

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460512

研究課題名(和文)赤血球型マラリア感染における免疫応答の場の可視化

研究課題名(英文)Visualization of immune responses against merozoites malaria infection

研究代表者

岸本 英博(KISHIMOTO, Hidehiro)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80251213

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)：本研究は、赤血球型マラリアの感染防御に対する免疫応答において、T細胞の初期応答と免疫記憶の確立に関して、刺激によりIFN $\gamma$ を産生する細胞が蛍光タンパク質を発現するIFN $\gamma$ -VENUSトランスジェニックマウスを用いて可視化し、赤血球型マラリア感染時にいつどこでT細胞の免疫応答が強く起きるか？どこで記憶T細胞は維持されるかの解析を行った。その結果、感染後7日までに脾臓においてT細胞が強く応答し、その後リンパ節などに移動することが判明した。60日以降における解析で記憶T細胞は主に脾臓に存在していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated two questions; first, where dose immune-responses against to erythroid type malaria infection occur. Second, where established memory T cells specific for the erythroid type malaria are maintained. To visualize above questions, IFN $\gamma$ -VENUS transgenic mice were infected with erythroid type malaria and analysed at various time points. Within 7 days, strong T cell response to erythroid type malaria is observed in the spleen whereas there is little immune responses found in other tissue i.e. lymphnodes, bonemarrow, liver. More than 60 days after infection, IFN $\gamma$ -VENUS positive T cells are found in the spleen. These results indicated that the main tissue, in which immune-responses against to erythroid type malaria infection occur, revealed the spleen.

研究分野：免疫学

キーワード：マラリア感染防御 免疫応答 T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) マラリアワクチン開発の現状:マラリアは、亜熱帯・熱帯地域において1年に100万人以上の死者を出す3大感染症の一つである。そのためマラリア感染に対するワクチン開発は、古くから多くの研究者によって試みられてきているが、決定的なワクチンの開発には至っていない。動物実験においてマラリアワクチン開発や免疫応答惹起のターゲットは、比較的手に入り易い赤血球型マラリア(メロゾイト)が赤血球に侵入する分子をターゲットにした研究から始まり、ハマダラ蚊から侵入する肝臓型のスポロゾイト由来のものにターゲットが移行しつつある。最近では米国製薬会社サナリアがスポロゾイトを不活したワクチンが米国のNIH主導のもとで臨床研究が行われ、50%以上の感染防御効果があるという報告が出ている(引用文献①)。また、日本でも大阪大学微生物研究所の研究チームによるメロゾイトの膜表面分子の組み替え改良タンパク質によるワクチンが良い発症防御効果を上げたという報告が出ている(引用文献②)。

(2) 免疫学的記憶の確立とマラリア感染:記憶T細胞への分化について免疫学の教科書では、ナイーブT細胞が抗原を認識し、活性化・増殖(Expansion)し、エフェクターT細胞に分化する。その後、活性化したエフェクターT細胞のほとんどはアポトーシスを起こし死滅してしまう(Contraction)。その中で、ごく一部のT細胞が生き残り記憶T細胞に分化する。しかし、抗原刺激を受け活性化・増殖したT細胞が、どこで記憶T細胞に分化し、生存・維持されているかについては明らかになっていない。また、ウイルスや細菌感染のように皮膚や粘膜から侵入し免疫応答を起こす場合と異なり、マラリア感染は直接、血管から血液中に侵入するため、所属リンパ節が存在しない。したがって、マラリア感染においての重要な免疫応答に関わる“場”、すなわちT細胞

が活性化・増殖する組織を可視化した研究は殆どない。スポロゾイトやメロゾイトを利用した感染実験やワクチン研究では、ワクチン効果による再感染に対する予防効果を認めている事から、免疫記憶の確立が認められる。

## 2. 研究の目的

本研究は、赤血球型マラリア(メロゾイト)の感染防御に対する免疫応答において、未だにその役割がはっきりしていないT細胞の初期応答と免疫記憶の確立を生体内で可視化する事を目的としている。赤血球型マラリアであるメロゾイトに対するT細胞の応答が、いつ、どこで免疫応答を起こしているのか?

どこで記憶T細胞は生存・維持されるのか?を明らかにし、効果的なマラリアワクチンの投与方法(場所)や時期・回数などの基礎知識を得る事が重要であると考えます。

## 3. 研究の方法

使用するIFN $\gamma$ -VENUS-BAC Tgマウスは、IFN $\gamma$ を産生する細胞が蛍光を発するように設計されている。免疫応答においてIFN $\gamma$ を産生する細胞は、T細胞、NK細胞、NKT細胞のリンパ球系の免疫細胞のみならず、マクロファージや樹上細胞(DC)などの抗原提示を行う細胞も産生する事から、抗原を認識し活性化したT細胞に加えて、抗原を提示する細胞や自然免疫に関わる免疫系の細胞も可視化(トレース)する事が可能である。

赤血球型マラリアをマウスに感染させ、IFN $\gamma$ の発現を経時的に組織ごとに解析する。

(1) マウスマラリア(メロゾイト)感染実験:マウスマラリア原虫非致死株 Ryoeli17XNLの赤血球型をネズミの腹腔内に非麻酔下で接種する。マウスマラリア原虫はヒトへの感染はなく、動物への感染は血直接種のみ可能であり、飼育中での他動物への感染はみられない。感染させたマウス

を d1、4、7、14 と d60 以降で脾臓、リンパ節、肺、肝臓を分離する。

(2) マウス免疫臓器からの細胞分離: 正常及びマウスマラリア原虫感染マウスより麻酔下で免疫担当臓器(肝臓、脾臓、リンパ節、胸腺、骨髄等)及び血液を採取する。血液は血清を分離し解析に用いる。免疫担当臓器からの細胞分離は、目的とする細胞により種々の分離法(比重遠心法、酵素処理法、磁気カラム及びそれらの組み合わせ等)を用いる。

(3) 免疫機能の解析: 各臓器から分離した免疫担当細胞のフェノタイプをフローサイトメトリーで解析すると共に、免疫組織学的手法によりその組織構造を解析する。

#### 4. 研究成果

赤血球型マラリアをマウスに感染させ、IFN $\gamma$ の発現を蛍光タンパク質のVENUSを検出することにより、経時的に組織ごとの解析を行った。メロゾイトに感染させたマウスを1日後、4日、7日、14日後と60日以降で脾臓、リンパ節、肺、肝臓を分離した。分離した組織を免疫組織学的に解析またはフローサイトメトリーで解析し、どの細胞がIFN $\gamma$ を発現しているのか、活性化マーカ等を解析を行い、組織のどの場所に多く存在するののかも同時に解析を行った。赤血球型マラリアを感染させると、感染後7日までの感染初期からでは、IFN $\gamma$ を強く発現し、CD69陽性の活性化T細胞は脾臓に存在しており、他の組織ではほとんど認められなかった。図1は、メロゾイト感染14日後のリンパ節と脾臓におけるIFN $\gamma$ 発現をフローサイトメトリーで解析したものである。非感染マウスでのIFN $\gamma$ 発現細胞の割合は、1~8%であるのに対し(恒常的な割合)、メロゾイト感染マウスでは10~30%と増加していた。また、初期感染では、ほとんど認められなかったIFN $\gamma$ 発現細

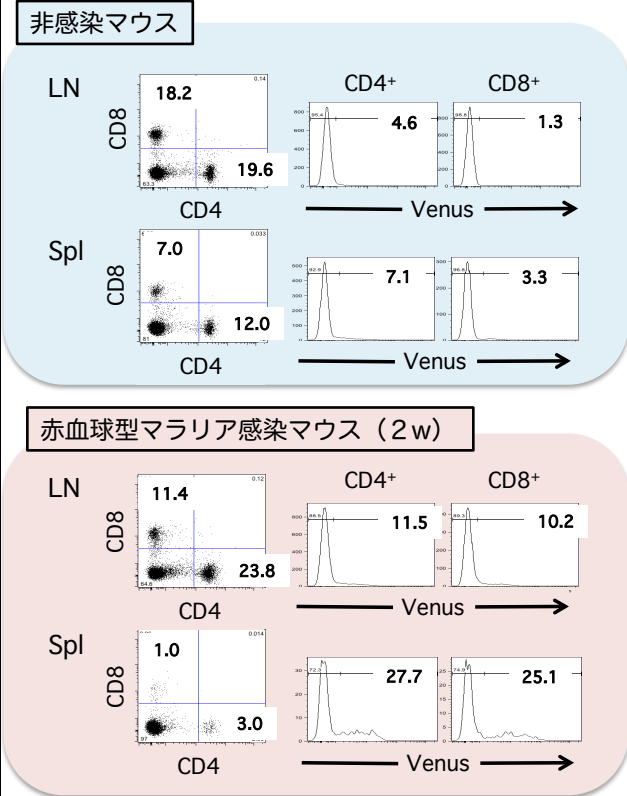


図1 IFN $\gamma$ <sup>+</sup>(Venus<sup>+</sup>)産生T細胞の非感染 vs 赤血球型マラリア感染マウスにおける分布

胞T細胞が、リンパ節でも認められた。これは、感染初期に脾臓においてメロゾイトを抗原として認識し活性化したT細胞が、他の組織に移動を開始したものと考えられる。このことは、脾臓のT細胞の割合が、非感染マウスではCD4<sup>+</sup>T細胞: 12%、CD8<sup>+</sup>T細胞: 7%であるのに対し、メロゾイト感染マウスでは、CD4<sup>+</sup>T細胞: 3%、CD8<sup>+</sup>T細胞: 1%と減少していることから明らかである。この結果から、赤血球型マラリアであるメロゾイト初期感染時において脾臓が免疫応答の主な場であることが明らかになった。

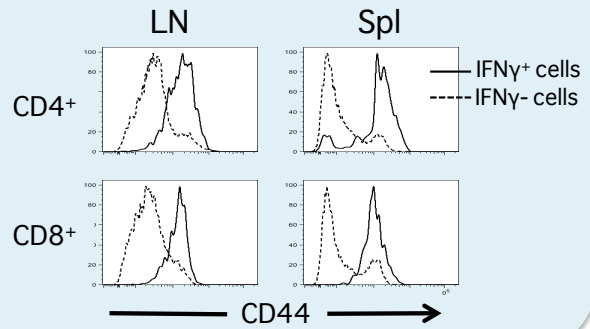
マラリア感染が終息した(マラリア原虫が駆除された)感染60日後のマウスにおいて非感染マウスの組織と比較して脾臓にのみIFN $\gamma$ 発現T細胞の割合の増加が認められた。リンパ節、骨髄、肝臓、肺においてIFN $\gamma$ 発現T細胞は存在するが、非感染マウスと比較して優位な増加は認めることができなかった。この結果より、赤血球型マラ

リアであるメロゾイトに対する記憶T細胞は、主に脾臓に存在していることが示唆された。また、感染60日後のマウスにおいて脾臓に存在するIFN $\gamma$ 発現T細胞の細胞表面抗原による解析では、CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup>の中枢性記憶細胞の表現系であった。

本研究課題の一連の感染実験から宿主側の免疫応答が最大になるとと思われる2~3週間後にIFN $\gamma$ を強く発現しているT細胞で、今までに報告されていないT細胞の亜集団が一時的に現れることを見出した。T細胞の活性化の指標となる表面抗原の中でCD44分子は、一度も抗原を認識し活性化したことのないナイーブT細胞での発現量が低~中程度、強く活性化した経験がある活性化T細胞や記憶T細胞では高発現となる分子である。図2は、メロゾイト感染21日後のリンパ節と脾臓におけるIFN $\gamma$ 発現をフローサイトメトリーで解析したものである。T細胞のIFN $\gamma$ 発現は、T細胞が活性化されないと起こらない。すなわちCD44分子の発現とIFN $\gamma$ 発現は正の相関がある。しかし、図2に示すようにメロゾイト感染21日後の脾臓のIFN $\gamma$ 発現しているT細胞の中でCD44分子の発現が低い亜集団の出現を認めた。このT細胞亜集団は、T細胞受容体からの刺激を受けることなくIFN $\gamma$ を発現したという細胞集団で今まで報告が見られない。さらに興味深いことに、この新規T細胞の亜集団はメロゾイト感染が弱い条件では、現れないことが判明した。現在、新規T細胞亜集団が、赤血球型マラリア感染に対する免疫応答においてどのような役割があるのかを探索している。

本研究課題において赤血球型マラリア（メロゾイト）の感染防御に対する免疫応答に際するT細胞の初期応答と免疫記憶維持の場どちらにおいてもリンパ節や骨髄より脾臓が重要であることが示された。

### 非感染マウス



### 赤血球型マラリア感染マウス (3w)

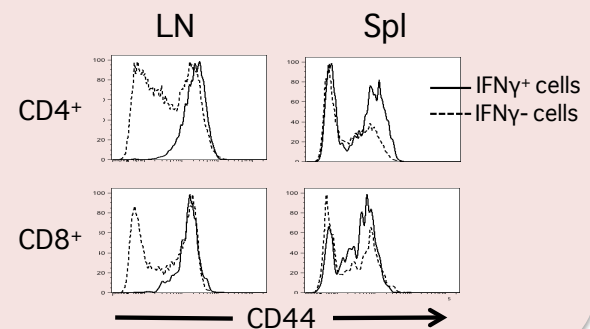


図2 IFN $\gamma$ <sup>+</sup>(Venus<sup>+</sup>)産生 vs 非産生T細胞の活性化マーカーCD44分子の発現解析

#### <引用文献>

- ① Seder RA *et al.* Protection Against Malaria by Intravenous Immunization with a Nonreplicating Sporozoite Vaccin, *Science* 341:1359-1365, 2013
- ② Yagi M *et al.* Antibody titres and boosting after natural malaria infection in BK-SE36 vaccine responders during a follow-up study in Uganda, *PLoS One* 8:e64073, 2013

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Suzuki T, Kishimoto H, Abe R. Requirement of interleukin 7 signaling for anti-tumor immune response under lymphopenic conditions in a murine lung carcinoma model. *Cancer Immunol Immunother.* 2016 Mar;65(3):341-54

② Tashiro Y, Murakami A, Goizuka R, Shimizu T, Kishimoto H, Azuma T\*. An asymmetric antibody repertoire is shaped between plasmablasts and plasma cells after secondary immunization with (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl chicken  $\gamma$ -globulin. *Int Immunol*. 2015 Dec;27(12):609-20 査読有り

③ Shibahara D, Kinjo T, Nishiyama N, Kami W, Nabeya D, Haranaga S, Higa F, Tateyama M, Shinzato T, Toma H, Kishimoto H, Fujita J. Falciparum Malaria Incidentally Pretreated with Azithromycin. *Intern Med*, 2015 54 (19) 2513-6 査読有り

〔学会発表〕 (計3件)

① 村上明一、吉田麻衣子、塚原成俊、岸本英博 人工合成VHHファージディスプレイライブラリーから高い変性耐性を有するVHHクローンの単離と解析 第39回日本分子生物学会・ポスター発表/口頭発表 2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

② Murakami A, Tsukahara N, Yoshida M, Azuma T, Nakayama H, Muraoka J, Kishimoto H. Rapid isolation of useful antibodies from semi-synthetic Alpaca VHH phage display libraries. 第89回日本生化学会大会・口頭発表 2016年9月26日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

③ Murakami A, Yoshida M, Azuma T, Nakayama H, Muraoka J, Kishimoto H. Isolation and characterization of target antigen specific VHHs from unique semi-synthetic alpaca VHH phage display libraries. 16<sup>th</sup> International congress of Immunology・ポスター発表 2016年8月

21日、メルボルン・オーストラリア

〔その他〕

ホームページ等

<http://thekishimotolab.tumblr.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 英博 (KISHIMOTO, Hidehiro)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80251213

(2) 研究分担者

李 長春 (LI, Choushun)

琉球大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20457691

(3) 連携研究者

久保 允人 (KUBO, Masato)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号：40277281

渡部 久美 (WATANABE, Hisami)

新潟大学・国際感染症教育研究センター・特任

教授

研究者番号：50143756