

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590507

研究課題名(和文) マラリア原虫感染時における樹状細胞の発生分化プログラムに関する研究

研究課題名(英文) the study about differentiation program of dendritic cells during malaria infection

研究代表者

田村 隆彦 (Tamura, Takahiko)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00434035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Plasmodium berghei ANKA(PbA)感染における脾臓内のcDCならびにpDCの細胞数の変動とそのメカニズムについて解析し、cDC、pDCとも細胞数が感染前と比較して有意に減少することが明らかになった。type Iならびにtype II interferonsがマラリア感染後のcDCの活性化、それに伴う細胞死に重要な役割を果たすことを明らかにした。

マラリア感染を経験することで徐々にマラリア感染に抵抗性を持つようになることが知られているが、その詳細なメカニズムはいまだ不明である。PbA感染後ピリメタミンで治療したマウスでは脾臓cDCが有意に増加することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The changes and mechanisms of number of splenic cDC and pDC after Plasmodium berghei ANKA (PbA) infection were analyzed. The number of cDC and pDC was significantly reduced after PbA infection. Further experiments demonstrate that type I and type II interferons were critically involved in activation and its-induced cell death of cDCs after PbA infection.

It is well known that individuals with repeated malaria infection have acquired immunity against parasites, but its mechanisms remain unclear. To investigate the changes of DC after malaria infection-cure treatment, mice infected with PbA were cured using pyrimethamine. The analysis about DC shows that splenic cDC significantly increased in cured mice.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

樹状細胞(dendritic cell; DC)はもっとも強力な抗原提示細胞であり、自然免疫、獲得免疫両面に大きな影響を与える。申請者は C57BL/6 マウスにマウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) を感染させる実験的脳マラリア発症モデルにおいて、DC の増殖因子である flt3 ligand (FL) 投与により DC を増加させるとマラリア感染時における T 細胞を中心とした免疫応答に変化が生じ、脳マラリア発症が強力に阻害されること、また MyD88 依存性 Toll like receptors (TLRs) を介した自然免疫の働きで感染初期の原虫血症が抑制されることを明らかにした (Tamura *et al.* *Infection and Immunity*, p3947, 2011)。このように DC が赤内型マラリア原虫に対する免疫応答の effector phase において中心的な司令塔の役割を果たしうること、また DC を制御することで抗マラリア免疫反応を亢進できることや、免疫学的合併症を抑制できることが示された。またマラリア感染後に治療を行っても再感染するが、繰り返すうちに原虫に対する免疫を獲得するようになることが知られている。しかし、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。DC はマラリア感染時の免疫記憶を担う記憶リンパ球の質、量にも大きく関わる可能性が考えられる。

DC は骨髄の造血幹細胞から発生し、DC の発生分化機構については大きな進展がここ数年で見られている。主には common myeloid progenitor 中に存在する flt3 陽性細胞から、FL の刺激を受けながら、common dendritic progenitor (CDP) へと分化する。CDP は conventional DC (cDC) と plasmacytoid DC (pDC) への分化能を持っているが、macrophage 等の他の細胞へは分化しない。さらに pre-cDC を経て最終的に機能的な成熟 DC へと分化する。細菌感染など炎症状態では Ly6C<sup>high</sup> monocyte から分化する DC (TipDC 等) も存在する。しかし、マラリア感染における CDP など DC 前駆細胞の細胞数、DC 分化能の変化に関する詳細な研究報告は現在のところ全くない。2 次リンパ組織における成熟 DC の半減期は数日程度と考えられており、マラリア感染環境により DC の発生分化は大きな影響を受けると想定される。研究代表者は予備の実験よりマウスマラリア感染において、骨髄中の CDP 数が感染後 4 日目でほとんど消失し、感染後 6 日目で

は CDP 数が部分的に回復し、CDP における flt3 発現が上昇していることを明らかにした。CDP の消失と符合するように脾臓内の cDC も大きく減少し、感染がさらに進展すると脾臓内に Ly6C 陽性 DC も確認されるようになる。しかし、これらの細胞が血管より遊走した Ly6C<sup>high</sup> monocyte あるいは骨髄由来の CDP から発生したのか不明である。このように DC の発生分化プログラムはマラリア感染で大きく変動し、発生する DC の免疫応答制御能力によりマラリア原虫に対する自然免疫、獲得免疫両方が重要な影響を受けることが強く予想される。マラリア感染時の DC の発生分化プログラムの解明は、いまだ不明な点も多いマラリア原虫に対する免疫応答や病態進展、免疫記憶の成立の包括的理解に大きく貢献するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

マラリアは世界で最も重要な感染症のひとつである。マラリア原虫に対する免疫応答には樹状細胞 (DC) が司令塔の役割を果たす。マラリア感染時における DC の発生分化プログラムを解析し、CDP などの DC 前駆細胞の性質や DC 分化能、DC 誘導サイトカインの発現量などにおいて、定常の非感染時との違いを明らかにすることを目的とする。本研究はマラリア感染時に認められる DC 発生分化プログラムの新たな形をはじめて明らかにする先駆的なものであり、マラリア感染で起こる免疫応答の様々な修飾現象が詳細に理解されるようになると考えられ、マラリアの重症化や再感染の有効な防御ならびにマラリアワクチン開発への波及的寄与が大きいと想定される。

## 3. 研究の方法

マウスマラリア感染時において経時的に CDP、pre-cDC、Ly6C<sup>high</sup> monocyte のような DC 前駆細胞の骨髄、末梢血、脾臓における細胞数を主にフローサイトメトリー法により解析する。同様に FL をはじめとした DC の発生分化に関わるサイトカイン産生を定量的 RT-PCR 等を用いて解析する。マラリア感染—治療を行ったマウスでの DC の細胞数や機能の変化を検討する。

#### 4. 研究成果

マラリア感染時における樹状細胞(DC)のホメオスタシス機構のより詳細な理解のため、マウスマラリア *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)感染における脾臓内の conventional DC(cDC)ならびに plasmacytoid DC(pDC)の細胞数の変動について解析した。その結果、PbA 感染により cDC, pDC とも細胞数が感染前と比較して有意に減少することが明らかになった。また、cDC, pDC ともマラリア感染に伴い強い活性化が確認された(cDC:CD80,CD86,CD40,pDC:PDC-TREM, CD86 発現)。よりアポトーシスに特化するため、活性化型 caspase-3 発現を検討した。その結果、cDC、pDC ともに PbA 感染後、DC の活性化に伴って、活性化型 caspase-3 が有意に増加していた。これらの結果はマラリア感染に伴い DC が activation induced cell death を起こしていることを示唆している。脾臓内の cDC, pDC の細胞数の減少については別のマウスマラリア *Plasmodium yoelii* 17XL を C57/BL6 マウスに感染させた場合も検討し、PbA 感染と同様に顕著な細胞数減少が有意に確認できた。また、cDC, pDC における活性化型 caspase-3 発現の上昇も認められた。

T 細胞を中心にした獲得免疫の影響を調べるため、TCRb 欠損マウスに PbA を感染させ、脾臓内 DC 数を検討した。その結果、TCRb 欠損マウスでも DC の十分な活性化が認められ、細胞数も野生型と同等に減少した。その結果、T 細胞はマラリア感染での DC の活性化、減少に必須な役割を果たしておらず、自然免疫によるメカニズムが重要であると考えられた。

Type I IFN の影響を調べるため、type I IFN の受容体である IFNAR の阻害抗体を PbA 感染マウスに投与し DC に与える効果を検討した。その結果、cDC における CD80, CD86 発現が有意に減少し、それに伴い、cDC における活性化型 caspase-3 発現が減少し、cDC の細胞数減少が回復した。

IFN-g の影響を調べるため、IFN-g 欠損マウスで PbA 感染を行い DC に与える効果を検討した。その結果、cDC における CD80, CD86 発現が有意に減少し、それに伴い、cDC にお

ける活性化型 caspase-3 発現が減少し、cDC の細胞数減少が回復した。type I IFN だけでなく IFN-g も cDC の活性化に強く関与しており、それに伴い cDC のホメオスタシスにも IFNs は大きな影響を与えていることが明らかになった。これらの結果から PbA 感染時に cDC は IFNs 依存的に成熟化が進み最終的に caspase-3 の活性化が起こり死にいたると考えられる。

MyD88 の影響を調べるため、MyD88 欠損マウスで PbA 感染を行い DC に与える効果を検討した。その結果、cDC における CD80 発現が有意に減少したが、CD86 発現は減少せず、MyD88 の影響は比較的小さいと考えられた。MyD88 欠損マウスでは cDC, pDC の細胞数減少が回復し、DC のホメオスタシスにも MyD88 は大きな影響を与えていることが明らかになった。

このようなマラリア感染時における DC の細胞数の減少はマラリア感染で見られるさまざまな病態発症と関連するものと考えられる (Tamura *et al.* Infection and Immunity, p3947, 2011, Tamura *et al.*, Parasite Immunology, p87, 2014, Tamura *et al.*, 2015、投稿中)。

一方で、マラリア感染を経験することで徐々にマラリア感染に抵抗性を持つようになることが知られているが、その詳細なメカニズムはいまだ不明である。マラリア抵抗性に大きな役割を果たす cDC に着目し、PbA 感染後ピリメタミンで治療を行い、1ヶ月後、3ヶ月後にマウス脾臓における cDC 数の検討を行った。原虫血症の再燃は見られなかったが、脾臓の肥大や黒色変化が見られた。またその前駆細胞である骨髄中の CDP, pre-cDC についても同時に解析した。その結果、マラリア感染治療により脾臓 cDC 数が有意に増加することが明らかになった。pDC については有意な差が見られなかった。骨髄における CDP や pre-cDC などの cDC 前駆細胞数には変化がみられなかった。骨髄の cDC 前駆細胞は骨髄を離れたあと脾臓などの末梢組織に移行し成熟 cDC へ分化するが、マラリア感染治療により脾臓内での前駆細胞から成熟 cDC への分化に影響が見られることが示唆された。

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 2 件)

1, Takahiko Tamura, Masoud Akbari, Kazumi Kimura, Daisuke Kimura and Katsuyuki Yui.

Flt3 ligand treatment modulates parasitemia during infection with rodent malaria parasites via MyD88- and IFN- $\gamma$ -dependent mechanisms.

Parasite Immunology, 36, 87-99, (2014). doi:

10.1111/pim.12085. 査読あり

2, Rika Kamei, Mana Miyakoda, Takahiko Tamura, Daisuke Kimura, Kiri Honma, Kazumi Kimura and Katsuyuki Yui.

Accumulation of MHC class II<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> non-lymphoid cells in the spleen during infection with *Plasmodium yoelii* is lymphocyte-dependent.

Microbiology and Immunology, 57(3), 213-223, (2013). doi:

10.1111/1348-0421.12024. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 田村隆彦、木村一美、由井克之、吉田栄人

赤血球期マウスマラリア感染における従来型樹状細胞の減少はI型、II型インターフェロン依存的細胞死である、日本寄生虫学会、2014年3月28日 愛媛県松山市

2. Takahiko Tamura, Kazumi Kimura, and Katsuyuki Yui

Flt3 ligand treatment inhibits parasitemia during infection with rodent malaria parasites via

MyD88- and IFN-g-dependent mechanisms

日本免疫学会、2013年12月13日 千葉県千葉市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 隆彦 (TAMURA, Takahiko)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00434035

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：