

令和 元 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08520

研究課題名（和文）免疫学的特異性から逸脱したマラリアにおけるT細胞応答の分子メカニズム

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of non specific T cell response upon malaria

研究代表者

鈴江 一友（SUZUE, Kazutomo）

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00333485

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000 円

研究成果の概要（和文）：免疫系には特異性というルールが存在し、このルールが正しく守られていなければ、種々の感染によって病原体とは全く無関係な免疫細胞が増殖し活性化してしまう。我々はマラリア感染において、免疫応答が非特異に活性化・活性化制御されることを見出した。この特徴的なT細胞の変動は、赤血球からのATP放出をブロックすることで阻害された。さらにATPの代謝産物であるアデノシンが免疫応答を非特異に抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア感染における非特異的免疫抑制の分子メカニズムの解明に近づく結果が得られた。この結果から、マラリア流行地におけるほかの感染症の複合感染の重症化メカニズムや、逆にマラリア流行地ではほとんど見られず、先進国において問題となっているアレルギーや自己免疫疾患の治療戦略に対するヒントが得られたと考えている。本研究をさらに発展させることで、マラリア患者の複合感染症対策や、先進国におけるアレルギー・自己免疫疾患対策だけでなく、新規マラリア治療戦略の発展も期待できるものである。

研究成果の概要（英文）：A specificity is the most important in the immune system, and if this immunological rule is violated, immune cells that are unrelated to the pathogen become activated upon infection. We found that in malaria infection, the immune response is nonspecifically activated and suppressed. This characteristic T cell response was inhibited by blocking ATP release from red blood cells. Furthermore, it has been suggested that adenosine, which is a metabolite of ATP, suppresses the immune response nonspecifically.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア 免疫抑制 T細胞 ATP ヌクレオチド アデノシン プリン受容体 ヌクレオシド

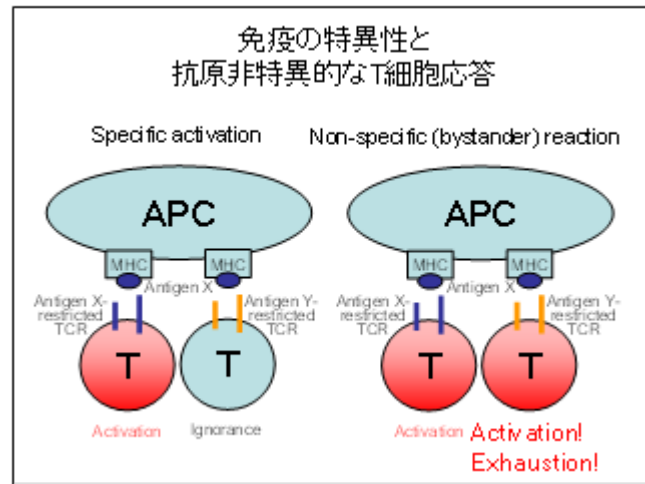
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

<マラリア感染で抗原非特異的なT細胞が応答する>

免疫系には特異性というルールがあり、このルールが正しく守られていなければ、種々の感染によって病原体とは全く無関係な免疫細胞が増殖・活性化してしまい、感染防御免疫応答を担うリンパ球サブセットの増殖を阻害するだけでなく、体内に一定の割合で存在する自己応答性細胞などが活性化する危険性がある（図）。

マラリアは反復感染し、免疫記憶が成立しにくい。感染免疫応答には宿主にプラスに作用する免疫応答もあれば、マイナスに作用する免疫応答も存在する。我々はマラリアワクチンの開発を最終目的とし、マラリア免疫応答のなかで、何が防御免疫として作用し、何が感染増悪を導くのかについて明らかにすることを目指した。その研究



過程で、遺伝的にT細胞を欠損する Rag2-/-マウスや MHC-/-マウス、ZAP-70-/-マウスにマラリア強毒原虫 *Plasmodium berghei* NK65 を感染させたところ、野生型マウスよりT細胞欠損マウスのほうが長期間生存することを見出した 2,3。この結果はある種のT細胞が感染宿主の生存期間を短縮させることを示唆する。その原因はT細胞の非特異的活性化にあるという仮説を立て、T細胞レセプター（TCR）トランスジェニック（tg）マウスにマラリア原虫を感染させ、T細胞を解析したところ、興味深いことにマラリア非特異的な CD8+ T細胞が感染宿主の生存期間を短縮させることが判明した 4-7。免疫系の特異性というルールから外れたこのマラリア非特異的T細胞の活性化に関する知見は、マラリア患者でしばしば見られる自己免疫症状や致死性の脳マラリア（CD8+ T細胞が原因細胞の一つ）の発症機序の解明につながり、当該分野に貢献しうる。また CD8+ T細胞とは異なり、CD4+ T細胞は活性化が抑制され、その結果 CD4+ T細胞依存的に発症する DNFB 誘導接触性過敏症（CHS）や MOG ペプチド誘導実験的脳脊髄炎（EAE）の系ではマラリア感染マウスはその症状が顕著に抑制されることを見出した。

<マラリア感染で血中 ATP 値が顕著に上昇する>

マラリアは赤血球に感染する細胞内寄生性原虫による疾患であり、発熱や貧血を主症状とする。この感染症の非常にユニークな点は、原虫が赤血球内に存在する時には発熱などの症状が全く認められず、患者はまったく自覚症状を呈することなく日常生活を送ることが可能である。しかしながら体内で同期する原虫の、約 48 時間ごとに訪れる新たな細胞への感染時には、血管内で一斉に赤血球が破壊され、これに伴って患者は突然 40 度以上の高熱を発熱し、激しい悪寒と戦慄に見舞われる。しかしながら原虫の新たな赤血球への侵入が完了する 1-2 時間後には再び正常な状態に戻り、患者は日常生活を送ることが可能になる。我々は、この特徴的な現象が人為的に一過性の溶血を起こさせることで再現できる事を見出し、短時間で分解される赤血球由来の因子が特徴的なマラリア発熱のメディエーターであると考えた。そしてマラリア感染において血中 ATP 値が極めて高濃度に上昇することを見出した。

< 赤血球からの ATP 放出をブロックすると非特異的 T 細胞応答が消失する >

細胞外 ATP の主な供給源は赤血球であり、赤血球は変形や pH、酸素分圧などの物理的・化学的刺激に応じて細胞外に ATP を分泌する。T 細胞表面には ATP やその代謝産物に対するレセプター（P2 レセプター）を発現している。マラリア感染マウスの血中に放出される細胞外 ATP（もしくはその代謝産物）がマラリア病原体非特異的 T 細胞応答を引き起こす原因物質であるという仮説を立て、ATP 放出チャネル Pannexin-1 の阻害剤 Carbenoxolone (CBX) でマラリア感染に伴う ATP 放出をブロックすると、予想通り原虫非特異的 T 細胞応答が著しく減弱することを見出した。

## 2. 研究の目的

上記の結果を踏まえ、本申請ではマラリア感染を元に、細胞外に放出された ATP もしくはその代謝産物による宿主 T 細胞応答をかく乱する分子メカニズムを解明することを本申請の目的とする。T 細胞表面には ecto ATPase である CD39, CD73 を発現しており、ATP は速やかに ATP → ADP → AMP → アデノシンと分解される。そのヌクレオチド・ヌクレオシドにはそれぞれに対応する P2 レセプター、P1 レセプターがある。本申請では ATP またはその代謝産物がどのような分子メカニズムによって非特異的 T 細胞応答に関与するのかについて明らかにすることを目的として研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### a. マラリア感染マウスにおける ATP 放出の分子メカニズム

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* XAT (PbXAT)、*P. yoelii* 17XNL (PyNL) を C57BL/6 マウスに感染させ、同時に ATP 放出チャネル Pannexin-1 のインヒビター Carbenoxolone (CBX) を投与して、血中 ATP 値の推移を解析した。

### b. マラリア感染マウスにおける非特異的免疫応答のインパクト

まず、マラリア感染マウスにおける非特異的免疫応答の影響がどれほどの範囲にまで及んでいるのかについて検討を加える目的で、他感染症に対する感染抵抗性への影響を追究する目的でリステリア菌、アレルギー応答に対する影響を追究する目的で DNFB 誘導接触性皮膚炎 (CHS)、自己免疫疾患に対する影響を追究する目的で、MOG 誘導実験的脳脊髄炎 (EAE) を用いた。すなわち ネズミマラリア原虫 PbXAT、PyNL を C57BL/6 マウスに感染させ、同時に致死量または致死量以下のリステリア菌 (*Listeria monocytogenes* EGD) を摂取した時の、マラリア感染マウスのリステリア抵抗性を検討した。ネズミマラリア原虫を C57BL/6 マウスに感染させ、同時に DNFB を腹部に塗布することで感作し、5 日後に耳に DNFB を塗布した時の耳介の腫脹により CHS 症状を評価した。ネズミマラリア原虫を C57BL/6 マウスに感染させ、同時に MOG ペプチドをアジュバントと混和して免疫し、尾部のテンションや下肢、上肢の動作や神経症状などにより EAE 症状を評価した。

### c. マラリア感染マウスにおける非特異的免疫応答に ATP が関与するか

マラリア感染マウスに ATP 放出を阻害する CBX または ATP の P2 レセプターへの作用を阻害する Suramin を投与し、DNFB 誘導 CHS に対する影響により、ATP による非特異的免疫応答の誘導について検討を加えた。

#### d. どの P2 レセプターを介してマラリア非特異的免疫応答が起こるのか

C57BL/6 マウス脾細胞を採取し、この細胞を培養するときに ATP を添加すると同時に、各種 P2 レセプター阻害剤を同時に添加して培養した。培養から 12 時間後と 24 時間後の培養上清を回収し、培養上清中の IL-2 と IFN- $\gamma$ 濃度を ELISA 法にて測定した。

### 4 . 研究成果

#### a. マラリア感染マウスにおける ATP 放出の分子メカニズム

マラリア感染マウスに CBX を投与すると、CBX 非投与群と比較して血中 ATP 濃度が有意に低値を示した。マラリア感染のみ (CBX 非投与) の群では抗 CD3 抗体刺激後の T 細胞からのサイトカイン (IL2, IFN- $\gamma$ , IL-6) 生産がマラリア非感染群と比較して有意に低値を示し、増殖能も低下するが、マラリア感染マウスに CBX を投与することで、そのサイトカイン生産も増殖能も若干の回復を認めた。このマラリア感染マウスにおける CBX 投与の T 細胞応答に対する効果は、マラリア抗原と無関係な抗原に特異的な (マラリア抗原非特異的な) TCR を保有する TCR トランスジェニックマウス (OT-II マウス) においても同様の効果が認められた。以上の結果からマラリア感染に伴ったユニークな T 細胞応答は、細胞外へ放出される ATP がその一端を担っていることが明らかとなった。

#### b. マラリア感染マウスにおける非特異的免疫応答のインパクト

まず、マラリア感染マウスに致死量以下のリステリア菌を投与した実験では、マラリア非感染マウスでは全頭リステリア感染を耐過したのと比べて、マラリア感染マウスでは逆に全頭が死亡した。次にリステリア感染マウスの脾臓及び肝臓における菌数を測定したところ、マラリア感染マウスでは非感染マウスよりも臓器中のリステリア菌数が有意に多数の菌数を認めた。また脾細胞を採取し、リステリア死菌と共培養した時の T 細胞からのサイトカインを測定したところ、マラリア感染マウスにおいて非感染マウスと比較して IL-2、IFN- $\gamma$ などが有意に低下していた。

DNFB 誘導 CHS マウスにマラリアを感染させた場合における皮膚炎症状の変化を解析したところ、非感染マウスと比較して耳介の腫脹が有意に低値を示した。CHS マウスから頸部リンパ節を採取し、DNBS で刺激後に CHS 症状の発現に重要なサイトカインを測定したところ、すべてのサイトカインにおいてマラリア感染マウスでは低値を示した。

MOG 誘導 EAE においてマラリア感染マウスでは、非感染マウスと比べて、EAE 症状の発現のタイミングはほぼ同時期であったが、その症状の重症度は有意に低値を示した。鼠径リンパ節を採取して MOG 刺激後のサイトカインを測定したところ、症状の発現に重要なサイトカインはマラリア感染マウスにおいてすべて有意に低値をしめした。

以上の結果から、マラリアが感染することで、宿主の免疫応答が非特異的に抑制されることを見出した。

#### c. マラリア感染マウスにおける非特異的免疫応答に ATP が関与するか

CHS マウスにマラリアを感染させると同時に CBX または Suramin を投与することで、CHS 症状の変化を検討した。マラリア非感染マウスでは CBX 投与でも Suramin 投与でも CHS 症状に変化を認めなかった。次に、マラリア感染マウスでは CHS 症状が軽快化するが、マラリア感染と同時に CBX を投与することで CHS 症状が増悪化した。一方、Suramin 投与による CHS 症状の変化はなく、マラリア感染マウス薬剤非投与群と同程度の症状を認めた。以上の結果から、マラリ

ア感染マウスにおける非特異的免疫抑制には ATP が関与しているが、ATP が正の作用と負の作用を同時に保有していることが疑われた。

d. どの P2 レセプターを介してマラリア非特異的免疫応答が起こるのか

C57BL/6 マウス脾細胞に ATP と各種 P2 レセプター阻害剤を同時に添加して、抗 CD3 抗体の存在下で培養したところ、どの阻害剤を用いても、サイトカイン濃度に有意な差を認めなかった。

以上の結果から、マラリア免疫抑制には ATP の関与が強く示唆されるが、ATP の直接的な作用と言うよりは、その代謝産物が関与していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Suppression of Obesity by an Intestinal Helminth through Interactions with Intestinal Microbiota.

Shimokawa C, Obi S, Shibata M, Ochia A, Imai T, Suzue K, Hisaeda H.

Infect Immun. 2019 May 21;87(6). pii: e00042-19. doi: 10.1128/IAI.00042-19. Print 2019 Jun.

*Plasmodium berghei* ANKA causes intestinal malaria associated with dysbiosis.

Taniguchi T, Miyauchi E, Nakamura S, Hirai M, Suzue K, Imai T, Nomura T, Handa T, Okada H, Shimokawa C, Onishi R, Ochia A, Hirata J, Tomita H, Ohno H, Horii T, Hisaeda H.

Sci Rep. 2015 Oct 27;5:15699. doi: 10.1038/srep15699.

A transient resistance to blood-stage malaria in interferon-  $\gamma$ -deficient mice through impaired production of the host cells preferred by malaria parasites.

Okada H, Suzue K, Imai T, Taniguchi T, Shimokawa C, Onishi R, Hirata J, Hisaeda H.

Front Microbiol. 2015 Jun 17;6:600. doi: 10.3389/fmicb.2015.00600. eCollection 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

Pathogen non-specific bystander T cells were attenuated upon infection with malaria parasites

Kazutomo Suzue, Hiroo Amano, Tomoyo Taniguchi, Chikako Shimokawa, Alex Ochia, Risa Onishi, Hajime Hisaeda.

International congress of Immunology 2016

マラリア感染宿主における皮膚炎症状軽快化の分子メカニズム

The course of contact hypersensitivity was ameliorated upon infection with *Plasmodium berghei*.

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

第 85 回日本寄生虫学会総会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。