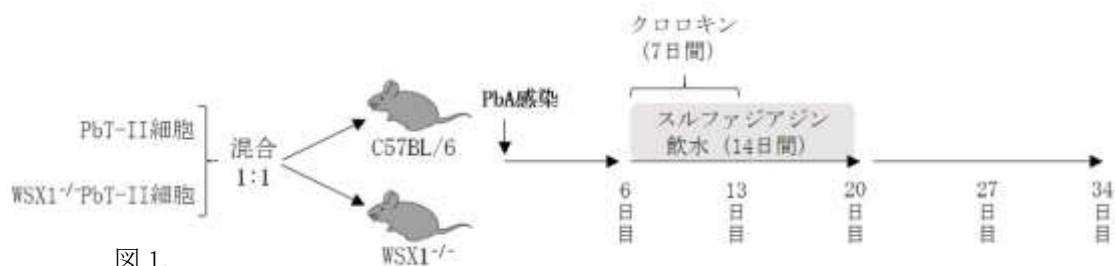
2. 研究の目的

マラリアで免疫記憶が持続しにくい原因は、IL-27 が CD4⁺T 細胞の細胞死を誘導することで記憶細胞への分化・形成を阻害していることが明らかとなった。一方、IL-27 がどのようにして CD4⁺T 細胞に作用するのかの抑制メカニズムは明らかではない。そこで本研究では、IL-27 による記憶 CD4⁺T 細胞成立阻害が直接的阻害なのか、間接的阻害なのかを明らかにし、免疫記憶抑制メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

①IL-27 による記憶細胞の分化・維持阻害が直接的・間接的のどちらであるかを明らかにする。マラリア原虫抗原特異的 CD4⁺T 細胞をモニターするために、マラリア抗原特異的 CD4⁺T 細胞受容体トランスジェニックマウス (PbT-II ; Fernandez et al. *J. Immunol.* 2017) を用いる。さらに PbT-II 細胞上の IL-27 受容体の役割を見る目的で、IL-27 受容体欠損マウス (WSX1^{-/-}) バックグラウンドにかけ戻して WSX1^{-/-}PbT-II マウスを用いる。

- (a) PbT-II細胞 (CD45.1⁺) と WSX1^{-/-}PbT-II細胞 (CD45.1⁺/CD45.2⁺) を1:1で混合し、C57BL/6マウス (CD45.2⁺) あるいはWSX1^{-/-}マウス (CD45.2⁺) へ養子移入し、マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) を感染させる (図1)。
- (b) 感染率が十分に上昇した時点 (感染後約6日目) から10日間毎日クロロキンの腹腔内投与と、スルファジアジンの飲料水添加 (14日間) により治療する。薄層塗抹標本による顕微鏡観察を行い、感染率を毎日モニターして治療の確認を行う (図1)。



- (c) 感染後から治療完了後の間毎週、末血および脾臓中の CD4⁺T 細胞について以下の点を野生型と WSX1^{-/-}マウスでフローサイトメトリーを用いて解析する。
- PbT-II 細胞および WSX1^{-/-}PbT-II の数や割合。
 - AnnexinV と 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) によるアポトーシス細胞、アポトーシスを制御する抗アポトーシス蛋白 Bcl2 の発現の比較解析。

治療完了後 PbA を再感染させ、PbT-II 細胞が記憶細胞としての機能を有するか調べる。

②マラリア原虫感染後における CD4⁺T 細胞の運命決定因子を明らかにする。
IL-27 の有無によって活性化 CD4⁺T 細胞の何が変化するか明らかにする。

4. 研究成果

①IL27 は直接マラリア原虫特異的 CD4⁺T 細胞の細胞死を誘導する。

マラリア原虫抗原特異的 T 細胞受容体トランスジェニックマウス (PbT-II) を導入した。PbT-II あるいは IL-27 受容体欠損 (IL-27RK0) PbT-II マウスより精製した CD4⁺T 細胞を 1 対 1 の比率で混合し、野生型 (C57BL/6) および IL-27 受容体欠損 (WSX1^{-/-}) マウスへそれぞれ移入し、感

染・治療を行った。1ヶ月後、WSX1^{-/-}PbT-II 細胞は C57BL/6 および WSX1^{-/-}マウス中で長期間生存し続け、且つ記憶応答を示したが、両マウス中の PbT-II 細胞は消失していた。継時的に各 PbT-II 細胞のアポトーシスの割合を測定したところ、感染6日目すでに PbT-II 細胞における AnnexinV 陽性細胞の割合が有意に亢進していた(図2)。さらに PbA 再感染実験では、野生型マウスでは初期感染と同様に感染率が上昇したが、WSX1^{-/-}マウスは高い抵抗性を示した。以上のことからマラリア原虫感染では、IL-27 が直接マラリア原虫特異的 CD4⁺T 細胞に作用し、アポトーシスを誘導することで免疫記憶の維持を妨げることが示唆された。ただ、受け身マウス(host)が C57BL/6 よりも WSX1^{-/-}マウスにおいて、移入した WSX1^{-/-}PbT-II 細胞の細胞死が抑制されていることから、宿主側の細胞が IL-27 のシグナルを受け取ることの影響、すなわち間接的な制御を否定することはできない。

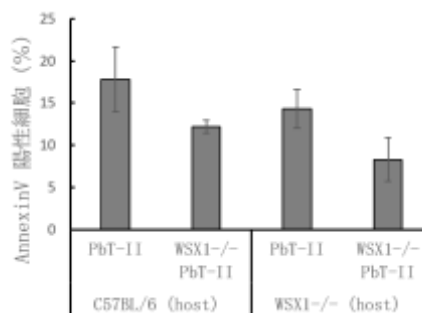


図2

②IL-27は赤血球成分との共作用により CD4⁺T 細胞のアポトーシスを誘導する。

遺伝子改変マウスを用いたマラリア原虫感染実験は長崎大学で実施していたが、新型コロナウイルス感染症の拡大防止措置のため、予定していた残りの実験が期間中に実施不可能となった。そこで、野生型マウスを用いて、フェニルヒドラジン投与による溶血性貧血を誘導し、マラリア原虫感染時と同様に CD4⁺T 細胞の機能修飾が起こるか検証したところ、これまでに我々が示してきた CD4⁺T 細胞の IL-2 産生の低下、およびアポトーシスの誘導が認められた(図非掲載)。

CD4⁺T 細胞のアポトーシスを *in vitro* で再現できるかを検証した。すなわち、ナイーブ C57BL/6 マウスの脾臓より CD4⁺T 細胞を精製し、抗 T 細胞受容体抗体 (anti-TCR Ab) で刺激し、その培養上清にリコンビナント IL-27 (rIL-27)、あるいは赤血球成分 (EC; ナイーブ C57BL/6 マウスから採血し洗浄後、凍結融解により赤血球を壊して遠心後の上清)、およびその両方 (EC+rIL-27) を添加し、アポトーシスの誘導について AnnexinV 陽性細胞の割合で確認した。その結果、rIL-27 単独では CD4⁺T 細胞のアポトーシスを誘導することができなかったが、EC においてアポトーシスは誘導され、rIL-27 と EC の共添加でさらにアポトーシスの割合が亢進した(図3)。またこの現象は、それぞれ濃度依存的に誘導される細胞死の割合が亢進した(図非掲載)。

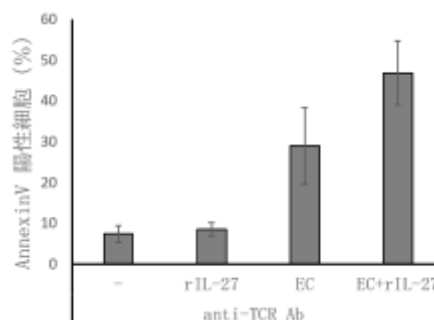


図3

以上の *in vivo* および *in vitro* の結果から、一定より高い濃度の赤血球成分存在下で T 細胞が活性化されると細胞死が誘導されるが、IL-27 がその細胞死を促進させることが示唆された。

マラリア原虫感染時における免疫記憶が持続しにくい問題については、これまでよく理解されておらず、CD4⁺T 細胞の細胞死を阻害することで免疫記憶が維持されることが期待できる。今後は、CD4⁺T 細胞の細胞死を誘導する赤血球成分中に含まれる分子の特定と、IL-27 シグナルとの関係性を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jian Jiun-Yu, Inoue Shin-Ichi, Bayarsaikhan Ganchimeg, Miyakoda Mana, Kimura Daisuke, Kimura Kazumi, Nozaki Eriko, Sakurai Takuya, Fernandez-Ruiz Daniel, Heath William R, Yui Katsuyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 CD49d marks Th1 and Tfh-like antigen-specific CD4+ T cells during <i>Plasmodium chabaudi</i> infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 409 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab020	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 該当する
1. 著者名 Ntita Mbaya, Inoue Shin-Ichi, Jian Jiun-Yu, Bayarsaikhan Ganchimeg, Kimura Kazumi, Kimura Daisuke, Miyakoda Mana, Nozaki Eriko, Sakurai Takuya, Fernandez-Ruiz Daniel, Heath William R, Yui Katsuyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Type I interferon production elicits differential CD4+ T-cell responses in mice infected with <i>Plasmodium berghei</i> ANKA and <i>P. chabaudi</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab090	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 該当する
1. 著者名 Nakamae S, Kimura D, Miyakoda M, Sukhbaatar O, Inoue S, Yui K.	4. 巻 70
2. 論文標題 Role of IL-10 in inhibiting protective immune responses against infection with heterologous <i>Plasmodium</i> parasites.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 5-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.01.003	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 該当する
1. 著者名 Sukhbaatar O, Kimura D, Miyakoda M, Nakamae S, Kimura K, Hara H, Yoshida H, Inoue S, Yui K	4. 巻 74
2. 論文標題 Activation and IL-10 production of specific CD4+ T cells are regulated by IL-27 during chronic infection with <i>Plasmodium chabaudi</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 101994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.101994	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Maria Lourdes Macalinao, Shin-Ichi Inoue, Sanjaadorj Tsogtsaikhan, Ganchimeg Bayarsaikhan, Jiun-Yu Jian, Kazumi Kimura, Daniel Fernandez-Ruiz, William R. Heath, Julius Hafalla, Hiroki Yoshida, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui
2. 発表標題 IL-27 inhibits the generation and/or maintenance of Plasmodium-specific memory CD4+ T cells during malaria infection
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maria Lourdes Macalinao, Shin-Ichi Inoue, Sanjaadorj Tsogtsaikhan, Jiun-Yu Jian, Ganchimeg Bayarsaikhan, Kazumi Kimura, Daniel Fernandez-Ruiz, William R. Heath, Julius Hafalla, Hiroki Yoshida, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui
2. 発表標題 Transient IL-27 blockade enhances CD4+ T cell memory and protection against malaria
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nitta Mbaya, Shin-Ichi Inoue, Ganchimeg Bayarsaikhan, Jiun-Yu Jian, Kazumi Kimura, Daisuke Kimura, Mana Miyakoda, Daniel Fernandez-Ruiz, William h R. Heat, Katsuyuki Yui
2. 発表標題 Differences in memory CD4+ T-cells developed after infection with Plasmodium berghei ANKA and Plasmodium chabaudi chabaudi.
3. 学会等名 日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019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	由井 克之 (Katsuyuki Yui) (90274638)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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