

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390121

研究課題名（和文）マラリア原虫による免疫回避機構の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of immune evasion of malaria parasites

研究代表者

久枝 一 (HISAEDA HAJIME)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50243689

研究成果の概要（和文）：マラリアで見られる制御性T細胞の活性化による免疫回避の詳細なメカニズムを解析した。感染赤血球が樹状細胞に TLR9 を介して作用し、その結果樹状細胞が制御性T細胞を活性化することを示した。さらに TLR9 欠損マウスでは制御性T細胞の活性化が起こらず致死性感染に部分的に抵抗性を示すことも明らかにした。原虫由来の TLR9 リガンドとしてヘモジンに関与も示唆された。一方で、抑制されている防御免疫に関してこれまでは否定的であった CD8 T細胞の抗マラリア作用も見出した。

研究成果の概要（英文）：Mechanisms underlying immune evasion due to activation of regulatory T cells during blood-stage malaria have been carefully analyzed. Stimulation of dendritic cells with parasitized red blood cells through TLR9 resulted in activation of regulatory T cells. Furthermore, mice deficient in TLR9 were partially resistant to lethal malaria because of a failure of activating regulatory T cells. It was suggested that hemozoin, malaria pigment, is involved in activation of regulatory T cells as TLR9 ligand. We also analyzed “suppressed” protective immunity to malaria, and found protective roles of CD8 T cells previously supposed to be unlikely to contribute to protection to blood-stage malaria.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：寄生虫学、免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、制御性T細胞、TLR9

1. 研究開始当初の背景

マラリアは年間約3億人が感染し、200万人の死者を出す世界最大規模の寄生性原虫による感染症である。その根絶には新たな治療法、有効なワクチンの開発が急務である。マラリアは流行地において繰り返し感染した人でさえも終生免疫を獲得できず、何度で

も発症する。一度罹患すると二度と発症しなくなる麻疹や風疹とは対照的な感染症である。この事実は、マラリア原虫が正常な免疫機能を阻む巧妙な免疫回避機構を備えることを示すものである。マラリア原虫のこの特性が有効なワクチン開発を妨げている大きな要因である。

研究代表者らはこれまでにマラリア患者で頻繁に認められる非特異的な免疫抑制に着目して研究を行ってきた。そして、マウスマラリアモデルを用いて、致死感染を起こす強毒株原虫は CD4⁺CD25⁺制御性T細胞を選択的に活性化することで免疫抑制を誘導し免疫回避を謀っていることを明らかにしてきた。さらに、マウスモデルで得られた我々の知見はヒトにおける実験感染でも再現されたことから、マラリアにおける免疫回避への制御性T細胞の普遍的な関与が示唆された。したがって、本現象のメカニズムを解明することこそ、マラリアの治療・ワクチン開発に直接結びつくこと期待できる。

2. 研究の目的

(1) マラリアにおける免疫回避機構を明らかにする目的で制御性T細胞の活性化メカニズムを宿主とマラリア原虫の相互作用を中心に詳細に検討する。

(2) 有効なワクチン開発のためには、免疫回避機構を明らかにするだけでなく、実際にマラリア原虫を殺滅する防御免疫応答も検討する必要がある。肝臓ステージマラリアに対しては、感染肝細胞を破壊することでCD8T細胞が防御免疫に関与していることが知られている。その際には肝細胞表面にあるMHCクラスI分子に提示されたマラリア原虫の抗原を認識する。一方で、赤血球はMHC分子を発現していないことから、CD8T細胞は赤血球ステージマラリアに対する防御には貢献しないとされてきた。本研究では、CD8T細胞の防御的役割を詳細に検討した。

3. 研究の方法

純系マウスにネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* の致死感染株 17XL (PyL) と一過性感染株 17XNL(PyNL)の感染赤血球を腹腔内に接種して感染させた。感染後の経過を末梢血中の感染赤血球の割合である虫血症率と致死率で評価した。制御性T細胞、CD8T細胞は脾臓よりMACS法により精製した。

全ての動物実験は九州大学および群馬大学倫理委員会の承認を得た後、ガイドラインに従って行われた。

4. 研究成果

(1) 制御性T細胞(Treg)の活性化に関して

① 感染マウスにおけるTregの活性化

マウスにPyLを感染させると全てのマウスで速やかに原虫は増殖し、感染後10日目までに死亡する。これらのマウスの脾臓ではCD4⁺CD25⁺foxp3⁺Tregが有意に増加していた。

感染マウスから精製したTregは非感染マウスのものと比較して非常に強い抑制機能を持っていた。以上の結果からPyL感染がTregの増殖を促し、その抑制性の機能を増強することが明らかとなった。

② Treg活性化における樹状細胞の重要性

Tregの活性化は樹状細胞とTregと感染赤血球を共培養することによって再現された。感染赤血球をTregとのみ共培養した場合、その活性化は見られなかったので感染赤血球は樹状細胞と作用することが分かった。ついで、樹状細胞による感染赤血球の貪食が必要であること、マラリア原虫によるTregの活性化は抗原非特異的に起こることが明らかとなった。

③ Treg活性化におけるTLR9の関与

感染赤血球は樹状細胞に何らかのシグナルを伝えていることが想定され、またマラリア原虫が種々のTLR (Toll-like receptor)のリガンドを持つことからTLRが関与している可能性が考えられた。そこで、TLRのアダプター分子であるMyD88、TRIF欠損マウスから樹状細胞をTregの活性化実験に供した。TRIFを持たない樹状細胞はTregの活性化を誘導したが、MyD88を欠く樹状細胞は活性化することができなかった。感染赤血球の貪食が必要であったことから関与の考えられるエンドソーム内に局在するTLR3, 7, 9のうち、MyD88を用いるTLR7, 9の関与が考えられたので、各々のノックアウトマウスの樹状細胞を用いた。TLR7を欠く樹状細胞でも活性化が見られたものの、TLR9欠損樹状細胞は活性化させることができなかった。

④ TLR9欠損マウスにおけるPyLに対する抵抗性

Tregの強毒性がTregの選択的活性化に起因することから、Tregを活性化できないTLR9欠損マウスではPyLに対して抵抗性を獲得できることが予想された。実際に、この変異マウスでは野生型で見られる感染後のTregの活性化が認められなかった。そして、野生型マウスでは致死率は100%であるがこのマウスでは50%程度であり、部分的

ではあるが抵抗性であることが確認できた(図1)。

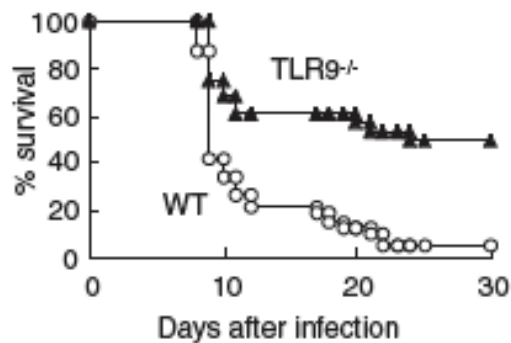


図1 TLR9 欠損マウスのマラリアに対する抵抗性 横軸は感染後の日数、縦軸は生存率、WTは野生型対照マウスを示す。

⑤ マラリア原虫由来 TLR9 リガンド

TLR9 に認識される原虫分子としては未知のタンパク質、原虫の DNA、そしてヘモジンが知られている。ヘモジンとはヘモグロビンを構成する、ヘムの重合体である。TLR9 を介した Treg の活性化におけるヘモジンの関与を検討した。PyL 感染赤血球におけるヘモジン含量は、Treg を活性化しない非致死性 PyNL 感染赤血球と比較し、有意に多かった。

以上の結果は、マウスマラリア原虫 PyL の致死性の原因となる Treg の活性化に樹状細胞の発現する TLR9 が重要な役割を果たしていること示す。また、感染赤血球のヘモジンが TLR9 リガンドとして働いている可能性が示唆された。当初の目的である、マラリア原虫による Treg の活性化の分子メカニズムの解明の一端を果たした。

(2) CD8 T細胞の防御的役割に関して

① マラリア生ワクチンモデルの樹立

PyNL の感染を受けたマウスでは一過性に原虫血症が認められた後、最終的に原虫は排除される。一方、PyL を感染したマウスでは急激な原虫の増殖が見られ、全てが 10 日前後で死に至る。弱毒株の感染を治癒したマウスは PyL による致死性感染に対して抵抗性となる。このように、弱毒性の PyNL は致死性の PyL に対して生ワクチンとして作用する。

② 生ワクチンモデルにおける CD8 T細胞の防御的役割の検討

PyNL を耐過したマウス(免疫マウス)に抗 CD8 抗体を投与することで CD8 T細胞を除去した後に PyL を感染させた。CD8 T細胞を除去しても、PyL に対する抵抗性に变化なく全てのマウスが生き残った。また、免疫マウスから CD8 T細胞を精製し、通常マウスに移入した後に PyL を感染させても、抵抗性を賦与することが出来なかった。これらの結果は、CD8 T細胞の防御的役割を否定するものであった。

③ PyL の追加免疫による CD8 T細胞応答の活性化

免疫マウスに PyL を感染させ、さらにもう一度 PyL を感染させた。依然として抵抗性であるが、これらのマウス(追加免疫マウス)から CD8 T細胞を精製し、通常マウスに移入した後に PyL を感染させた。これらのマウスは PyL に対する抵抗性を獲得したことから、CD8 T細胞は防御に貢献していることが明らかとなった(図2)。追加免疫マウスの CD8 T細胞は CD44^{hi}CD62L^{lo} のいわゆるエフェクターメモリー細胞が増加していた。

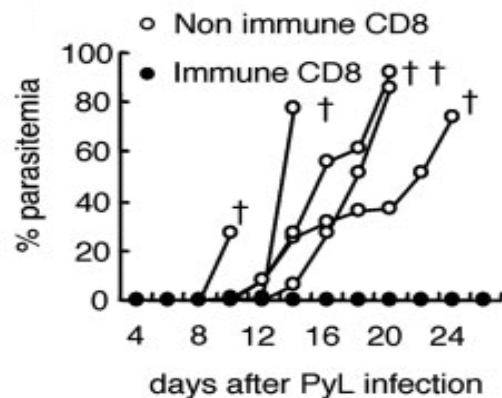


図2 追加免疫マウス(immune)由来の CD8 T細胞の抗マラリア効果 横軸は PyL 感染後の日数、縦軸は原虫血症率を示す。

④ CD8 T細胞の抗マラリア作用の解析 1

CD8 T細胞に免疫応答は IFN- γ の分泌と細胞傷害活性に大別できる。それら抗マラリア応答への寄与を検討するために、IFN- γ ノックアウトマウス(GKO)、細胞傷害活性に必須である perforin を欠損するマウス(PKO)に PyNL 生ワクチン、PyL 2回追加免疫を行なった。これらの変異マウスは PyNL 感染でも半分が死に至ったが、生存したマウスは PyL に対しても抵抗性を示した。これらのマウスから CD8 T細胞

胞を精製し、通常マウスに移入した後に PyL を感染させた。GKO マウスの CD8 T 細胞を移入したマウスでは全てのマウスで抵抗性が得られず死亡した。一方、PKO マウスの CD4 T 細胞は野生型マウスの CD4 T 細胞同様、防御的であったが、PKO CD8 T 細胞を移入したマウスでは高い原虫血症を認め、一匹のマウスが死亡した。

⑤ CD8 T 細胞の抗マラリア作用の解析 2

CD8 T 細胞の防御効果には IFN- γ が必須であるが、このサイトカインの主な作用はマクロファージの活性化である。そこで、マクロファージの重要性についても検討した。追加免疫マウスの CD8 T 細胞を移入したマウスに、マクロファージを無力化するカラギーナンを接種し、PyL を感染させた。対照群で認められた CD8 T 細胞による抵抗性は、カラギーナン投与群で完全に解除された。野生型マウスの追加免疫群からの CD8 T 細胞を移入したマウスのマクロファージは感染赤血球を選択的に貪食していたが、GKO マウスの CD8 T 細胞を移入したマウスのマクロファージでは著しく貪食能力が弱まっていた。

以上の結果より、これまでは否定的であった赤血球ステージマラリアに対する CD8 T 細胞の防御的役割を明らかになった。主たる排除メカニズムは IFN- γ の分泌を介するマクロファージの活性化であった。部分的ではあるが、PFN による細胞傷害活性も貢献していた。これらの知見は抗マラリアワクチンの開発に大きなインパクトを与えることが期待できる。これまでの抗体を基盤としたワクチン戦略では、多様性に富む原虫表面上の抗原を標的とする必要性があり、その開発には困難を極めている。CD8 T 細胞が認識する抗原は原虫のどこに発現していてもよいはずであり、保存された配列を持つ標的抗原を見つけることで幅広く効果を発揮するワクチンの開発が可能となる

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 15 件)

- ① Moriya-Matsuzaki C, Tu L, Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Tetsutani K, Hamano S, Shimokawa C, and Hisaeda H: A critical role for phagocytosis in resistance to malaria

in iron-deficient mice. Eur. J. Immunol. in press, 2011, 査読あり

- ② Ishida H, Matsuzaki-Moriya C, Imai T, Yanagisawa K, Nojima Y, Suzue K, Hirai M, Iwakura Y, Yoshimura A, Hamano S, Shimokawa C, and Hisaeda H: Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. Biochem. Biophys. Res. Commun. 402: 790-795, 2010, 査読あり.
- ③ Imai T, Shen J, Chou B, Duan X, Tu L, Tetsutani K, Moriya C, Ishida H, Hamano S, Shimokawa C, Hisaeda H, and Himeno K: Involvement of CD8⁺ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with Plasmodium yoelii 17XL strain. Eur. J. Immunol. 40: 1053-1061, 2010, 査読あり.
- ④ Tu L, Moriya C, Imai T, Ishida H, Tetsutani K, Duan X, Murata S, Tanaka K, Shimokawa C, Hisaeda H, and Himeno K: Critical role for immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to *Toxoplasma gondii* infection. Eur. J. Immunol. 39:3385-3394, 2009, 査読あり.
- ⑤ Tetsutani K, Ishiwata K, Ishida H, Tu L, Torii M, Hamano S, Himeno K, and Hisaeda H: Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg in mice. Eur. J. Immunol. 39:2822-2830, 2009, 査読あり.
- ⑥ Hisaeda H, Tetsutani K, Imai T, Moriya C, Tu L, Hamano S, Duan X, Chou B, Ishida H, Aramaki A, Shen J, Ishii KJ, Coban C, Akira S, Takeda K, Yasutomo K, Torii M, and Himeno K: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. J Immunol 180: 2496-2503, 2008, 査読あり.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Ishida H, and Hisaeda H: Protective roles of IL-23 against murine malaria. Cell 炎

症の国際シンポジウム、2010.9.28、ヒルトンホテル（リスボン、ポルトガル）

- ② Ishida H, and Hisaeda H: Protective roles of IL-23 against murine malaria. Cell 炎症の国際シンポジウム、2010.9.28、ヒルトンホテル（リスボン、ポルトガル）
- ③ Hisaeda H: Training Course, Parasitology. 第10回淡路国際感染症フォーラム、2010.9.8、淡路国際会議場（兵庫県）
- ④ Hisaeda H: Protection exerted by CD8+ T cells against murine blood-stage malaria. 第14回国際免疫学会、2010.8.21、神戸国際会議場（兵庫県）
- ⑤ Tetsutani K, Hisaeda H: Influence of nematode infection on anti-malaria immunity in mice. 第44回日米医学協カプログラム、2010.1.10、ヒルトンホテル（サンディエゴ、合衆国）
- ⑥ Hisaeda H: Malaria parasites require Toll-like receptor 9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. キーストーンシンポジウム、2008.6.10、Alpbach Congress Centrum (Alpbach, Austria)

[その他]

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/parasitology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久枝 一 (HISAEDA HAJIME)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50243689

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

いずれも該当無し