

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860276

研究課題名(和文) マラリア原虫寄生赤芽球に対する防御免疫機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of protective immunity against malaria parasite parasitized erythroblasts

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は近年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感染できることを発見した。寄生赤芽球はMHCクラスIを発現しており、CD8T細胞が抗原特異的に認識する。

本研究において寄生赤芽球に対する防御には、CD8T細胞が重要であることを見出した。CD8T細胞上のFasLが原虫寄生赤芽球上のFas(死の受容体)に作用し、フォスファチジルセリン(PS)の表出を誘導する。PSを表出した感染細胞はマクロファージ上のTim-4を介して貪食される。

研究成果の概要(英文)：We recently discovered that mouse malaria parasites can parasitize erythroblasts which is the precursor of the RBC. Parasitized erythroblast express MHC class I and CD8 T cells recognized them in an antigen-specific manner.

In this study, we found that CD8 T cells are important to protection against parasitized erythroblast. FasL on CD8 T cells interacts with Fas (death receptor) on the parasitized erythroblasts and induces externalization of phosphatidylserine (PS). PS externalized infected cell are phagocytized by macrophage through Tim-4.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 赤芽球 CD8T細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1)マラリアは年間、約 2 億人が罹患し、60 万人が死亡する寄生虫感染症である。本感染症の原因であるマラリア原虫は蚊により媒介される。マラリア撲滅のために様々な試みがなされているが薬剤に対する耐性マラリア原虫や耐性蚊の出現により、依然として熱帯地方を中心に蔓延している。感染症を防ぐ一般的な方法としてワクチンがあるが、マラリアに対しては現在開発中である。マラリア原虫に対する宿主防御機構を解明することで、ワクチン開発の一助になることが期待される。

(2)マラリアは感染蚊の刺咬により、スポロゾイトが注入されることで始まる。スポロゾイトは肝細胞へ感染し、その中で分化・増殖しメロゾイトへと形態を変化させる。メロゾイトは肝細胞を脱出し血流に放出されると、赤血球へと侵入する。赤血球内で分裂し、8~32 個のメロゾイトとなり赤血球を破壊し新たな宿主赤血球に感染を繰り返す。従来マラリア原虫が感染する細胞は肝細胞と赤血球であることが知られていたが、申請者らは、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寄生することを発見した(Imai et al., *Sci Rep*, 2013)。赤芽球はマウスでは骨髄及び脾臓に存在しており、さらに MHC class I と呼ばれる自己と非自己の認識機構において重要な分子を発現している。マラリア寄生赤芽球に関する報告は、極僅かでありこの細胞の生物学的な意義など不明な点が多い。さらに、寄生赤芽球に対する宿主免疫系の応答に関する報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究においては、「マラリア原虫寄生赤芽球に対する防御免疫機構の解明」を目的とした。

3. 研究の方法

(1)感染実験

本研究においては弱毒株マウスマラリア原虫である *Plasmodium yoelii* 17XNL(PyNL)及び強毒株 17XL(PyL)そして GFP を発現する PyNL-GFP を用いた。C57BL/6 マウスまたは、FasL の変異マウスである *gld* マウスに赤内期マラリア原虫を感染させ、その後の虫血症の変化及び生存率を観測した。動物実験は群馬大学の倫理委員会による承認を得て指針を遵守して行った。

(2)寄生赤芽球に対する宿主防御応答

原虫寄生赤芽球と寄生赤血球は、MHC class I 分子の発現量の違いにより区別した。寄生赤芽球に対する宿主防御機構は、*in vivo* 及び *in vitro* の培養実験とフローサイトメトリーにより解析した。

4. 研究成果

(1)CD8T 細胞の活性化と細胞傷害性分子の重要性

CD8T 細胞は PyNL 感染後に活性化し、CD25, CD69, FasL, LAMP1 を発現している細胞の割合が増加していた(図 1)。FasL の変異マウスである *gld* マウスに PyNL を感染させると感染抵抗性が野生型マウスより減弱した。また PyL に対する生ワクチンモデルにより原虫に対する防御に CD8T 細胞の FasL が関与しているが、CD4T 細胞のそれは不必要であることを確認した。このことからマラリア感染防御において CD8T 細胞の細胞傷害性分子である FasL が重要であることが示された。

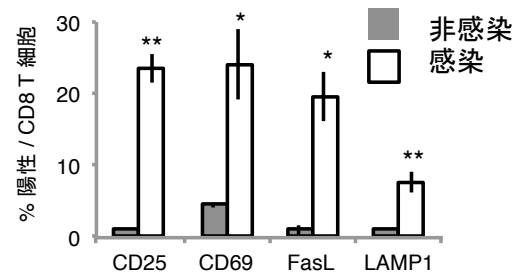


図 1. PyNL 感染による CD8T 細胞の活性化

(2)CD8T 細胞による寄生赤芽球の認識とフォスファチジルセリン(PS)の表出

以前の論文において CD8T 細胞は寄生赤芽球を抗原特異的に認識できることを *in vitro* において確認した(Imai et al., *Sci Rep*, 2013)。通常 CD8T 細胞は標的細胞に細胞傷害性分子を介して細胞死を誘導する。傷害された標的は、核の断片化や PS の細胞表面への表出が起きる。本研究においては、*in vivo* での寄生赤芽球の PS の表出を確認した。PS の表出している赤芽球の割合は CD8T 細胞除去マウスや *gld* マウスでは野生型の対照群よりも少なかった。また、寄生赤芽球と感染マウスから分離した CD8T 細胞を共培養すると PS の表出した寄生赤芽球の割合が増えたが、*gld* マウスの CD8T 細胞ではその割合が少なかった。このことから、PS の表出には CD8T 細胞ならびに FasL が関与していることが明らかとなった。さらに直接的に FasL の関与を示すために FasL-step という試薬を寄生赤芽球培養液に加えたところ、PS の表出が亢進した。

それでは、実際に FasL の受容体である Fas が発現しているのかを確認した。赤血球上にはその発現が見られなかったが、赤芽球上には非寄生細胞の 20%が Fas を発現しており、寄生細胞では 75%程度もの細胞が Fas を発現していた(図 2)。

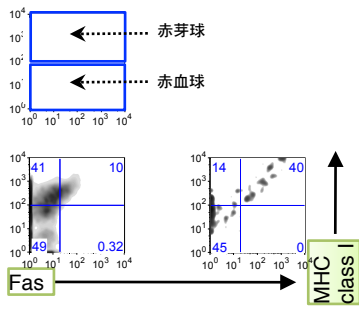


図2. 感染赤血球系細胞の Fas と MHC class I 分子の発現

(3)マクロファージによる寄生細胞の貪食
PS の表出は eat me signal (貪食細胞による取り込みシグナル) として働くことが良く知られている。本研究においても寄生赤芽球の多くがそして寄生赤血球の一部が PS を CD8T 細胞依存性に表出することを確認している。そこでマラリア感染においても PS が eat me signal として働くかを検討した。CD8T 細胞を除去されたマウスや *gld* マウスの寄生赤血球はなぜか野生型に比べて PS の表出している細胞の割合が少なかった。これらを *in vitro* でマクロファージと共培養すると、PS をより多く発現している群の方がより多く貪食されることが確認された (図3)。PS の受容体は Tim-4 であるとの報告があるので、マラリア原虫においても本分子が関与しているかを検討した。抗 Tim-4 抗体を培養系に加えると、部分的に貪食阻害効果が認められた。このことから Tim-4 はマラリア感染細胞の新規の貪食受容体である可能性が示された。

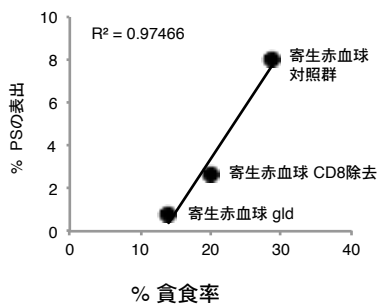


図3. 寄生細胞上の PS の表出と貪食率の関係

総括とさらなる研究課題

本研究において「マラリア原虫寄生赤芽球に対する防御免疫機構の解明」を目指し CD8T 細胞がマラリア原虫寄生細胞に PS の表出を誘導することで防御に寄与していることを見出した。さらに PS の表出した細胞はよりマクロファージによる貪食を誘導できることを示した。しかしながら、Fas/FasL の刺激を受けた赤芽球内の原虫の状態は不

明であり原虫も何らかの傷害を受けているのかは次の検討課題である。また、PS の表出した寄生細胞の方がよりマクロファージの貪食が起きるが、実際に寄生赤芽球の貪食実験は、技術的な問題で実施できなかった、これも次の検討課題である。

そして、そもそも赤芽球にマラリア原虫が寄生するその生物学的な意義は全く不明である。赤血球と赤芽球は様々な違いがあり、原虫が意図的に赤芽球に寄生しているのであれば、研究する価値は十分あると思われる。

赤内期マラリア原虫に対する現在のワクチン戦略は抗体の誘導が主である。しかし寄生赤芽球に対する防御を CD8T 細胞が担っていることが明らかになり、CD8T 細胞を含む細胞性免疫を増強するワクチンを開発できればより効果の高いものになるかもしれない。

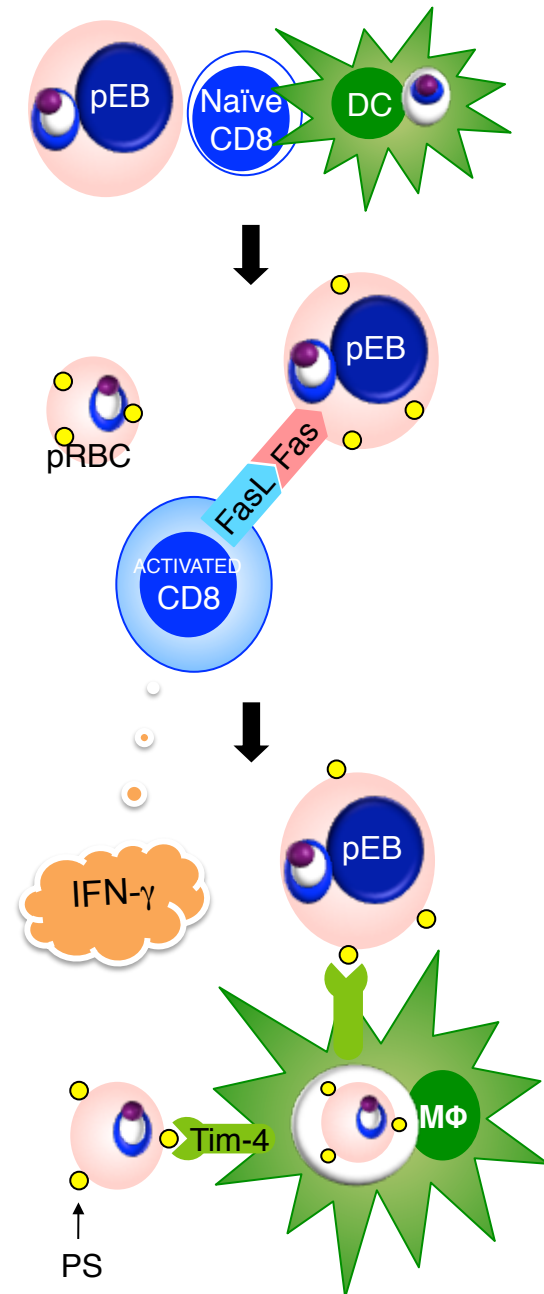


図 4. CD8T 細胞を介した赤内期マラリア感染防御機構の全容 (pEB: 寄生赤芽球、DC: 樹状細胞、pRBC: 寄生赤血球、MΦ : マクロファージ、activated CD8: 活性化 CD8T 細胞)

最後に、前研究課題である「CD8T 細胞によるマラリア赤内期感染防御機構の解明」と本研究により明らかとなったことを図 4 に示した。まず抗原に出会っていない naïve CD8T 細胞は樹状細胞により抗原提示を受け活性化する。その後活性化 CD8T 細胞はマラリア原虫寄生赤芽球を認識し Fas と FasL の作用により寄生細胞上に PS の表出を誘導する。

また CD8T 細胞は IFN- γ を産生することでマクロファージなどの食細胞の活性化を引き起こす。マクロファージは PS の表出した寄生細胞を Tim-4 依存性に食することで、マラリア感染防御に働いている。

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)

① Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, Imai T (17 名中 6 番目), et al. Plasmodium berghei ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis. Sci Rep. 査読有 2015;5: 15699.

② Okada H, Suzue K, Imai T (8 名中 3 番目), et al. A transient resistance to blood-stage malaria in interferon- γ -deficient mice through impaired production of the host cells preferred by malaria parasites. Front Microbiol. 査読有 2015;6:600

③ Imai T (7 名中 1 番目), Ishida H, Suzue K, et al. Cytotoxic activities of CD8 T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. Elife. 査読有 2015;4. e04232

④ Imai T (8 名中 1 番目), Iwawaki T, Akai R, et al. Evaluating experimental cerebral malaria using oxidative stress indicator OKD48 mice. Int J Parasitol. 査読有 2014;44(10):681-685.

[学会発表] (計 1 件)

① Takashi Imai, Hidekazu Ishida, Kazutomo Suzue, Makoto Hirai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko Okada, Chikako Shimokawa and Hajime Hisaeda: Cytotoxic activities of CD8+ T cells collaborate with macrophage to protect against blood-stage murine malaria. ICOPA (13th International congress of parasitologists). 2014 年 8 月 10 日～15 日. メキシコシティ

[その他]

ホームページ等

群馬大学プレスリリース

<http://www.gunma-u.ac.jp/information/4883>

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