

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790405

研究課題名(和文) マラリアの病態重症化を制御する弱毒化原虫特異的宿主免疫賦活化機構の解明

研究課題名(英文) Suppression of experimental cerebral malaria by activation of nonlethal malaria parasite-specific CD4+T cells via MHC class II in mice coinfecting with Plasmodium berghei ANKA and nonlethal Pb XAT

研究代表者

新倉 保 (Niikura, Mamoru)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30407019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：強毒株マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* (Pb) ANKA が引き起こす脳症は、弱毒化マウスマラリア原虫である Pb XAT を複合感染させることで抑制できる。本研究により、脳症の発症には MHC class II を介した CD4+T 細胞の活性化が重要であることが明らかになった。一方、この MHC class II を介した CD4+T 細胞の活性化は Pb XAT の複合感染によって修飾され、その結果、脳症が抑制されることが示された。複合感染させたマウスでは、MHC class II を介して Pb XAT に特異的に応答する CD4+T 細胞が誘導されることが示された。

研究成果の概要(英文)：Experimental cerebral malaria (ECM) caused by *Plasmodium berghei* (Pb) ANKA has been suppressed by coinfection with nonlethal Pb XAT. In this study, we showed that CD4+T cells which are activated via MHC class II play a crucial role for development of ECM in mice singly infected with Pb ANKA. The activation of CD4+T cells via MHC class II in Pb ANKA-infected mice was modulated by coinfection with Pb XAT, resulting in the suppression of ECM in mice coinfecting with Pb ANKA and Pb XAT. Results from analysis using Ciita-deficient mice, which lack MHC class II expression, suggest that Pb XAT-specific CD4+T cells were induced via MHC class II in coinfecting mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：マラリア 弱毒株 複合感染 病態重症化 MHC class II CD4+T細胞 比較ゲノム 比較プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

世界各地で報告されている多剤耐性熱帯熱マラリア原虫の存在と拡散は、致死的な経過をたどる熱帯熱マラリア原虫感染に対して治療を行う際に非常に深刻な問題となってきた。最も致死性の高い脳性マラリアの発症を、宿主免疫応答を利用して制御する機構が解明されれば、熱帯熱マラリアの脅威を低減できる可能性がある。

Plasmodium berghei (*Pb*) ANKA はマウスマラリア原虫の強毒株である。宿主であるマウスに感染すると、ヒトの脳性マラリアと類似する脳症を引き起こすことから、その病態モデルとして研究に多用されている。この脳症の発症には CD8⁺T 細胞が中心的な役割を果たすことが広く知られている。

弱毒化マウスマラリア原虫 *Pb* XAT をマウスに感染させると、マウスは低レベルの原虫血症を引き起こすが、感染後 30 日程度で自然治癒する。弱毒化原虫 *Pb* XAT 感染における CD4⁺T 細胞は防御免疫の成立に重要な役割を果たすことが明らかにされている (Waki *et al.* 1992)。

強毒株マウスマラリア原虫 *Pb* ANKA 感染によって引き起こされる脳症は、弱毒化マウスマラリア原虫である *Pb* XAT を複合感染させることで抑制できることが明らかとなっている (Niikura, *et al.* 2010)。この弱毒化マウスマラリア原虫複合感染による脳症の抑制には、弱毒化マウスマラリア原虫特異的 CD4⁺T 細胞が関与していることが推察される。そこで、宿主免疫応答を利用してマラリアの脳症を制御する機構を解明するためには、まず、複合感染させたマウスにおいて弱毒化原虫 *Pb* XAT に特異的な CD4⁺T 細胞が誘導されていることを明らかにし、次いで弱毒化原虫 *Pb* XAT 特異的 CD4⁺T 細胞の誘導機構について解析する必要があると考えるに至った。

2. 研究の目的

- (1) *Pb* ANKA が引き起こす脳症を弱毒化マラリア原虫複合感染が抑制する効果には、MHC class II 分子とともに提示された弱毒化マラリア原虫抗原に対して特異的に反応する CD4⁺T 細胞が関与すると推察される。そこで本研究では、MHC class II 分子 (MHC II) を欠損したマウスを用いて、弱毒化マウスマラリア原虫特異的 CD4⁺T 細胞と脳症抑制効果との関係を明らかにすることとした。
- (2) 弱毒化マウスマラリア原虫である *Pb* XAT は、X 線照射によって弱毒化された原虫である。弱毒化の原因を明らかにすることで、弱毒化原虫特異的 CD4⁺T 細胞の誘導機構を解明する糸口を掴める可能性がある。そこで、強毒株と弱毒株間での比較ゲノム解析と比較プロテオーム解析を行い、弱毒化の原因を特定することとした。

3. 研究の方法

(1) マウスマラリア原虫の感染

マウスマラリア原虫の単独感染

C57BL/6J マウス(野生型マウス)と、MHC II の発現に必須な転写因子である *Ciita* を欠損した B6 マウス (MHC II 欠損マウス) に強毒株マウスマラリア原虫 *Pb* ANKA または弱毒化原虫 *Pb* XAT の感染赤血球 1×10^4 個を静脈注射により感染させ、それぞれの感染における原虫血症の推移と生存率を解析した。

マウスマラリア原虫の複合感染

野生型マウスと MHC II 欠損マウスに弱毒化原虫 *Pb* XAT の感染赤血球 1×10^4 個を静脈注射により感染させた。*Pb* XAT 感染後 1 日目に強毒株 *Pb* ANKA の感染赤血球 1×10^4 個を静脈注射により感染させ、原虫血症の推移と生存率を解析した。

(2) 蛍光タンパク質発現原虫の作出

マウスマラリア原虫への蛍光タンパク質 (GFP または mCherry) の導入は遺伝子ターゲティングベクターを用いた 2 重交差相同組み換えによって行った (Janse, *et al.*, 2006)。

(3) 蛍光タンパク質発現原虫の計測

蛍光タンパク質発現原虫は、All-in-One 蛍光顕微鏡 (BZ9000; Keyence) を用いて観察した。蛍光タンパク質発現原虫の割合は、BZ-II Analyzer software (Keyence) を用いて計測した。

(4) 比較ゲノム解析

Pb ANKA と *Pb* XAT を感染させたマウスから採血し、原虫の DNA を抽出した。*Pb* ANKA と *Pb* XAT の塩基配列は、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq 2000; Illumina, Inc) により解析した。

(5) 比較プロテオーム解析

Pb ANKA と *Pb* XAT を感染させたマウスから採血し、18 時間培養した後、シゾントとガメトサイトを精製した。精製したシゾントとガメトサイトからタンパク質を抽出し、質量分析計 (Orbitrap Velos; Thermo Fisher Scientific) により解析した。

4. 研究結果

(1) 強毒株マラリア原虫感染と弱毒化マラリア原虫感染における CD4⁺T 細胞の役割

強毒株 *Pb* ANKA 感染によって引き起こされる脳症における CD4⁺T 細胞の役割は、これまで明確に示されていない。強毒株 *Pb* ANKA 感染における脳症と CD4⁺T 細胞との関係について調べるために、MHC II の発現に必須な転写因子である *Ciita* を欠損したマウス (MHC II 欠損マウス) を用いて解析を行った。解析の結果、*Pb*

ANKA を B6 マウスに感染させると、B6 マウスは感染後 10 日以内に脳症を発症し、死亡した (図 1; WT)。一方、*Pb* ANKA を感染させた MHC II 欠損マウスでは脳症の発症が抑制され、感染後 50 日以上生存した (図 1; Ciita KO)。これらの結果から、*Pb* ANKA 感染における脳症の発症には MHC II-原虫抗原複合体によって活性化された CD4⁺T 細胞が関与することが示された。

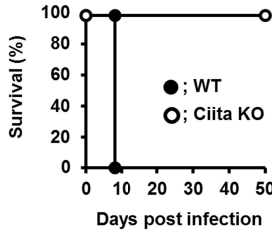


図1. マウスマラリアの脳症と CD4⁺T 細胞との関係

anti-CD4 mAb (Days p.i.)	Incidence of ECM
-1, 1, 4 & 6	0
1 & 3	33.3
2 & 4	100
3 & 5	100
4 & 6	100
6 only	100

表1. CD4⁺T 細胞が脳症の発症に関わる時期

Pb ANKA 感染において、CD4⁺T 細胞が脳症の発症に関わる時期を明らかにするために、抗 CD4 抗体を用いた細胞除去による解析を行った。その結果、*Pb* ANKA の感染前日から CD4⁺T 細胞を除去した群、感染後 1 日目から CD4⁺T 細胞を除去した群では脳症 (ECM) の発症が抑制されたが、*Pb* ANKA 感染後 2 日目以降から CD4⁺T 細胞を除去した群では全てのマウスが脳症 (ECM) を発症した (表 1)。これらの結果から、CD4⁺T 細胞は *Pb* ANKA の感染初期 (感染後 0-2 日目) に脳症の発症に重要な役割を果たしていることが明らかになり、強毒株 *Pb* ANKA 感染において、MHC II-強毒原虫抗原複合体により活性化された CD4⁺T 細胞は脳症の発症に関与することが示された。

弱毒化原虫 *Pb* XAT を B6 マウスに感染させると、*Pb* XAT はマウス体内で増殖するものの、感染後 30 日目に *Pb* XAT は完全に排除された (図 2; WT)。*Pb* XAT 感染において、CD4⁺T 細胞は防御免疫の誘導に必須であることが知られている。MHC II は CD4⁺T 細胞の活性化に重要な役割を果たすことから、MHC II 欠損マウスは *Pb* XAT に対する防御免疫を誘導できないと推測される。期待された通り、*Pb* XAT を感染させた MHC II 欠損マウスは野生型マウスと比較して原虫血症が増悪し、最終的に全てのマウスが死亡した (図 2; Ciita KO)。一方、感染後 15 日目までは著しい原虫血症の増悪が認められなかつ

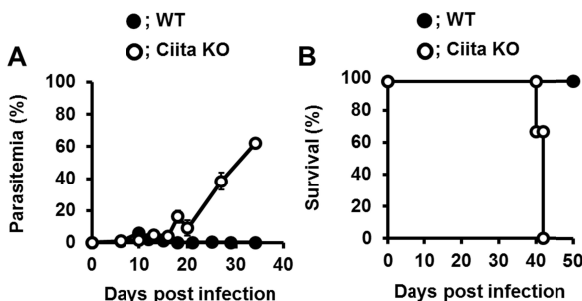


図2. *Pb* XAT 感染における MHC II の役割

たことから (図 2; Ciita KO)、感染初期の原虫排除には MHC II 非依存的な機構が働いていると推測された。

(2) 弱毒化マウスマラリア原虫特異的 CD4⁺T 細胞と脳症抑制効果との関係

強毒株マウスマラリア原虫である *Pb* ANKA の感染によって引き起こされる脳症は、弱毒株 *Pb* XAT を複合感染させることによって抑制されることが明らかになっている (Niikura, et al. 2010)。この弱毒化マウスマラリア原虫複合感染による脳症の抑制には、弱毒化マウスマラリア原虫特異的 CD4⁺T 細胞が関与していることが推察される。そこで、複合感染させたマウスにおいて弱毒化原虫 *Pb* XAT に特異的な CD4⁺T 細胞が誘導されているかどうかを、MHC II 欠損マウスを用いて解析を行った。まず、原虫血症の推移と生存率を解析したところ、複合感染させた B6 マウスと比較して、複合感染させた MHC II 欠損マウスの原虫血症の増悪は抑制され、生存期間が延長した (図 3A, B)。

次に、複合感染時の *Pb* ANKA と *Pb* XAT の感染動態を調べるために、赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を導入した *Pb* ANKA と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を導入した *Pb* XAT を用いて、*Pb* ANKA と *Pb* XAT の割合を解析した。その結果、複合感染させた B6 マウスでは、感染経過に伴い *Pb* XAT は急激に割合が低下し、感染後 15 日目にはほとんど検出されなくなった。一方、*Pb* ANKA の割合は感染後急激に増加し、感染後 10 日目以降からは原虫血症の大部分を *Pb* ANKA が占めることが明らかとなった (図 3C)。

複合感染させた MHC II 欠損マウスでは、原虫血症の *Pb* XAT の割合の著しい低下は認められず、マウスが死亡するまで *Pb* XAT が原虫血症の大部分を占めることが示された (図 3D)。一方、*Pb* ANKA は感染経過に伴い徐々に増加したが、*Pb* XAT と比較して低レベルであった (図 3D)。これらの結果から、*Pb* ANKA と *Pb* XAT を

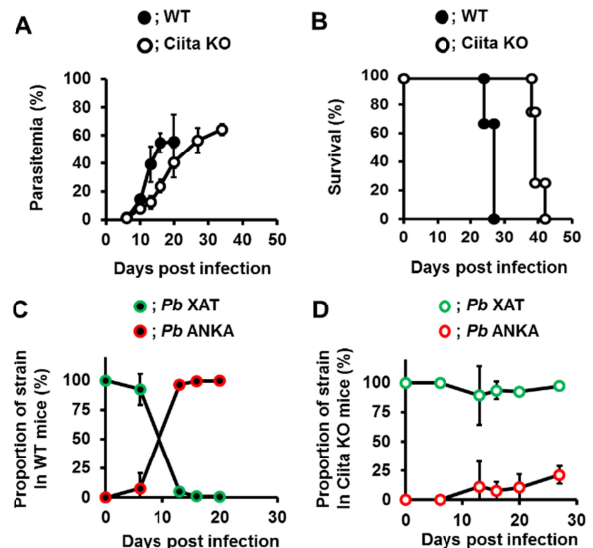


図3. 複合感染マウスにおける弱毒株特異的防御免疫の誘導

複合感染させた B6 マウスでは、MHC II-弱毒化原虫抗原複合体は防御免疫に関わる CD4⁺T 細胞が活性化されており、弱毒化原虫 *Pb* XAT を特異的に排除することが示された。一方、複合感染させた B6 マウスでは、感染後 10 日目以降から原虫血症が増悪したことから、MHC II-強毒原虫抗原複合体は原虫排除において抑制的に関わる CD4⁺T 細胞を活性化させるのかもしれない。

(3) 比較ゲノム解析と比較プロテオーム解析

Pb XAT は X 線照射によって弱毒化された原虫である。弱毒化の原因は遺伝子の突然変異であると考えられるが、原因となる変異は明らかにされていない。*Pb* ANKA 感染と *Pb* XAT 感染間における CD4⁺T 細胞の活性化機構の違いは、この遺伝子変異に起因すると推測されることから、*Pb* XAT の弱毒化の原因を解明することで弱毒化原虫特異的宿主免疫賦活化機構を明らかにできる可能性がある。そこで、比較ゲノム解析と比較プロテオーム解析により *Pb* XAT の弱毒化の原因遺伝子を特定することとした。比較ゲノム解析と比較プロテオーム解析の結果、弱毒化に関わると推定される遺伝子変異が複数検出された。現在、変異が検出された遺伝子について解析を進めている。

総括: マラリアの病態重症化を制御する弱毒化原虫特異的宿主免疫賦活化機構

本研究により、強毒株 *Pb* ANKA 感染における脳症の発症に関わる CD4⁺T 細胞の活性化には MHC II が関与することが示された。一方、弱毒株原虫 *Pb* XAT 感染においてもまた、防御免疫の誘導に重要な役割を果たす CD4⁺T 細胞の活性化には MHC II が関与することが示された。これらの結果から、*Pb* ANKA 感染、*Pb* XAT 感染ともに CD4⁺T 細胞の活性化には MHC II が関与するが、その活性化機構は両感染間で異なることが示唆された。この活性化機構の違いは、弱毒株が抗原提示細胞として機能する樹状細胞やマクロファージに認識・貪食されやすいことに起因すると推察される。

Pb ANKA と *Pb* XAT を複合感染させた B6 マウスにおいて、脳症の発症に関わる CD4⁺T 細胞ではなく、弱毒化原虫 *Pb* XAT に特異的な CD4⁺T 細胞が誘導されることが示された。この防御免疫に関わる CD4⁺T 細胞は、*Pb* XAT を貪食した抗原提示細胞が MHC II を介して *Pb* XAT の抗原を提示することで活性化されていると推察される。一方、複合感染させた B6 マウスにおいて、*Pb* ANKA が優位に増加したことから、MHC II-強毒原虫抗原複合体は原虫排除において抑制的に関わる CD4⁺T 細胞を活性化させるのかもしれない。しかし、B6 マウスは脳症を発症しないことから、*Pb* XAT 由来抗原の暴露によって、脳症の発症に関わる CD4⁺T 細胞の活性化が阻害されていると考えられる。

Pb ANKA と *Pb* XAT を複合感染させた MHC II 欠損マウスでは、弱毒化原虫 *Pb* XAT は排除されることなく、弱毒化原虫 *Pb* XAT の原虫血症の比率は高いままであった。弱毒化原虫 *Pb* XAT の比率が高いことで、複合感染させた MHC II 欠損マウスの原虫血症は B6 マウスと比較して抑制され、その結果、MHC II 欠損マウスの生存期間が延長したと考えられる。

本研究により、比較ゲノム解析と比較プロテオーム解析によって *Pb* XAT の弱毒化に関わると推定される遺伝子変異が検出されたことから、これまでに明らかにされていなかったマラリア原虫の弱毒化機構を解明できる可能性がある。マラリア原虫の弱毒化機構の解明は、防御免疫に関わる CD4⁺T 細胞を誘導するための宿主 寄生虫間分子機構を明らかにするだけでなく、マラリアにおける獲得免疫成立機構のさらなる解明の突破口となり、効果的なマラリアワクチン開発に大きく貢献するものと期待される。

< 引用文献 >

- Waki S, Uehara S, Kanbe K, Ono K, Suzuki M, Nariuchi H. The role of T cells in pathogenesis and protective immunity to murine malaria. *Immunology*, 75: 646-51, 1992.
- Niikura M, Kamiya S, Nakane A, Kita K, Kobayashi F. IL-10 plays a crucial role for the protection of experimental cerebral malaria by co-infection with non-lethal malaria parasites. *Int J Parasitol*, 40: 101-8, 2010. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.08.009.
- Janse CJ, Ramesar J, Waters AP. High-efficiency transfection and drug selection of genetically transformed blood stages of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Nat Protoc*, 1: 346-56, 2006.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 6 件)

- 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, 588: 2147-2153, 2014. doi: 10.1016/j.febslet.2014.04.035.
- Mineo S, **Niikura M** (equal contributor), 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, 81: 3865-3871, 2013. doi: 10.1128/IAI.00749-13.
- Inoue S-I, **Niikura M**, Mineo S, Kobayashi F: Roles of IFN- γ and $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against blood-stage malaria. *Front Immunol*, 査読有, 4:1-9, 2013. doi: 10.3389/fimmu.2013.00258.
- 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, 432: 504-508, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.004.

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 $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 査読有, 109: 12129-12134, 2012. doi: 10.1073/pnas.1204480109.

杏林大学・医学部・教授
研究者番号:20118889

(学会発表) (計 34 件)

Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Megumi Inoue, Fumie Kobayashi: Severe pathology in pregnant mice during malaria. The 18th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. Dresden, October 1st-3rd, 2014.

Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Megumi Inoue, Fumie Kobayashi: The role of nucleoside transporters during asexual phase of *Plasmodium berghei* parasites. International Congress of Parasitology (ICOPA XIII), Mexico City, August 10th-15th, 2014.

新倉 保, 峯尾松一郎, 井上信一, 井上愛美, 小林富美恵: 妊娠によるマラリアの病態重症化機構の解明. Studies on pathogenesis in immunized pregnant mice challenged with lethal malaria parasites. 第 83 回日本寄生虫学会大会, 愛媛, 平成 26 年 3 月 27-28 日.

Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Shoichiro Mineo, Megumi Inoue, Fumie Kobayashi: Roles of NT1 and PNP in the blood stages of *Plasmodium berghei* ANKA. Forum Cheju 16, Seoul, August 30th-September 1st, 2013.

Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Shoichirou Mineo, Fumie Kobayashi: Expression of OX40L is enhanced on macrophages through TLR2, TLR4 or TLR9 signaling during attenuated murine malaria parasite infection. 第 82 回日本寄生虫学会大会, 東京, 平成 25 年 3 月 29-31 日.

(図書) (計 0 件)

(産業財産権) (計 0 件)

(その他)

杏林大学医学部感染症学寄生虫学部門 HP :
http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/did/parasit/p_index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

新倉 保(NIIKURA MAMORU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 30407019

(2)研究協力者

小林 富美恵(KOBAYASHI FUMIE)