

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790399

研究課題名(和文) CD8 T細胞によるマラリア赤内期感染防御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of protective immunity against blood-stage malaria by CD8T cells.

研究代表者

今井 孝 (Imai, Takashi)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10513434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：CD8T細胞の赤内型マラリアに対する防御効果は、CD8T細胞を除去したマウスでは抵抗性が弱くなることから明確である。しかしながら、MHC class Iを発現しない赤血球に感染するマラリア原虫に対する防御メカニズムは不明であった。本研究では、MHC class Iを発現している赤血球の前駆細胞である赤芽球にもマラリア原虫が感染すること、また感染赤芽球が原虫抗原特異的にCD8T細胞に認識されることを見出した。また、CD8T細胞による防御機構はFasLを介した感染赤血球系細胞へのphosphatidylserinの表出、その結果おきるマクロファージによる効率的な貪食であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mice depleted of CD8 T cells showed higher parasitemia and lower survival during infection with otherwise non-lethal blood-stage malaria parasites, indicating protective roles of CD8 T cells. However, how these cells mediate protection to blood-stage malaria parasites that infect red blood cells deficient in MHC class I expression is elusive. In this study, we found that erythroblasts, progenitor cells of red blood cells, are parasitized by malaria parasites, and parasitized erythroblasts were recognized by CD8 T cells in an antigen-specific manner, suggesting that parasitized erythroblasts are the target of CD8 T cell. We further explored protective mechanisms exerted by CD8 T cells. We revealed that phosphatidylserine was externalized on parasitized cells after a ligation of cytotoxic molecule FasL on CD8 T cells to Fas on the target cells, which leads to induce effective phagocytosis by macrophages.

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：マラリア CD8 マラリア原虫 マクロファージ 感染防御 T細胞 赤芽球

1. 研究開始当初の背景

(1) マラリアは年間約2億人が感染し、60万人もの死者を出す、エイズ・結核とならぶ世界の3大感染症であり、早急な制圧が望まれる最重要課題の一つである。今なおマラリアが猛威を奮っている原因として、薬剤耐性マラリア原虫の出現に加え、有効なワクチンがないことが挙げられる。ワクチンの開発にはマラリアに対する防御免疫を詳細に検討し理解することが必須である。

(2) CD8 T細胞はウイルス感染細胞や腫瘍細胞などの異常な細胞を殺滅する細胞傷害活性を持つ。その際に MHC クラス I 分子に提示された抗原を認識する。CD8 T細胞のマラリアにおける役割は広く研究されてきた。赤外期マラリアに対しては、感染肝細胞を認識して感染防御に寄与していることが知られている。一方、赤内期においては赤血球が例外的に MHC クラス I 分子を発現しない細胞であるため、CD8 T細胞は感染赤血球を認識できないとされ、その防御免疫への貢献は疑問視されている。しかしながら近年、赤内期マラリア原虫が樹状細胞に取り込まれ、クロスプレゼンテーションと呼ばれる経路により CD8 T細胞に抗原提示されることが報告された。また、赤内期マラリアにおいて活性化された CD8 T細胞が確実に存在することも明らかにされ、CD8 T細胞の防御的役割が再び注目されてきた。

これらの先行研究を受け、研究代表者らはこれまでの報告に反し CD8 T細胞が赤内期のマラリアに防御的に働くことを明らかにした(Eur. J. Immunol. 2010)。本研究はこれまでの成果を基盤にしてさらに発展させるために計画されたものである。

2. 研究の目的

マウスマラリアモデルを用いて、赤内期マラリアに対する CD8 T細胞による感染防御メカニズムを細胞あるいは分子レベルで解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 卵白アルブミン(OVA)発現組換えマウスマラリア原虫の作製

マウスの弱毒株マラリア原虫である *Plasmodium yoelii* 17XNL (PyNL) に緑色蛍光タンパク(GFP)を発現する原虫(PyNL-GFP)、或は GFP とモデル抗原である卵白アルブミン(OVA)を発現する原虫(PyNL-GFP-OVA)を作製した。

(2) 感染実験

C57BL/6 マウスまたは細胞傷害性分子である FasL に変異をもつ gld マウスに上述の原虫を感染させ、虫血症および生存率の観測を行った。動物実験は群馬大学倫理委員会の承認

を得た後に指針を遵守し行った。

感染赤血球系細胞、T細胞、マクロファージの分離には MACS およびセルソーターを用いた。分離した細胞は細胞移入実験や試験管内の実験に用いた。OVA 特異的 T細胞レセプタートランスジェニックマウス(OT-I)を抗原特異的 CD8 T細胞として解析に供した。CD8 T細胞の活性化の指標として IFN- γ を ELISA にて測定した。

4. 研究成果

(1) CD8 T細胞の赤内期感染における役割

マウスマラリア原虫には一過性感染を引き起こし、自然治癒する弱毒株である PyNL の他、脳マラリアを引き起こす致死性強毒株である *P. berghei* ANKA (PbA) など様々な種類が存在する。これらの感染系において CD8 T細胞を抗体により除去することで本細胞の重要性を検討した。PyNL 感染においては対照群に比べ虫血症の悪化および生存率の低下が見られた。一方で PbA 感染においては対照群に比べ脳マラリアを発症せず、生存期間の延長が見られた。この結果より CD8 T細胞は弱毒株 PyNL 感染では感染防御に寄与している善玉細胞であるが、強毒株 PbA 感染においては脳マラリアを引き起こす悪玉細胞であることが示唆された。以降は主に PyNL 感染系で CD8 T細胞による赤内期感染防御の研究を遂行した。

(2) CD8 T細胞が赤内期 PyNL 感染において認識する細胞の同定

CD8 T細胞は適合する MHC class I と抗原の複合体に出会う前はナイーブ CD8 T細胞と呼ばれ細胞傷害活性は持たない。一般的に樹状細胞による MHC class I 上の特異抗原の提示と CD8 T細胞による認識(細胞接着)によりナイーブ CD8 T細胞から活性化したキラー T細胞へと変化する。キラー T細胞は IFN- γ を産生すると共に特異抗原を発現する「標的細胞」を傷害する。

樹状細胞

すでにマラリア感染で樹状細胞による CD8 T細胞の活性化がおきていることが報告されている。本研究においても PyNL-GFP-OVA 抗原と樹状細胞、OT-I 由来 CD8 T細胞を試験管内で培養すると IFN- γ が産生されることを確認した。このことから PyNL 感染においても樹状細胞を CD8 T細胞が認識し活性化していることが示唆された。

赤芽球

成熟した赤血球は MHC class I 分子を発現しないが、前駆細胞である赤芽球は CD8 T細胞が認識できる MHC class I 分子を発現する。これは、両者を区別するのに有用なマーカーである。またマウス赤血球系細胞の表面には TER119 分子が発現しているため他の細胞と区別できる。マウスマラリア原虫が赤芽球に寄生しそれを CD8 T細胞が認識するのではな

いかと作業仮説を立て実験を行った。

PyNL-GFPおよびPyNL-GFP-OVAをマウスに感染させ、赤芽球にマラリア原虫が感染していることを蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて確認をした。図1に原虫寄生赤芽球を示した。

図1. マラリア原虫の寄生した赤芽球のギムザ染色像。宿主由来の大きな核と原虫由来の小さな核や分裂体らしき原虫(矢印)が見える。スケール 10 μm

原虫寄生赤芽球のみを分離しマウスに接種すると末梢血中に寄生赤血球が見られた(虫血症)。このことは、原虫は赤芽球内でも赤血球内と同じく分裂増殖しメロゾイト(娘虫体)を放出できることを示している。

原虫寄生赤芽球を CD8T 細胞が認識できるかを検討した。OT-I 由来 CD8T 細胞と PyNL-GFP 寄生赤芽球を共培養しても反応は起きないが、PyNL-GFP-OVA 寄生赤芽球と共培養すると IFN- γ が産生された。以上の結果より原虫寄生赤芽球は MHC class I 分子上にマラリア原虫抗原を提示し、CD8T 細胞は抗原特異的に認識し活性化していることが示唆された。(2) および は Sci .Rep. 2013 に報告した。

(3)標的細胞殺滅に関わる分子群の解析

CD8T 細胞による赤内期感染防御を担う分子として IFN- γ が最重要であることを以前報告した(Eur. J. Immunol. 2010)。本分子はマクロファージの活性化を担うと共に標的細胞の MHC class I 分子の発現上昇を起こすことが知られている。そのことは、実際 IFN- γ を赤芽球培養液に加える試験管内実験で確認した(Sci .Rep2013)。標的細胞を CD8T 細胞が認識しやすくするための戦略かも知れない。

CD8T 細胞(キラーT 細胞)による細胞傷害には2つの経路がある。1つは顆粒放出依存性で、パーフォリンとグランザイムが関わる。もう一つは細胞接触依存性の Fas と FasL の関与する経路である。赤内期感染防御においてパーフォリンの部分的な関与があることを既に報告しているので、本研究においては FasL と細胞傷害分子が如何に感染防御に寄与しているのかを解析した。

赤内期感染防御における FasL の重要性

FasL に変異をもつ gld マウスに PyNL を感染させると、野生型マウスに比べ抵抗性が弱く半数程度のマウスが死亡した。PyNL および強毒株 PyL を用いた生ワクチンおよび細胞移入実験で、CD4T 細胞あるいは CD8T 細胞のどちらが FasL を防御に用いているかを検討したところ、CD8T 細胞が本分子を利用していることを確認した。

FasL による感染防御メカニズム

FasL の受容体である Fas を原虫感染赤血球系細胞が発現していた。CD8T 細胞は FasL により原虫感染赤血球系細胞上にフォスファ

チジルセリン(PS)の表出を誘導した。PS は「eat me シグナル」として知られているように、PS を多く発現する感染赤血球系細胞の方がマクロファージにより貪食されやすいことが明らかとなった。

(4)総括と今後の研究展開

CD8T 細胞による赤内期マラリア感染防御機構を研究代表者らの今までの関連する研究結果を総括し論じる。まず樹状細胞による原虫抗原のクロスプレゼンテーションあるいは原虫寄生赤芽球による CD8T 細胞の活性化がおきる。CD8T 細胞はキラーT 細胞へと変化し、IFN- γ によるマクロファージの活性化および標的細胞(寄生赤芽球?)の MHC class I 分子の発現上昇を引き起こす。FasL による感染赤血球系細胞への細胞傷害により細胞表面に PS が表出する。PS の表出した感染赤血球系細胞は活性化マクロファージなどにより効率よく貪食され原虫の排除に至る。

今回の研究でマウスマラリア原虫が、赤血球の前駆細胞である赤芽球にも寄生することを世界に先駆けて発見した。しかしながら「マラリア原虫が赤芽球に感染する」その意義は不明である。原虫が赤芽球に寄生する利点や原虫赤芽球に対する宿主防御免疫機構を明らかにすることがマラリア撲滅への鍵となるかもしれない。

最後に CD8T 細胞が原虫寄生赤芽球を認識していること、そして原虫寄生赤血球系細胞上に細胞傷害の結果と思われる PS の表出を確認している。しかしながら実際のところ細胞傷害の標的が原虫寄生赤芽球である証明はなされていない。この残された課題は、次の平成 26 年度以降に始まる科学研究費若手 B 「マラリア原虫寄生赤芽球に対する防御免疫機構の解明」にて解決する予定である。

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 4 件)

Takashi Imai, Hidekazu Ishida, Kazutomo Suzuel, Makoto Hirai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko Okada, Tomohisa Suzuki, Chikako Shimokawa & Hajime Hisaeda. CD8+ T cell activation by murine erythroblasts infected with malaria parasites. Scientific reports, 査読有 2013.3. 1572

DOI: 10.1038/srep01572

Hidekazu Ishida, Takashi Imai, Kazutomo Suzue, Makoto Hirai, Tomoyo Taniguchi, Akihiko Yoshimura, Yoichiro Iwakura, Hiroko Okada, Tomohisa Suzuki, Chikako Shimokawa and Hajime Hisaeda. IL-23 protection against Plasmodium berghei infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages.

European journal of immunology. 査読有
2013.43:2696-2706

DOI: 10.1002/eji.201343493

Xuefeng Duan, Takashi Imai, Bin Chou,
Liping Tu, Kunisuke Himeno, Kazutomo Suzue,
Makoto Hirai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko Okada,
Chikako Shimokawa, Hajime Hisaeda.
Resistance to Malaria by Enhanced Phagocytosis
of Erythrocytes in LMP7-deficient Mice.

PloS one. 査読有 2013.8(3), e59633.

DOI: 10.1371/journal.pone.0059633

Chikako Shimokawa, Richard Culleton,
Takashi Imai, Kazutomo Suzue, Makoto Hirai,
Tomoyo Taniguchi, Seiki Kobayashi, Hajime
Hisaeda, Shinjiro Hamano. Species-Specific
Immunity Induced by Infection with Entamoeba
histolytica and Entamoeba moshkovskii in Mice.
PloS one. 査読有 2013.8(11), e82025.

DOI: 10.1371/journal.pone.0082025

〔学会発表〕(計 10 件)

今井 孝, 岩脇 隆夫, 赤井 良子, 鈴江 一
友, 平井 誠, 谷口 委代, 岡田 紘子, 久枝
一「酸化ストレス可視化マウスを用いた脳マ
ラリアの新しい評価法」第 83 回日本寄生虫
学会大会 2014 年 3 月 27-28 日 愛媛大学
城北キャンパス

平井 誠, 新井 明治, 安彦 真文, 本間 一,
岡本 龍史, 鈴江 一友, 今井 孝, 谷口 委代,
堀井 俊宏, 田邊 和裕, 久枝 一「比較トラ
ンスクリプトームによるマラリア原虫受精
関連因子の探索」第 83 回日本寄生虫学会大
会 2014 年 3 月 27-28 日 愛媛大学城北キ
ャンパス

鈴江 一友, 平井 誠, 今井 孝, 谷口 委代,
岡田 紘子, 小安 重夫, 久枝 一「細胞外 ATP
がマラリア貧血を促進する」第 83 回日本寄
生虫学会大会 2014 年 3 月 27-28 日 愛媛
大学城北キャンパス

谷口 委代, 宮内 栄治, 中村 昇太, 平井 誠,
鈴江 一友, 今井 孝, 岡田 紘子, 大野 博司,
堀井 俊宏, 久枝 一「ネズミマラリアにおけ
る腸内細菌叢の劇的な変化」第 83 回日本寄
生虫学会大会 2014 年 3 月 27-28 日 愛媛
大学城北キャンパス

下川 周子, 小林 正規, 千馬 正敬, 鈴江 一
友, 平井 誠, 今井 孝, 谷口 委代, 久枝 一,
濱野 真二郎 “Double-edged effects of IFN- γ

in amoeba infection of mice” 2013 年 3 月 29-31
日 東京医科歯科大学

今井 孝「マラリア感染と宿主免疫応答」
第 4 回関東プロテクト倶楽部 2013 年 2 月
12 日東京慈恵会医科大学

Takashi Imai, Hidekazu Ishida, Kazutomo
Suzue, Makoto Hirai, Tomoyo Taniguchi,
Hiroko Okada, Tomohisa Suzuki, Chikako
Shimokawa, and Hajime Hisaeda “CD8+ T cell
activation by murine erythroblasts infected with
malaria parasites” 2013 年 1 月 20 日-25 日
keystone symposium malaria ニューオリンズ
米国

今井 孝, 石田英和, 鈴江一友, 平井 誠,
谷口委代, 岡田紘子, 鈴木智久, 下川周子,
久枝 一「マラリア原虫は赤芽球に感染し
CD8 T 細胞を活性化する」2012 年 10 月 12-13
日 第 7 2 回 日本寄生虫学会東日本支部会
第 1 0 回 分子寄生虫・マラリアフォーラム
合同大会 群馬大学

平井 誠, 安彦 真文, 本間 一, 岡本 龍史,
鈴江 一友, 今井 孝, 堀井 俊宏, 田邊 和裕,
久枝 一「比較トランスクリプトームによる
マラリア原虫受精関連因子の探索」2012 年
10 月 12-13 日 第 7 2 回 日本寄生虫学会東日
本支部会第 1 0 回 分子寄生虫・マラリアフ
ォーラム合同大会 群馬大学

Takashi Imai, Hidekazu Ishida, Kazutomo
Suzue, Makoto Hirai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko
Okada, Tomohisa Suzuki, Shiroh Iwanaga, and
Hajime Hisaeda “Malaria parasite Plasmodium
yoelii parasitizes erythroblasts and activates
CD8+ T cells.” 2012 年 5 月 23-25 日第 15 回日
韓寄生虫学セミナーForum Cheju 15 宮崎

〔その他〕

ホームページ等

World Biomedical Frontiers

<http://biomedfrontiers.org/category/anemia/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今井 孝 (IMAI TAKASHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10513434