

平成30年 5月29日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05277

研究課題名(和文) マラリア病態を規定する防御免疫・免疫抑制のバランスに関するケニアでの調査研究

研究課題名(英文) Study on the balance between protective and regulatory immune responses that determine the pathogenesis of malaria infection in the endemic region of Kenya

研究代表者

由井 克之 (YUI, Katsuyuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：90274638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア流行地では、感染の繰り返しにより感染防御応答と抑制性免疫応答のバランスを獲得し、発症を抑制する免疫を獲得すると考えられるが、防御・免疫抑制間バランスの実態は十分に解明されていない。マラリア高度流行地のケニア・ピタ地区において、T細胞応答に焦点を当て、無症状の学童136名(顕微鏡的に33%に熱帯熱マラリア原虫感染陽性)の免疫応答について調査した。顕微鏡的マラリア陽性と陰性の2群に分けると、陽性者でT細胞応答は低下傾向にあり、個人による質的違いも大きかった。マラリア流行地の無症状児童において、顕微鏡レベルの熱帯熱マラリア原虫感染が宿主免疫系を修飾することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Individuals living in malaria endemic areas become clinically immune after multiple re-infections over time and remain infected without apparent symptoms. However, it is unclear how such a balanced status of the infection and immunity is maintained. We conducted a cross-sectional study of the immune responses in asymptomatic school children living in an endemic region of Plasmodium falciparum infections in Kenya. The production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells in response to P. falciparum crude antigens exhibited strong heterogeneity among children. In addition, production of IL-2 in response to T-cell receptor stimulation was reduced in children with positive as compared to negative P. falciparum findings. These data suggest that T cell immune responses are generally suppressed among asymptomatic infected children living in the endemic region of P. falciparum,

研究分野：感染免疫学

キーワード：Malaria T cells Cytokine Africa

1. 研究開始当初の背景

マラリア流行地の住民は、長期間にわたり感染を繰り返すことにより発病抵抗性が獲得される。感染の繰り返しにより、感染防御と組織傷害の免疫バランスを獲得し、発症を抑制しつつ感染レベルをコントロールするという仮説が考えられる。またマラリア患者ではT細胞防御免疫応答の低下が報告されている。しかしながら、感染制御機構の本体や、防御・抑制免疫バランスの実態は十分に解明されていない。

我々は、マウスモデルを用いた基礎研究において、赤内型マラリアではCD4⁺ T細胞の機能が修飾されること、特にマラリア原虫特異的 CD4⁺ T細胞にはIFN- γ を産生して防御免疫を担う細胞とは別に、抑制性サイトカインIL-27を産生し、他のT細胞のIL-2産生とクローン増殖を抑制する新規の抑制性CD4⁺ T細胞が誘導されることを発見した(Kimura et al., Immunity, 44: 672-682, 2016)。ヒトのマラリアにおいては、1988年にHoらがタイの病院に入院した急性期熱帯熱マラリア患者末梢リンパ球のIL-2産生が著名に低下していること、マラリアの回復と共にIL-2産生も回復することを報告した(Ho et al, J. Immunol, 141, 2755, 1988)。しかしながら、ヒトT細胞のIL-27産生は報告されていない。

免疫抑制機構については、IL-27に加えて、foxp3⁺抑制性T細胞や、IL-10産生T細胞(Tr1細胞)が報告されていた。また、慢性感染症や癌の場合、T細胞がPD-1などの抑制性分子を発現し、機能低下する疲弊状態になることが知られていた。しかしながら、これらの制御機構がヒトのマラリアでも病態形成に重要な役割を果たしているのか否か、特にIL-27産生CD4⁺ T細胞については、ヒトでの知見は皆無であった。

2. 研究の目的

ケニアのマラリア高浸淫地において、感

染者と非感染者の免疫応答を調査することにより、感染防御免疫応答と抑制性免疫応答のバランス、さらにマラリア病態との関連を明らかにする。抑制性免疫応答に関しては、IL-27、IL-10など抑制性サイトカイン産生細胞を中心に調査を行い、防御免疫応答と感染病態・症状との関連を解明し、正と負の免疫バランスのマラリア病態形成における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

【マラリア原虫抗原の調整】

熱帯熱マラリア原虫シゾン抗原は、連携研究者・熱帯医学研究所・金子修教授の協力を得て大学院生のCaroline Kijyogiが準備した。ヒト赤血球に熱帯熱マラリア原虫3D7株を感染させ培養した。感染率5-10%で止め、60% Percollで感染赤血球を分離した後、凍結・融解法によりシゾン抗原を調製した。

【検体の収集】

調査地域ケニア・ピタ地区は、東部ビクトリア湖畔の漁村である。この地域は、気温15-30、雨期は3-5月と10-12月の年2回、年間を通して熱帯熱マラリア流行地域である。2015年9-10月、研究分担者の熱帯医学研究所・濱野教授のチームと共同で検体収集を行った。地区の学校に、児童・住民に集ってもらい、インフォームドコンセントの後にマラリア感染迅速診断を行った。感染者・コントロール者から6ml程度のヘパリン採血を行った。また、提供者から発熱などの症状、薬剤治療の有無について情報を得た。2016年は、発症した患者血液を調べる研究を実施した。ピタ地区のクリニックに依頼し、インフォームドコンセントの後、マラリアで来院した子供(5-16歳)の血液をヘパリン採血した。

【単核細胞の検査】

ヘパリン採血した血液は、遠心分離して血漿を集めた。その後、リンフォブレップにより単核球(PBMC)を集めた。抗体で細胞表面

分子を染色してフローサイトメトリー解析を行なった。残りの細胞は蛍光色素 CFSE で染色し、抗 CD3/CD28 抗体ビーズ存在下 5 日間、あるいは熱帯熱マラリア原虫抗原、住血吸虫抗原存在下で 7 日間培養した。培養終了後上清を集め、ELISA 法で IFN- γ 、IL-2、IL-10、IL-13、IL-27 などのサイトカイン量を測定した。細胞は表面抗原に対する抗体で染色後、フローサイトメトリー解析を行い、CFSE の減衰から増殖をモニターした。

4 . 研究成果

データ解析は、136 名のサンプルで行った。血液スミア標本の顕微鏡観察による判定で、45 名が熱帯熱マラリア原虫感染陽性であった (33%)。感染陽性者と陰性者を比較したところ、陽性者で中枢性記憶細胞型 CD8⁺ T 細胞と NK 細胞が有意に少なかった。PBMCs の培養では、被験者間の違いが大きいこと、また全体に応答が低く全く応答しないサンプルもあることが特徴的であった。マラリア原虫抗原特異的応答では、陽性者と陰性者間の違いは明確ではなかった。T 細胞受容体刺激による PBMCs の IFN- γ 、IL-2、IL-10 産生を比較したところ、個人レベルでは特定のサイトカインしか産生しない傾向が特徴的であった。住血吸虫 SEA 抗原特異的増殖応答の CD4⁺ T 細胞は、原虫感染陰性者で有意に高かった。熱帯熱マラリア原虫抗原に対する応答は、陽性者と陰性者間に有意な違いはなかったが、原虫血症の高い児童では極めて低かった。また抗 CD3/CD28 抗体による刺激では、感染陽性者で IL-2 産生が有意に低かった。クリニックにおける発病者の調査結果については、現在取りまとめ中であり完成次第公表する予定である。本調査においては、マラリア陽性者の血液に IL-27 を産生する T 細胞を見出すことはできなかった。

マラリア患者と IL-27 産生 T 細胞の関連については、より重症患者ではどうか、また感染回数の少ない地域住民ではどうかなど、今後さらなる検討が必要である。

マラリア流行地において、無症状の学童を対象に実施した熱帯熱マラリア原虫の顕微鏡的陽性者と陰性者の比較において、免疫細胞の構成及び応答に有意な違いが見られた。顕微鏡検出レベル以下の感染児童もいると思われるが、顕微鏡検出可能なレベルの原虫感染が、無症状な児童の免疫系に影響を与えていることが示唆された。また、T 細胞の抗原刺激に対する応答は全体に低下しており、個人による質的な違いが大きいことも示唆された。本研究は、横断研究であること、対象者が限定的であること、顕微鏡検出限界以下の感染を見逃している可能性があること等の制約はあるが、マラリア流行地の無症状児童において、顕微鏡レベルの熱帯熱マラリア原虫感染が宿主免疫系を修飾することが明らかになった。

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 8 件)

1. C Kijogi, D Kimura, LQ Bao, R Nakamura, E A Chadeka, N B Cheruiyot, F Bahati, K Yahata, O Kaneko, S M. Njenga, Y Ichinose, S Hamano, K Yui, Modulation of immune responses by *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children living in the endemic region of Mbita, western Kenya. *Parasit Int*, 査読有 67; 284-293, 2018.
2. Y Saito, D Respatika, S. Komori, K. Washio, T. Nishimura, T. Kotani, Y. Murata, H. Okazawa, H. Ohnishi, Y Kaneko, K. Yui, K. Yasutomo, C. Nishigori, Y. Nojima, T. Matozaki, SIRP⁺ dendritic cells regulate homeostasis of fibroblastic reticular cells via

- TNF receptor ligands in the adult spleen. Proc. Natl Acad Sci (USA), 査読有 114 (47): E10151-E10160. 2017.
3. G Bayarsaikhan, M Miyakoda, K Yamamoto, D Kimura, M Akbari, M Yuda, K Yui, Activation and exhaustion of specific CD8⁺ T cells occur in different splenic compartments during infection with *Plasmodium berghei*, Parasit Int, 査読有 66 (3): 227-235, 2017.
 4. M. Akbari, K. Kimura, JT Houts, K. Yui, Intravital imaging of the immune responses during liver-stage malaria infection: an improved approach for fixing the liver. Parasit Int, 査読有 65 (5) 502-505, 2016.
 5. Kimura, D, Miyakoda, M., Kimura K., Honma, K., Hara, H., Yoshida, H., Yui, K., Interleukin-27-producing CD4⁺ T cells regulate protective immunity during malaria parasite infection, Immunity, 査読有 44: 672-682, 2016.
 6. D My-Nhi, N Tien Huy, K Ohyama, D Kimura, N Thi Phuong Lan, L Uchida, N Van Thuong, C Thi My Nhon, L Hong Phuc, N Thi Mai, S Mizukami, L Quoc Bao, N Ngoc Doan, N Van Thanh Binh, L Chan Quang, J Karbwang, K Yui, K Morita, V Thi Uoe Huong, K Hirayama, A Proteomic Approach identifies candidate early Biomarkers to Predict Severe Dengue in Children, Plos Neg Dis. 査読有 0004435, 1-15. 2016
 7. Henrietta, T D, Kimura, D, Miyakoda, M., Kimura K., Akbari, M, Yui, K., Expression of PD-1/LAG-3 and cytokine production by CD4⁺ T cells during infection with *Plasmodium* parasites, Microbiol. Immunol., 査読有 60(2), 121-131, 2016.
 8. Tamura, T, Kimura, K, Yui, K, Yoshida, S, Reduction of conventional dendritic cells during Plasmodium infection is dependent on activation induced death by type I and II interferons, Exp. Parasitol. 査読有 159: 127-135, 2015.
- [学会発表](計 21 件)
1. Interleukin-27 regulate the function of CD4⁺ T cells during malaria infection, (S8 生体防御研究の新展開～宿主免疫 vs 病原体の多彩な攻防戦略～、木村大輔、都田真奈、中前早百合、O Sukhbaatar, 木村一美、Bayarsaikhan, G, Masoud A、原博満、吉田裕樹、由井克之、第 9 1 回日本細菌学会総会、福岡国際会議場、福岡、3/27-29、2018 年
 2. Role of Interleukin-27 in the regulation of immune responses against chronic malaria infection O Sukhbaatar, D Kimura, M Miyakoda, S Nakamae, K Kimura, H Yoshida, K Yui, The US-Japan cooperative medical science program, The 48th joint conference on parasitic diseases, 長崎大学 2/16 2018 年
 3. Interleukin-27-dependent loss of CD4⁺ T cell-memory during malaria infection. D Kimura, M Miyakoda, G Bayarsaikhan, S Nakamae, O Sukhbaatar, K Kimura, H. Hara, H. Yoshida, K Yui, The 46th annual meeting of the Japanese Society for Immunology, 仙台国際センター、仙台市、12/12-14, 2017 年
 4. T-cell immune responses to *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma mansoni* infection in asymptomatic children living in the endemic region of Mbita, western Kenya. C Kijyogi, D Kimura, K Yui, The 46th annual meeting of the Japanese Society for Immunology, 仙台国際センター、仙台市、12/12-14, 2017 年
 5. Role of interleukin-27 in the regulation of immune responses against chronic malaria

- infection, O Sukhbaatar, D Kimura, M Miyakoda, S Nakamae, K Kimura, K Yui, The 46th annual meeting of the Japanese Society for Immunology, 仙台国際センター、仙台市、12/12-14, 2017 年
6. Interleukin-27 inhibits the generation of memory CD4⁺ T cells during malaria infection. D Kimura, S Nakamae, O Sukhbaatar, M Miyakoda, M Akbari, K Kimura, H. Hara, H. Yoshida, K Yui, The 5th annual meeting of the international cytokine and interferon society (ICIS 2017), ANA Crown Plaza Kanazawa, 10/29-10/31, 2017 年
 7. T-cell responses to *Plasmodium falciparum* and *Shistosoma mansoni* infections in children living in the endemic region of Mbita, western Kenya. C Kijyogi, D Kimura, LQ Bao, R Nakamura, K Yahata, O Kaneko, Y Ichinose, S Hamano, K Yui, 第 16 回あわじしま感染症・免疫フォーラム (ポスター) 淡路夢舞台国際会議場、9/5~9/8, 2017 年
 8. マラリア原虫治癒後における免疫記憶消失は IL-27 依存的である、木村大輔、都田真奈、M Akbari、木村一美、原博満、吉田裕樹、由井克之、第 86 回日本寄生虫学会大会、北海道大学 学術交流会館、5/28、29、2017 年
 9. T-cell responses to *Plasmodium falciparum* and *Shistosoma mansoni* infections in children living in the endemic region of Mbita, western Kenya, C Kijyogi, D Kimura, B lamquoc, R Sonoda, K Yahata, O Kaneko, Y Ichinose, S Hamano, K. Yui, The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium/ Leading program international symposium 2017, 良順会館、長崎市、3/18-19, 2017 年
 10. Interleukin-27 inhibits the generation of memory CD4⁺ T cells after treatment with anti-malaria drug, D Kimura, M Miyakoda, M Akbari, K Kimura, H Hara, H Yoshida, K Yui, The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium/ Leading program international symposium 2017, 良順会館、長崎市、3/18-19, 2017 年
 11. Regulation of the protective immune responses by IL-27 producing CD4⁺ T cells (Tr27 cells) during malaria infection, (シンポジウム S11-2)K. Yui, D. Kimura, M Miyakoda, K. Kimura, H Hara, H Yoshida, 第 45 回日本免疫学会学術集会、那覇、12/5-7、2016 年
 12. マラリア原虫抗原得的 Foxp3⁺CD4⁺T 細胞による防御免疫応答の制御 (特別講演) 由井克之、第 69 回日本寄生虫学会南日本支部大会、佐賀市、11/5、6、2016 年
 13. Regulation of the immune responses by Tr27 cells during malaria infection, D Kimura, M Miyakoda, K Kimura, H Hara, H Yoshida, K Yui、第 15 回あわじしま感染症・免疫フォーラム (特別講演) 淡路夢舞台国際会議場、9/6~9、2016 年
 14. IL-27-producing CD4⁺ T cells regulate protective immune responses during malaria infection, (Symposia), D Kimura, Doe HT, M Miyakoda, K Kimura, H Hara, H Yoshida, K Yui, 16th International Congress of Immunology, Melbourne, 8/21-26, 2016 年
 15. マラリア原虫感染により誘導される IL-27 産生 CD4⁺ T 細胞、木村大輔 (シンポジスト)、都田真奈、木村一美、Akbari Masoud、原博満、吉田裕樹、由井克之、第 27 回生体防御学会 福岡市 7/7~9、2016 年
 16. CD4⁺ T cell responses of school children in Mbita Kenya, endemic region of *Plasmodium falciparum* and *Schistosoma mansoni*, C Kijyogi, D Kimura, LQ Bao, R Sonoda, K

- Yahata, O Kaneko, S Hamano, K Yui,
The 3rd International Symposium for the
Promotion of Science and Technology
Innovation Cooperation between Africa and
Japan ~ Life Innovation and Green
Innovation ~”, at JICA Ichigaya in Tokyo,
Japan 7/13, 2016 年
17. IL-27 産生 CD4 T 細胞 (Tr27 細胞) に
よるマラリア原虫感染免疫防御の制御、
由井克之、木村大輔、都田真奈、木村
一美、原博満、吉田裕樹、第 81 回日本
インターフェロン・サイトカイン学会
学術集会、長崎、5/13-14/、2016 年
18. マラリア原虫感染における IL-27 依存
的な免疫記憶抑制、木村大輔、都田真
奈、Akbari Masoud、井手宏二、木村一
美、原博満、吉田裕樹、由井克之、第
85 回日本寄生虫学会大会、宮崎、3/19-20、
2016 年
19. Mechanisms underlying the induction of
IL-27-producing CD4⁺ T cells during
immune responses against intracellular
pathogens. DOE HT, KIMURA D,
MIYAKODA M, Akbari M, Kimura K,
YUI K, 64th annual meeting of American
Society of Tropical Medicine and Hygiene,
Philadelphia, U.S.A., 10/25-29, 2015 年
20. Regulation of immune responses by
IL-27-producing CD4⁺ T cells during
malaria infection, K. Yui, The 12th
NUS-Nagasaki joint symposium, NUS,
Singapore, 6/11&12, 2015 年
21. IL-27-producing CD4⁺ T cells regulate
protective immune responses during
malaria infection, KIMURA D,
MIYAKODA M, DOE HT, KIMURA K,
Hara H, Yoshida H, YUI K, 25th Annual
molecular parasitology vector biology
Symposium, Athens, GO USA, 4/28, 29,
2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/im/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

由井 克之 (YUI, Katsuyuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
教授
研究者番号：90274638

(2)研究分担者

濱野 真二郎 (HAMANO, Shinjiro)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：70294915

木村 大輔 (KIMURA, Daisuke)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
講師
研究者番号：50423637

(3)連携研究者

金子 修 (KANEKO, Osamu)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：50325370

(4)研究協力者

キジョギ カロライン (KIJOGI, Caroline)