

機関番号： 17301
研究種目： 若手研究 (B)
研究期間： 2009~2010
課題番号： 21790409
研究課題名 (和文) マラリア感染における記憶 CD8⁺T 細胞の分化及びその維持機構の解析
研究課題名 (英文) Generation and maintenance of memory CD8⁺T cells against malaria infection
研究代表者 都田 真奈 (MIYAKODA MANA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号： 30398151

研究成果の概要 (和文)：本研究ではマラリア感染でなぜ免疫記憶が誘導されにくいのか明らかにしようとして試みた。その結果、マラリア感染後記憶CD8⁺T細胞は分化した。しかしながら記憶CD8⁺T細胞は再感染時には特定の臓器あるいは組織に遊走されにくく、その上増加も制限される事明らかになり、このことがマラリア感染で免疫記憶が誘導されにくい原因の一つである可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：We tried to examine why generation of immunological memory was suppressed against malaria infection. The experiments resulted in that memory CD8⁺T cells could be generated after malaria infection. However, during re-infection with malaria parasite, both trafficking and expansion of memory cells were suppressed, suggesting that those are one of the mechanisms that generation of immunological memory is suppressed against malaria infection

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

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：原虫

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯地域全体に広く蔓延しているだけでなく、近年の温暖化・熱帯化の影響で、近い将来我が国でも感染が拡大する可能性がある。現在のところ有効なワクチンは存在せず、その開発は急務である。ワクチン開発のためには、マラリア感染における免疫機構を十分に明らかにする事が重要である。フ

ールド研究よりマラリアに対する免疫記憶が持続しないこと、ワクチン開発が困難であることが知られている。

平成 19-20 年度科学研究費補助金 (若手研究 (B)、研究課題名：マラリア感染による CD8⁺T 細胞の免疫記憶抑制機構の解明) の支援を受けて、我々は人工抗原 OVA (卵白アルブミン) を発現するマラリア原虫 (OVA-PbA) を使った感染モデル実験により OVA 特異的 CD8⁺T

(OT-I) 細胞は抗原特異的にも非特異的にも活性化することを示した (Miyakoda ら *J. Immunol* **181**, 1420-8, 2008)。この結果はマラリア感染における抗原特異的な CD8⁺T 細胞の応答を経時的にモニターできる系を確立した事をも意味している。

2. 研究の目的

本研究では、なぜマラリア感染では免疫記憶が持続しないのか、そのメカニズムを明らかにすることを試みた。そこで、以前に開発した感染モデルを利用して、マラリア感染では抗原特異的記憶 CD8⁺T 細胞は分化しないのか、あるいは分化はするが再活性化できないのか検討した。

3. 研究の方法

(1) マラリア感染後記憶T細胞が分化するか調べる。

- ① 図 1 上に示すように、CD45.1⁺OT-I 細胞を B6 マウス (CD45.2⁺) に受身移入し、OVA-マラリアあるいは OVA リステリアを感染させる。マラリア感染を行ったマウスに関しては原虫血症が上昇した時点から 2 週間クロロキンとサルファジアジンを用いて治療を行う。
- ② 移入した OT-I 細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて解析する。
- ③ OT-I 細胞を *in vitro* で OVA₂₅₇₋₂₃₄ で刺激し、産生するサイトカインを細胞内染色法を用いて解析する。
- ④ 記憶 OT-I 細胞の細胞傷害機能を解析するために、①の方法で感染し治療して 2 ヶ月以上たったマウスに EL-4 腫瘍細胞と EG-7 (OVA 発現 EL-4 細胞) 腫瘍細胞を左右の脇腹にそれぞれ植え、経時的に腫瘍の大きさを測定する (図 3 左上)。EL4 腫瘍に比べ E. G7 腫瘍が大きくならなければ、OT-I 細胞に傷害活性があったと考えられる。

2) 記憶 CD8⁺T 細胞はマラリア感染に対して反応するか調べる。

- ① Rag2K00T-I マウスの脾細胞に OVA₂₅₇₋₂₃₄ で一晩刺激し、その後 2 週間リコンビナント IL-7 存在下で培養した細胞を *in vitro* 誘導記憶 OT-I 細胞とする。図 5 に示すようにナイーブ OT-I 細胞と *in vitro* 誘導記憶 OT-I 細胞をそれぞれ 1:1 の比率で B6 マウスに移入し、OVA マラリアあるいは OVA リステリアを感染させる。
- ② 移入した OT-I 細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて解析する。
- ③ FTY720 (リンパ球がリンパ節から出るのを阻害する薬剤) は 1mg/Kg の濃度で連日マウスに腹腔投与する。

4. 研究成果

(1) マラリア感染後記憶T細胞が分化するか調べた。

OT-I細胞をB6マウスに移入しOVA-マラリアを感染させその後治療するとOVA特異的CD8⁺T細胞(OT-I細胞)が活性化し2ヶ月経った時点で残存することを示した(図1)。その残存したOT-I細胞がIFN γ 、TNF α などサイトカインを産生能を有し(図2)、さらに抗原特異的傷害活性をも有する(図3)事を、腫瘍拒絶試験を行う事により明らかにした。この結果よりマラリア感染後機能的な記憶CD8⁺T細胞が分化する事が明らかとなった。

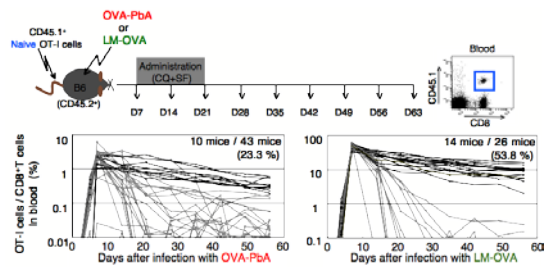


図1. OVAマラリア感染後のマウスにおいて記憶細胞は分る。

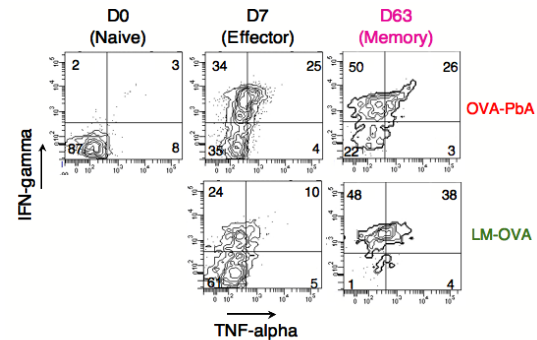


図2. OVAマラリア感染により誘導された記憶細胞はサイトカインを産生できる

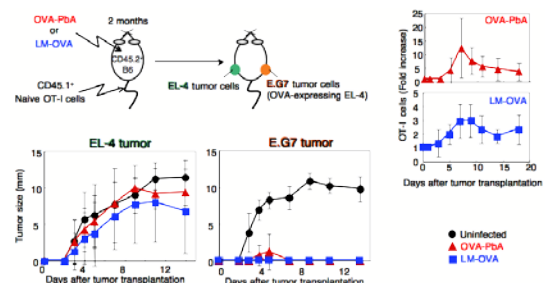


図3. OVAマラリア感染により誘導された記憶細胞は抗原特異的抗腫瘍活性を有する。

(2) 記憶CD8+T細胞はマラリア感染に対して反応するか調べた。

記憶OT-I細胞とナイーブ細胞をB6マウスに移入しOVA-マラリアあるいはOVAリスチアを感染させ経時的にOT-I細胞の数を調べた。その結果、マラリア感染中はナイーブ細胞に比べて記憶細胞の増加が抑制されていた(図4)。FTY720をマウスに投与しリンパ球の移動を阻害した状態でもマラリア感染では記憶OT-I細胞の増加抑制は回復しなかった(図5)ことから、マラリア感染中は記憶細胞の増大が抑制されるだけでなく、臓器への優先的遊走も起きにくいことが分かった。

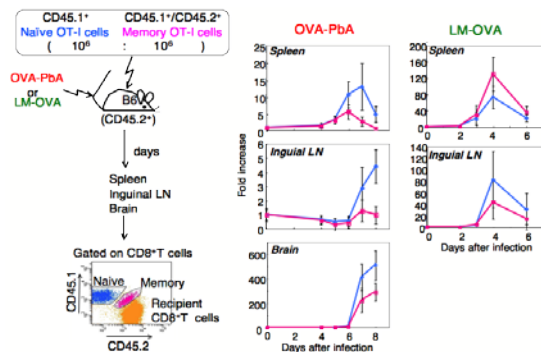


図5. マラリア感染中、記憶CD8T細胞の増加しにくい

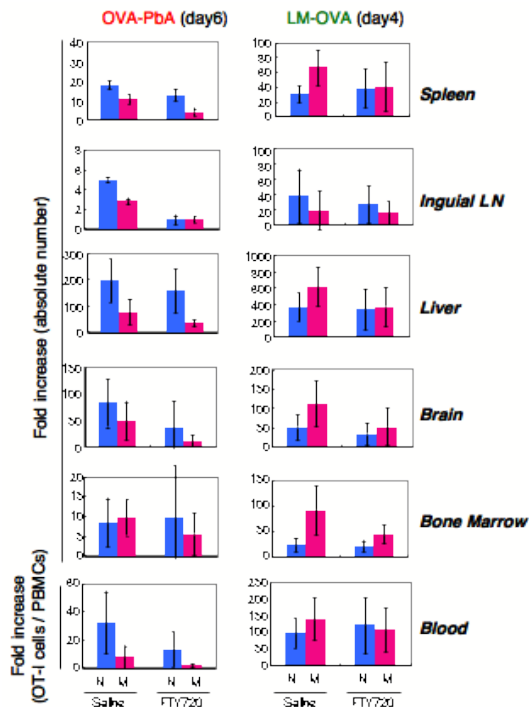


図6. マラリア感染中、記憶CD8T細胞は臓器や組織に集積しにくい

これらの(1)・(2) 実験結果をまとめると、マラリア感染で免疫記憶が成立しない要因として記憶細胞が増加しにくい事、さらに臓器・組織へ優先的に遊走されにくい事が明らかとなった。今後、増加抑制を解除する方策を見いだすことができれば、それによりマラリアワクチン効果を持続させることができると期待される。

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3件)

- (1) Kimura D, Miyakoda M, Honma K, Yuda M, Chinzei Y, and Yui K, Production of IFN- γ by CD4+ T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent International Immunology、査読有、vol. 22, 2010、pp. 941-952
- (2) 由井克之、都田真奈、マラリア感染防御とCD8+T細胞、総説、臨床免疫・アレルギー科、vol. 55、2011、pp. 89-94
- (3) Taguchi T, Inamura Y, Honma K, Kimura D, Miyakoda M, Tagawa T, Yamasaki N, Tsuchiya T, Nagayasu T and Yui K, Characterization of waves of leukocyte recruitment to the lung allograft and the effect of CTLA4-Ig, Acta Medica Nagasakiensis、査読有、印刷中

[学会発表] (計5件)

- (1) 都田真奈、Induction and maintenance of memory CD8+T cells during infection with *Plasmodium berghei* ANKA、第39回日本免疫学会、平成21年12月1日
- (2) 都田真奈、マラリア感染における記憶CD8+T細胞応答の解析、第8回感染症沖繩フォーラム、2010年2月12日、沖繩
- (3) 都田真奈、マラリア感染における特異的記憶CD8+T細胞反応性の解析、第79回日本寄生虫学会、平成22年5月20日、21日、旭川
- (4) 都田真奈、Reduction of the memory CD8+ T cell responses during infection with *Plasmodium berghei* ANKA、第14回国際免疫学会、平成22年8月22日~27日、神戸
- (5) 都田真奈、Persistence and recall responses of memory CD8+ T cells against *Plasmodium berghei* ANKA、キーストンシンポジウム、平成23年2月6日~10日、バンフ(カナダ)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都田真奈（MIYAKODA MANA）

研究者番号：30398151

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし