

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02649

研究課題名（和文）内臓型リーシュマニア症の免疫病態

研究課題名（英文）Immunopathology of visceral leishmaniasis

研究代表者

後藤 康之（GOTO, Yasuyuki）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：50553434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：内臓型リーシュマニア症（VL）はリーシュマニア原虫の感染により引き起こされる人獣共通感染症である。本研究では、ヒトVL患者と同様に貧血や肝脾腫を引き起こすマウス感染モデルを用いて、これら病態に影響する免疫応答を明らかにすることを目的とした。貧血については、原虫の感染がマクロファージの抑制性因子SIRPの発現を変化させ、血球貪食を誘導することが明らかとなった。この赤血球貪食は原虫数の増加に寄与することから、原虫が宿主分子を制御することで自身の生存に有利な環境を作り出していることが示唆される。また、この貧血や脾腫に宿主炎症性因子MRP14が関与することも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VLはヒトやイヌに重篤な症状をもたらす、年間20-40万人の患者と2万人もの死者を出している。本症の化学療法は効果、副作用、治療期間、価格、薬剤耐性株の出現などの問題点を抱えるため、新規の治療法が望まれている。本研究では、本来は我々の体をまもる免疫が症状の原因となる「免疫病態」の解明を目指し、宿主因子であるSIRPやMRP14の関与を明らかにしてきた。このように、原虫の生存や病態に関わる免疫機構を明らかにしたことは、それを標的とした免疫療法の確立をつながることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonosis caused by infection with the protozoan Leishmania species. In this study, we used a mouse model that reproduce symptoms in human VL patients including anemia and hepatosplenomegaly, to clarify the immune responses that affect these conditions. For anemia, we found that Leishmania infection altered the expression of SIRP by macrophages and induced hemophagocytosis. This hemophagocytosis contributes to the increase in the number of Leishmania parasites inside the macrophages, suggesting that the parasites create an environment favorable for their own survival by controlling host molecules. We also found that the host inflammatory factor MRP14 is involved in this anemia and splenomegaly.

研究分野：免疫寄生虫学

キーワード：リーシュマニア 免疫病態 貧血 脾腫 肝腫 SIRP MRP14

1. 研究開始当初の背景

内臓型リーシュマニア症 (VL) はリーシュマニア原虫の感染により引き起こされる人獣共通感染症で、ヒトやイヌに重篤な症状をもたらし、年間 20-40 万人の患者と 2 万人もの死者を出している。本症の化学療法は、効果、副作用、治療期間、価格、薬剤耐性株の出現などの問題点を抱える。免疫療法は、宿主免疫を適切に調節することで効果を発揮するため、薬剤耐性などの問題もなく、新たな VL の治療法として期待される。一方、発熱、貧血、肝脾腫といった VL の症状が免疫応答に起因することから、不適切な免疫刺激が逆効果をもたらすことも予想される。つまり、VL に対する効果的な免疫療法の確立にはその感染・発症機序を詳細にとらえる必要がある。

我々は実験動物モデルの確立を通して、VL の免疫病態に関する研究を行っている。例えば、VL における貧血は中度ないし重度の貧血に分類され (Goto et al., Parasitol Res, 2017) VL 患者に頻繁にみられる倦怠感や蒼白、食欲減退やそれに伴う消瘦など様々な症状の原因となっている。VL における貧血の原因はこれまで症例報告からの推察のみに頼っていたが (図 1) 我々は世界で初めて貧血を呈するマウス VL モデルの開発に成功した (Morimoto et al., PLoS NTDs, 2016)。これらマウスの脾臓では、原虫に感染したマクロファージ (Mφ) による赤血球貪食が観察され、貧血の主たる原因であると推察された。

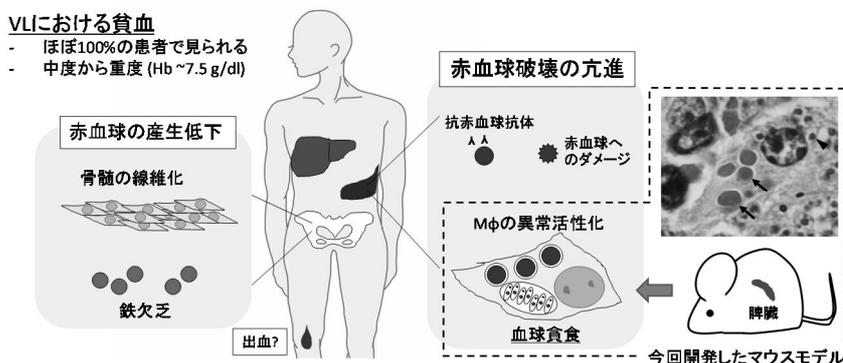


図1. VLにおける貧血の機序
臨床報告から推察される機序として、骨髄の線維化や鉄欠乏による骨髄での赤血球産生低下、出血による血液喪失、自己抗体や酸化ストレスなどによる赤血球破壊亢進、Mφによる血球貪食などがある。我々が開発したマウスモデルでは、ヒト患者と同程度の貧血を呈するが、血球貪食のみが見られ、これが貧血の主たる原因だと推察される。写真：マウス脾臓中の血球貪食Mφ。矢印は貪食された赤血球、矢頭は原虫を示す。

脾腫・肝腫についても、その病態形成機序には不明な点が多い。前述のマウスモデルを用いた解析の結果、腫大した脾臓では T 細胞の割合が減る一方、B 細胞の割合が増加すること (図 2) 感染マウス血中では免疫グロブリン量が大きく上昇することから、B 細胞活性化が脾腫に関与すると考えられた。すでに我々は、VL 患者血中において IgG 濃度の顕著な上昇、ならびに B 細胞活性化に関わる B-cell activating factor (BAFF) の濃度上昇を明らかにしており (Goto et al., AJTMH, 2014) 臨床においても実験モデル同様に B 細胞の活性化が起きていることを示してきた。そこで、「BAFF を介した B 細胞活性化が脾腫を引き起こす」という仮説を立て、東京大学・藤井博士とともに BAFF-KO マウスを作製して感染を行ったところ、KO マウスでは脾腫が有意に抑えられ、組織内では B 細胞の増加が著しく抑えられていることが明らかとなった (Omachi et al., BBRC, 2017)。これらの結果は、前述の貧血とは逆に、臨床材料から得られた病態関連候補分子の関与を実験動物モデルで証明した好例である。興味深いことに、感染 BAFF-KO マウスでの肝腫は野生型と同等であり、脾腫と肝腫が異なる機序で起きることも本研究を通して初めて明らかになった。しかし、貧血や脾腫については、免疫療法を確立するためにも関連因子をより詳細に解明する必要がある。また、白血球・血小板減少、肝腫については、その機序について手がかりも得られていない。

2. 研究の目的

本研究では、症状の改善を促す免疫療法の開発を目指す基盤とするため、発生工学を駆使したマウスモデルを駆使して VL における病態免疫を明らかにすることを目指した。上述の通り、我々は VL が感染から発症までに数カ月から数年を要することにヒントを得て、長期感染モデルの確立を行い、貧血を呈するマウスモデルの作製に成功した (Morimoto et al., PLoS NTDs, 2016)。そこで発見した赤血球貪食という現象がヒト脾臓においても高頻度で起こっていることを明らかにしたとき、マウスモデルの重要性・優位性について再認識した。そこで、遺伝子組換えマウスを含めた各種マウスに感染を行い、経時的に各種臓器の解析を網羅的に行うことで、VL の症状に関わる免疫機構を明らかにすることを目的とした。VL の典型的な症状として、貧血、白血球減少、血小板減少、脾腫、肝腫などがあげられる。原虫感染時には臓器ごとの免疫反応が異なり、その違いが病態形成機構の違いに関わっていると考えられる。そのため、症状ごとの病態免疫を解明することが目指すものとなる。

3. 研究の方法

本研究ではマウスを用いた感染実験が中心となる。そのため、実験において特定の症状だけを解析することはなく、常に全ての症状を並行して解析した。ただし、以下の各研究項目では、焦点が分かりやすいよう解析の中心となる病態についてのみ記載してある。

【貧血】T細胞の関与についての解析

赤血球貪食の亢進にT細胞が関与するか明らかにするため、nudeマウスなどにおける症状の解析を行った。

【貧血】赤血球貪食亢進に関わる分子の同定

感染マウス脾臓中にみられる赤血球貪食細胞は、非感染脾臓には見られない多核巨細胞であるため、これら細胞について血球貪食に関わる因子(Siglec、SIRPαなど)の発現解析を行った。さらに血球貪食のin vitroモデルを構築して、Mφの巨細胞化や赤血球貪食亢進の詳細な機序解析を行った。同時に、血球貪食の主たる場である感染マウス脾臓のトランスクリプトーム解析を行った。

【脾腫】感染によるBAFF産生亢進の機序解明

感染マウスにおける主なBAFF産生組織は脾臓であったため、脾臓におけるBAFF産生細胞の同定を試みた。BAFF産生細胞として、Mφや樹状細胞、T細胞が知られており、BAFF発現細胞におけるCD11b、CD11cやCD3の発現について解析を行った。加えて、BAFF産生を誘導する原虫因子の同定を試みた。MφによるBAFFの分泌を促進する因子として、LPSやペプチドグリカンといった病原体由来分子といった報告がある。そこで、原虫成分の分画化を行い、in vitroでMφや樹状細胞に原虫成分を加えて培養上清中のBAFF濃度を測定することで、活性因子の同定を試みた。

【全病態】トランスクリプトーム解析による病態関連因子の探索

これまでの知見から、脾腫と肝腫では病態形成に関与する免疫が異なることが示唆されている。そこで、感染脾臓・肝臓のトランスクリプトーム比較解析を行うことにより、臓器特異的な変化を示す遺伝子の絞り込みを行い、qPCR等による検証を行った。

4. 研究成果

3年間の研究において、VLの病態メカニズムに関する新たな知見が得られた。その中でも特に顕著な成果が得られた赤血球貪食のメカニズムとその意義について記載する。加えて、内因性TLRリガンドとして知られるMRP14が病態形成に役割についても紹介する。

【原虫感染が引き起こす赤血球貪食のメカニズムとその意義】

上述の通り、我々はリーシュマニア原虫感染により貧血を呈するマウスモデルを世界に先駆けて作成して(Morimoto et al., PLoS NTDs, 2016)、そのモデルを用いて原虫感染による赤血球貪食の亢進を明らかにしてきた。しかしながら、原虫に感染したMφがどのようにして赤血球貪食能を得るのか、そして原虫感染により誘導された赤血球貪食が原虫の生育にどのような影響を与えるのかについては不明であった。そこで、感染マウスで見られる赤血球貪食をin vitroで原虫感染Mφにより再現することに取り組んだ。培養Mφに正常マウス由来の赤血球を加えたところ、非感染のMφでは赤血球の貪食がおこらないのに対して、原虫感染させることでMφによる赤血球貪食を誘導することができた(図2A)。このことは、原虫感染による赤血球貪食の亢進は感染によって赤血球に生じた異常によるものではなく、Mφに生じた異常であることを示唆している。

Mφは本来の機能として老化赤血球を貪食するが、逆に正常な赤血球の貪食は抑制されている。このしくみの一つとして、Mφの細胞膜上に発現するSIRPαが赤血球表面のCD47を認識することによって生じる貪食抑制シグナルが知られている。そこで、in vitroにおいて原虫感染したMφにおけるSIRPαの発現を解析したところ、非感染Mφより低下することが分かりました(図2B)。次に、in vivoにおいて赤血球貪食が亢進している脾臓の感染MφによるSIRPαの発現を解析したところ、in vitroの結果と同様にSIRPαの発現低下が見られた。これらの結果は、感染MφではSIRPαの発現が低下することにより貪食抑制シグナルが弱くなり、赤血球を自己細胞と認識する機構が破綻することを示唆している。

このようにリーシュマニア原虫は感染したMφによる自己細胞認識を改変することが明らかとなったが、原虫自身に対してどういう影響をもたらすのかという疑問は残る。感染Mφによる赤血球貪食が内部にいる原虫の生育に与える影響を調べるために、感染Mφに赤血球を貪食させた際の原虫数について解析した。すると、赤血球を添加したMφ内では、無添加のMφ内に比べて感染後の原虫数が高く(図2C)、感染Mφによる赤血球貪食は細胞内原虫の生存に有利な影響を与えることが明らかとなった。感染マウスの脾臓においても赤血球貪食細胞では多数の原虫が観察されるが、これらの結果は生体内においても原虫感染によるMφの赤血球貪食亢進が原虫自身に有利に働いていることを示唆している(図2D)。赤血球貪食細胞内で原虫が生存しやすくなる機構については、赤血球を貪食することにより生じた抗酸化物質により細胞内の酸化ストレスが低減されて原虫の排除が阻害される、あるいは赤血球分解後に生ずる物質を原虫が生存に利用しているなどの理由が考えられる。まだ不明な点が多いので、今後の研究により明らかにしていく必要がある。また、どのような機構でSIRPαの発現が低下するかも、まだ不明な点が多い。少なくとも転写レベルでは非感染・感染間で差が見られないことから、プロテアーゼによる切断などで制御されている可能性が高い。今後はこの分子機構を明らかにしていく。

なお、この成果については東京大学農学部 HP にも紹介している。

https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/topics_20191120-1.html

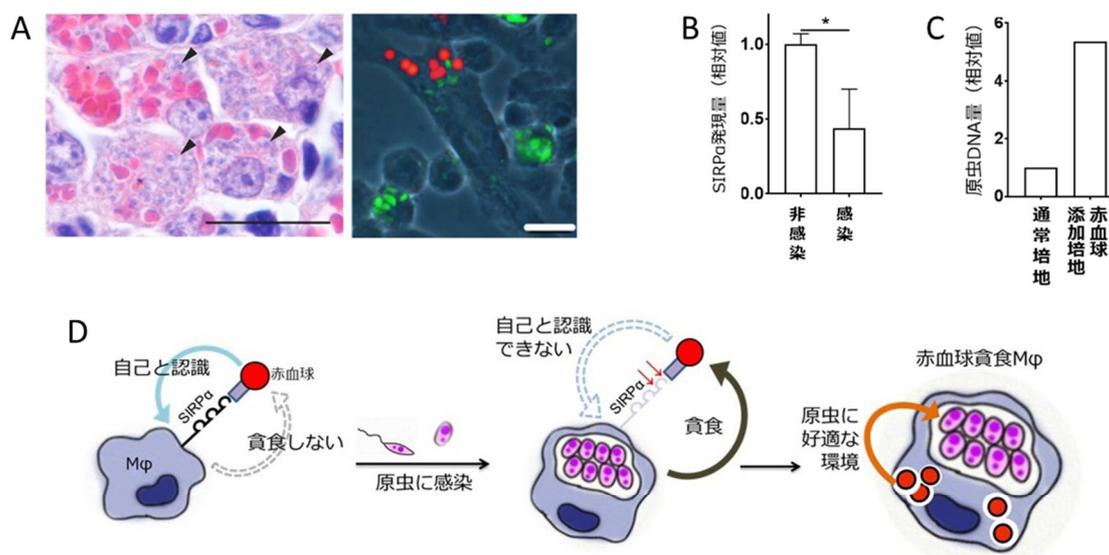


図2. 原虫に感染したマクロファージが自己赤血球を貪食する機構と意義. (A)リーシュマニア原虫感染によるMφの赤血球貪食亢進。左:原虫感染マウス脾臓で観察される赤血球貪食Mφ。右:invitroでMφに原虫(緑色)を感染させることで赤血球(赤色)の貪食誘導を再現。(B) 原虫感染により低下したMφのSIRPα発現量。(C) Mφ内リーシュマニア原虫の発育を支える赤血球貪食。赤血球存在下で培養したMφ内の原虫数は非添加群と比較して高い値を示す。(D)リーシュマニア原虫感染がもたらすMφによる赤血球貪食の概念図。

【MRP14 が肝脾腫に果たす役割】

MRP14 は S100 ファミリーに属し、好中球の細胞質タンパク質としては最も豊富なものの一つであり、また単球にも高く発現するタンパク質である。炎症性マクロファージにも発現することが知られており、関節リウマチなどの炎症性疾患では患部に MRP14 陽性細胞の集簇が見られるとともに、血中 MRP14 の上昇がみられることから、病態との関係が示唆されてきた。例えば、我々は MRP14 がマラリアで見られる肝障害が増悪させることを明らかにしてきた (Mizobuchi H et al., PLoS ONE, 2018)。リーシュマニア原虫感染時には感染部位にマクロファージが多くみられるため、感染における MRP14 の関与が示唆される。そこで、皮膚型リーシュマニア症 (CL) を引き起こす *Leishmania major* と、VL を引き起こす *L. donovani* を用いて、MRP14 の欠損が病態に与える影響を解析した。

CL モデルにおいては、MRP14-KO マウスは WT マウスと比較して皮膚病変の増悪が見られた。これは、MRP14 が CL の病態を抑える働きを持っていることを示している。一方で、所属リンパ節内の原虫数には有意な差が認められないことから、MRP14 依存的な病態の抑制に原虫数の制御は関与していないと考えられる。それに対して、VL における MRP14 の役割は大きく異なり、むしろ病態の悪化につながっていることが示唆された。VL で見られる主な症状のうち、貧血、白血球減少、脾腫については MRP14-KO マウスでは症状が見られなかった。このことは、CL と VL、脾臓・肝臓といった環境の違いが本分子の活動に影響を与えることを示唆している。

上記 2 つの他にも、肝腫に類洞の変化が関与していることなど、新しい知見がとれている。肝腫に関しては、感染により肝臓特異的に上昇する遺伝子群の同定をしている。その中には、これまでに肝臓で発現していることが知られていなかった遺伝子などもあり、それらが上記の「類洞の変化を伴う肝腫」の発症メカニズムに関与しているか現在進行形で解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Goto Yasuyuki, Kuroki Akihiro, Suzuki Kengo, Yamagishi Junya	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of <i>Leishmania tarentolae</i> Parrot Tar II, Obtained by Single-Molecule Real-Time Sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00050-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00050-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishizuka Kanna, Fujii Wataru, Azuma Natsuho, Mizobuchi Haruka, Morimoto Ayako, Sanjoba Chizu, Matsumoto Yoshitsugu, Goto Yasuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Pathological roles of MRP14 in anemia and splenomegaly during experimental visceral leishmaniasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0008020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0008020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Azuma Natsuho, Omachi Satoko, Hanazawa Wakana, Morimoto Ayako, Sanjoba Chizu, Matsumoto Yoshitsugu, Fujii Wataru, Goto Yasuyuki	4. 巻 74
2. 論文標題 Variable dependency on BAFF in IgG antibody production during <i>Leishmania</i> infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 101997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2019.101997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Musa Md. Abu, Nakamura Risa, Hena Asma, Varikuti Sanjay, Nakhasi Hira L., Goto Yasuyuki, Satoskar Abhay R., Hamano Shinjiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Lymphocytes influence <i>Leishmania</i> major pathogenesis in a strain-dependent manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0007865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0007865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Morimoto Ayako, Uchida Kazuyuki, Chambers James K., Sato Kai, Hong Jing, Sanjoba Chizu, Matsumoto Yoshitsugu, Yamagishi Junya, Goto Yasuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Hemophagocytosis induced by Leishmania donovani?infection is beneficial to parasite survival within macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0007816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0007816	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Duthie Malcolm S, Goto Yasuyuki, Ghosh Prakash, Mondal Dinesh	4. 巻 77
2. 論文標題 Impact of sequelae of visceral leishmaniasis and their contribution to ongoing transmission of Leishmania donovani	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 ftz057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femspd/ftz057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yasuyuki Goto
2. 発表標題 Current approaches to the development of a vaccine against CL
3. 学会等名 Cutaneous leishmaniasis webinar: Knowledge gaps and challenges in managing patients suffering from CL (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuyuki Goto
2. 発表標題 Immunology and Immunopathology of Leishmaniasis
3. 学会等名 Amgen Scholars Summer Science Series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Goto Y
2. 発表標題 Antigen mining for the development of diagnostic tests in parasitic infections.
3. 学会等名 1st International Forum on Collaborative Researches in Parasitic Diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Goto Y
2. 発表標題 Immunopathology of experimental visceral leishmaniasis
3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP): 21st International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Morimoto A, Uchida K, Chambers JK, Sato K, Hong J, Sanjoba C, Matsumoto Y, Yamagishi J, Goto Y
2. 発表標題 Hemophagocytosis induced by Leishmania donovani infection is beneficial to parasite survival within macrophages
3. 学会等名 第13回寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤康之
2. 発表標題 内臓型リーシュマニア症の免疫病態
3. 学会等名 第27回分子寄生虫学ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Goto
2. 発表標題 Immunopathology of experimental visceral leishmaniasis
3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP): 21st International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Omachi S, Fujii W, Azuma N, Hanazawa W, Morimoto A, Sanjoba C, Matsumoto Y, Goto Y
2. 発表標題 The role of BAFF in antibody production and pathology during experimental visceral leishmaniasis
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (ICOPA) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 花澤 若奈、東 夏帆、森本 彩子、三條場 千寿、松本 芳嗣、後藤 康之
2. 発表標題 Interaction between Leishmania parasites and host IgG during infection with <i>L. donovani</i>
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本 彩子、山岸 潤也、藤井 渉、内田 和幸、チェンバース ジェームス、三條場 千寿、松本 芳嗣、後藤 康之
2. 発表標題 Molecular mechanism and biological function of hemophagocytosis during <i>Leishmania donovani</i> infectio
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石塚 幹菜、溝淵 悠代、藤井 渉、東 夏帆、森本 彩子、三條場 千寿、松本 芳嗣、後藤 康之
2. 発表標題 Pathological involvement of MRP14 varies between the infections of Leishmania major and Leishmania donovani
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuyuki Goto
2. 発表標題 Immunopathology of visceral leishmaniasis
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 後藤康之
2. 発表標題 原虫感染におけるMRP14/S100A9の役割
3. 学会等名 第27回内毒素・LPS研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用免疫学研究室HP
<http://www.vn.a.u-tokyo.ac.jp/immune/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤井 渉 (FUJII Wataru) (40708161)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教 (12601)	
研究分担者	山岸 潤也 (YAMAGISHI Junya) (80535328)	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Infectious Disease Research Institute			
バングラデシュ	icddr,b			
ブラジル	Fiocruz			