

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790462

研究課題名(和文)マラリアにおける造血系攪乱とその制御メカニズムを探る

研究課題名(英文)Elucidation of hematopoietic disturbance in malaria

研究代表者

井上 信一(Inoue, Shinichi)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：20466030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、 γ T細胞欠損マウスを利用したマラリア原虫感染実験により、感染後の脾臓での造血細胞の増加には γ T細胞が造血に関与している事が示唆された。一方、抹消血においては、 γ T細胞欠損マウスの方が多くの造血細胞がみられた事から、 γ T細胞は造血細胞の脾臓へのHomingなどに関与している事が示唆された。ただし、具体的なメカニズムの詳細については、今後もさらなる検討が必要となる。また、本研究の過程において、マラリア原虫感染時に γ T細胞がCD40 Ligandの発現とIFN- γ の産生を介して、樹状細胞の活性化を促進するという新たな免疫防御機構を世界に先駆けて解明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, by analyses using gamma delta T cell-deficient mice (TCR-delta KO mice) with plasmodium infection, we suggest that gamma delta T cell would be involve in splenic hematopoiesis after infection with Plasmodium berghei XAT. On the other hands, after infection with the parasites, we observed higher proportion of hematopoietic cells in peripheral blood of TCR-delta KO mice than that of WT mice. This result suggests that gamma delta T cells would be involved in homing of hematopoietic cells to spleen after infection with the parasites. However, to elucidate of the mechanisms for gamma delta T cell-related hematopoiesis in malaria. Furthermore, in the process of this study, we elucidated that CD40 Ligand and IFN-gamma-producing gamma delta T cells enhance dendritic cell activation, resulting in protective immunity against Plasmodium berghei XAT.

研究分野：医歯薬学

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： γ T細胞 樹状細胞 マラリア IFN- γ CD40 Ligand 造血

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯・亜熱帯地域に流行し、毎年約3億人の罹患者と100万人以上の死者を出している世界で最も被害の大きな感染症の一つである。マラリア発症は、マラリア原虫が赤血球に感染し増殖・破壊を繰り返す事によって起こる。マウスマラリアモデルを用いた研究を中心にして、宿主内では、様々な免疫担当細胞が連携して働く事により、マラリア原虫に対する防御をおこなっていることが徐々に解明されてきている。一方で、それら免疫担当細胞の多くを供給する造血細胞(前駆細胞・幹細胞)がマラリア原虫感染によりどのような影響を受けて造血応答しているのかについては、ほとんど明らかにされていない。最近、マウスマラリア原虫をマウスに感染させると、骨髄内で造血幹細胞～多能性前駆細胞の分画が一時的に急増し、骨髄球系前駆細胞が一時的に激減するなどの変化がみられる事、更に感染赤血球の減少にともなって元に戻る事など、造血系(造血幹細胞を頂点とした造血システム)に大きな変動が生じる事が報告された(Belyaev *et al.* Nature immunology 2010)。その報告では、感染によるIFN- γ 刺激によって急増した一部の造血細胞から単球がより産生されて、マラリア原虫の排除を助けていると「推察」している。しかし、これらマラリアによる造血系の変動を単に単球の供給促進という作用のみに帰結させるには疑問点も残る。例えば、申請者は原虫感染赤血球の増減が複数回起こると、それに合わせるように造血細胞も複数回増減する事(Inoue *et al.* 未発表)を確認している。そして、この一時的な造血細胞の増加は、より下流の前駆細胞の激減をともなうため、この一連の変動が一概に効率的な免疫細胞供給を行っているだけとは言いがたい。しかも、造血細胞の増減が何度も起こるとなると、造血幹細胞にかなりの造血ストレスを与えている可能性が高い。そうであるとすると、このような造血細胞の過度の増減が、マラリア症状からの回復に重要なマクロファージ・樹状細胞などの供給や赤血球の供給に支障をきた

すこともありえる。特にヒトマラリアでは、感染赤血球の増減が繰り返し起こる事を考えると、この過度の造血ストレスがマラリア症状の重症化に関与しているとも推察される。これらより、申請者はマラリアにおいて造血系攪乱が起きており、その制御メカニズムを解明する事が重要であるとの考えに至った。

2. 研究の目的

これまでのマラリア研究においては、マラリア原虫が宿主に感染した際の各種免疫担当細胞による防御機構に関する研究が活発に進められてきた。しかし、多くの成熟免疫担当細胞を供給する造血細胞は、マラリア原虫感染によってその動態がかなり大きく変動するにもかかわらず、その分子メカニズムや病態への影響はほとんど明らかにされていない。本研究は、マラリアにおける造血系攪乱とその制御メカニズムの解明を最終目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、マウスマラリア原虫に *Plasmodium berghei* XAT(急性感染後に自然治癒する株)を用いた。マウスは C57BL/6J マウスを用いた。マウスマラリア原虫に感染した赤血球を含む血液サンプルをマウスに注射する事で感染が成立し、マウスマラリアモデルが作製される。このマラリアモデルを用いて、実験をおこなった。

マラリア原虫感染で増加した造血幹細胞の機能解析: マウスマラリアモデルの骨髄内で一時的に増加した造血幹細胞をフローサイトメトリーにて純化・採取した。放射線照射によって造血系を機能不全にしたマウスへの移植実験をおこない、その造血系を再構築する能力(造血再構築能)を *in vivo* で評価した。また、造血サイトカイン(Stem cell factor, IL-6, IL-3, erythropoietin など)を添加した *in vitro* 培養系での血球分化能の評価をおこなった。それぞれの実験は正常マウスの造血幹細胞をコントロールとしておこなった。

マラリア造血系攪乱に対する T 細胞の関連性:

T 細胞を欠損したマウス(TCR- KO マウス)にマラリア原虫を感染させ、造血幹細胞～多能性前駆

細胞(c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻)の分画が一時的に急増し、骨髄球系前駆細胞(c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻, CD34⁺, CD16/32⁺)が一時的に激減するなどの変化にどのような影響をもたらすのかを確認した。

マラリア造血系攪乱に対する IFN γ の関連性:

IFN- γ 受容体を欠損したマウス(IFN- γ R1 KO マウス)にマラリア原虫を感染させ、造血幹細胞～多能性前駆細胞(c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻)の分画が一時的に急増し、骨髄球系前駆細胞(c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻, CD34⁺, CD16/32⁺)が一時的に激減するなどの変化にどのような影響をもたらすのかを確認した。

増多した造血幹細胞の脾臓への動員因子の同

定のためのマイクロアレイ解析:

T 細胞がマラリアにおける造血に影響することが明らかになったので、その機能に関連する遺伝子の特定をおこなうため、T 細胞をフローサイトメーターにより単離してその遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。(WT マウス; Naïve、感染 5 日目、感染 14 日目を比較)

4. 研究成果

まず、*Plasmodium berghei* XAT 感染マウスの骨髄内での造血幹細胞や各種血球細胞の数的変動をフローサイトメーターにて詳細に解析した。その結果、マラリアの免疫に重要な役割を担う抗原提示細胞の樹状細胞数に一過性の増加が観られ、さらに樹状細胞の前駆細胞数も同様に一過性の増加がみられた。この現象は、IFN- γ 受容体欠損マウス (IFN- γ R1 KO マウス)においてはみられなかったことから、マラリア原虫感染後の樹状細胞の一過性の増加は、前駆細胞レベルでの IFN- γ シグナル増進によるものである可能性が示唆された。さらに、これまでの報告では、感染後においても造血幹細胞は数の増減はみられないとされてきたが、今回の研究によって造血幹細胞でも減少と増加の時期がある事が確認された。

次に、この造血系の変動における T 細胞の関連性を調べた。まず、野生型マウスと TCR-

KO マウスにおける樹状細胞の細胞数を比較したところ、T 細胞の欠損により樹状細胞数の増加が顕著に抑えられていた。そして、マラリア原虫感染 5 日目に、脾臓 T 細胞は樹状細胞との結合の割合を上昇させている事がわかった。この時点から、T 細胞は IFN- γ の他に CD40 Ligand を発現する様になり、樹状細胞を活性化させる機能があることが示された (Inoue et al., PNAS, 2012)。また、この CD40 Ligand 発現 T 細胞による樹状細胞活性化が *Plasmodium berghei* XAT への感染防御免疫につながるの、感染初期においてのみである事も解明した(Inoue et al., FEBS Letters, in press)。さらに、マイクロアレイ解析により、T 細胞はマラリア原虫感染により種々のケモカインを産生する様になる事を示すデータを得ている(Inoue et al., 未発表)。今後は、どの分子が樹状細胞を T 細胞自身に引き寄せているのかを特定する予定である。

次に、マラリア原虫感染後に増加する造血細胞について、野生型マウスと TCR- KO マウスで比較解析した。まず、それら両マウスにおけるマラリア原虫感染後の脾臓や骨髄における造血細胞分画(c-Kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻)の数的変動を計測したところ、脾臓での造血細胞の増加が TCR- KO マウスで著しく抑えられることが分かった。一方、末梢血においては、TCR- KO マウスの方が多くの造血細胞がみられた事から、T 細胞は造血細胞の homing に関与している事が示唆された。さらに、造血サイトカインを添加した *in vitro* 培養系での血球分化能の評価をおこなったところ、TCR- KO マウスでも外部刺激による血球コロニー形成能は維持されている事が確認された。さらに、致死量放射線照射した野生型マウスをレシピエントとして、野生型マウスと TCR- KO マウスのドナー造血細胞を移植する事による造血再構築能の比較をしたところ、TCR- KO マウスの方が造血能を維持している事が示された。これらの結果は、TCR- KO マウスではマラリア原虫感染による造血亢進が低下する影響で、造血能が保持された造血細胞が比較的多く残っているという事を示唆している。

今回の一連の研究によって、T 細胞とマラリア原虫感染後の造血亢進が関連性をもつことが示唆さ

れた。マイクロアレイ解析により、その現象に働く候補分子が明らかとなったが、関連分子の特定にはさらなる研究が必要となる。

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 7 件)

- (1) Inoue S-I, Niikura M, Inoue M, Mineo S, Kawakami Y, Uchida A, Ohnishi H, Kamiya S, Watanabe T, Kobayashi F: The protective effect of CD40 ligand-CD40 signalling is limited during the early phase of *Plasmodium* infection. *FEBS Lett.* 査読有, in press, 2014. (doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.035.)
- (2) 井上信一: マラリア原虫感染防御における (ガンマデルタ) T細胞の役割. 杏林医学会雑誌, 査読無, 44 (4), s47-s48, 2013.
- (3) Inoue S-I, Niikura M, Mineo S, Kobayashi F: Roles of IFN- and T cells in protective immunity against blood-stage malaria. *Front Immunol*, 査読有, Vol.4(258) pp1-9, 2013. (doi: 10.3389/fimmu.2013.00258)
- (4) Mineo S, Niikura M, Inoue S-I, Kuroda M, Kobayashi F: Development of severe pathology in immunized pregnant mice challenged with lethal malaria parasites. *Infect Immun*, 査読有, Vol.81(10), pp3865-3871, 2013. (doi: 10.1128/IAI.00749-13)
- (5) Niikura M, Inoue S-I, Mineo S, Yamada Y, Kaneko I, Iwanaga S, Yuda M, Kobayashi F: Experimental cerebral malaria is suppressed by disruption of nucleoside transporter 1 but not purine nucleoside phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, Vol.432(3), pp504-508. (doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.004.)
- (6) Inoue S-I, Niikura M, Takeo S, Mineo S, Kawakami Y, Uchida A, Kamiya S, Kobayashi F: Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing T cells is

responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, Vol.109(30), pp12129-12134, 2012 (doi: 10.1073/pnas.1204480109.)

(7) Niikura M, Inoue S-I, Kobayashi F: Role of IL-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *J. Biomed. Biotech.* 査読有, Article ID 383962, 2011, (doi: 10.1155/2011/383962.)

(学会発表) (計 20 件)

- (1) 井上 信一, 新倉 保, 井上 愛美, 峯尾 松一郎, 川上 泰, 内田 明彦, 小林 富美恵: マラリア防御免疫に必要な CD40 シグナルを介した樹状細胞の活性化は原虫感染初期で重要である. 第 83 回日本寄生虫学会大会, 愛媛, 平成 26 年 3 月 27-28 日.
- (2) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Megumi Inoue, Shoichiro Mineo, Fumie Kobayashi: The protective effect of CD40 ligand-CD40 signaling is limited during the early phase of *Plasmodium* infection. 第 7 回寄生虫感染免疫研究会, 高山, 平成 26 年 3 月 11-13 日.
- (3) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Megumi Inoue, Fumie Kobayashi: Protective effect of agonistic anti-CD40 monoclonal antibody is limited in the early phase of *Plasmodium berghei* XAT infection. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 幕張, 平成 25 年 12 月 11-13 日.
- (4) 井上 信一, 新倉 保, 井上 愛美, 峯尾 松一郎, 小林 富美恵: マラリア原虫感染に対する宿主防御免疫を促進する T 細胞サブセットの機能解析. Characterization of T-cell subsets during *Plasmodium berghei* XAT infection. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸, 平成 25 年 12 月 3-6 日.
- (5) 井上 信一, 新倉 保, 井上 愛美, 峯尾 松一郎, 小林 富美恵: *Plasmodium berghei* XAT 感染における T 細胞サブセットの機能解析. 第 11 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム, 長崎, 平成 25 年 10 月 2-3 日.
- (6) 井上 信一, 新倉 保, 大西 宏明, 渡邊 卓, 小

林 富美恵, (平成 25 年度杏林大学医学部共同研究プロジェクト中間報告): マラリア防御免疫における T 細胞の役割. 第 42 回杏林医学会総会, 東京, 平成 25 年 11 月 16 日.

(7) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Megumi Inoue, Shoichiro Mineo, Fumie Kobayashi: $V\gamma 1^+$ cells are the major subset of T cells for protection against *Plasmodium berghei* XAT. Forum Cheju 16, Seoul, August 30th-September 1st, 2013.

(8) 井上 信一, 新倉 保, 井上 愛美, 峯尾 松一郎, 小林 富美恵: マラリア原虫感染防御に働く脾臓 T 細胞のレパトア解析. 第 24 回日本生体防御学会学術総会, 熊本, 平成 25 年 7 月 10-12 日.

(9) 井上 信一 (平成 25 年度生体防御学会奨励賞受賞講演): マラリア原虫感染防御における T 細胞の役割の解明. 第 24 回日本生体防御学会学術総会, 熊本, 平成 25 年 7 月 10-12 日.

(10) 井上 信一, 新倉 保, 峯尾 松一郎, 川上 泰, 内田 明彦, 小林 富美恵: マラリア原虫感染防御における $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析. Functions of $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against *Plasmodium berghei* XAT infection. 第 82 回日本寄生虫学会大会, 東京, 平成 25 年 3 月 29-31 日 (発表 29 日).

(11) 井上 信一, 新倉 保, 峯尾 松一郎, 小林 富美恵: マラリア原虫感染に対する $\gamma\delta$ T 細胞サブセットの解明にむけた解析. Characterization of $\gamma\delta$ T cell subsets during *Plasmodium berghei* XAT infection. 第 6 回寄生虫感染免疫研究会, 大分, 平成 25 年 3 月 8 日-9 日 (発表 8 日).

(12) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Shoichiro Mineo, Fumie Kobayashi: $\gamma\delta$ T cells exert a bpsstomg effect on dendritic cell responses to *Plasmodium* parasites. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Malaria Meeting, New Orleans, January 20th-25th, 2013 (発表 22

日).

(13) 井上 信一, 新倉 保, 峯尾 松一郎, 小林 富美恵: $\gamma\delta$ T 細胞によるマラリア原虫感染防御機構 ~ CD40 ligand 発現 $\gamma\delta$ T 細胞を介した樹状細胞活性化 ~ Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡, 平成 24 年 12 月 11-14 日.

(14) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Fumie Kobayashi: Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸, 平成 24 年 12 月 5-7 日.

(15) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Satoru Takeo, Shoichiro Mineo, Yasushi Kawakami, Akihiko Uchida, Shigeru Kamiya, Fumie Kobayashi: Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium berghei* XAT. XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Lio de Janeiro, September 23rd-27th, 2012.

(16) 井上 信一, 新倉 保, 峯尾 松一郎, 竹尾 暁, 小林 富美恵 (シンポジウム): CD40L 発現 T 細胞を介した樹状細胞活性化によるマラリア原虫感染防御機構. 第 23 回日本生体防御学会学術総会, 東京, 平成 24 年 7 月 9-11 日.

(17) 井上 信一, 新倉 保, 川上 泰, 内田 明彦, 小林 富美恵: T 細胞による樹状細胞活性化を介したマラリア原虫感染防御機構の解明. 第 81 回日本寄生虫学会大会, 西宮, 平成 24 年 3 月 22-24 日.

(18) 井上 信一, 新倉 保, 横田 夏紀, 小林 富美恵: T 細胞による樹状細胞活性化を介したマラリア原虫感染防御機構の解明. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 平成 23 年 12 月 13-16 日.

(19) 井上 信一, 新倉 保, 小林 富美恵: マラリア原虫が明らかにする自然免疫リンパ球の新たな役割. 第 71 回日本寄生虫学会東日本支部大会「企画講演」, 東京, 平成 23 年 10 月 1 日.

(20) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Natsuki Yokota, Yasushi Kawakami, Akihiko Uchida, Fumie Kobayashi: T cells regulate supply and activation of immune cells during blood-stage *Plasmodium berghei* XAT infection. The 17th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. Nara, September 12th-17th, 2011.

〔図書〕(計 1 件)

(1) 井上 信一, 新倉 保, 竹尾 暁, 小林 富美恵(分担執筆): 細胞内サイトカインアッセイ: マラリア原虫感染が引き起こす免疫細胞のサイトカイン応答の解析. 「寄生虫学研究: 材料と方法」, pp113-116, 三恵社, 2012.

(2) 新倉 保, 井上信一, 竹尾 暁, 小林富美恵(分担執筆): マウスへのマラリア原虫接種法. 「寄生虫学研究: 材料と方法」, pp63-65, 三恵社, 2012, .

(3) 小林富美恵, 竹尾 暁, 新倉 保, 井上信一(分担執筆): マウスマラリア原虫: 赤血球ステージの凍結原虫(stabilate)の作製法. 「寄生虫学研究: 材料と方法」, pp67-70, 三恵社, 2012,

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

(1)ホームページ等

杏林大学医学部感染症学講座寄生虫学部門ホームページ

http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/did/parasit/p_index.html

(2)アウトリーチ活動

井上信一: 生食文化と寄生虫症. 第216回やさしい科学技術セミナー「身近にひそむ寄生虫たち」(杏林大学/国際科学技術財団主催), 東京, 平成23年10月29日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 信一 (INOUE, Shinichi)

杏林大学医学部感染症学講座寄生虫学部門・助教

研究者番号: 20466030