

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08451

研究課題名(和文) 妊娠によるマラリアの病態重症化機構の解明

研究課題名(英文) Role of IFNGR1 in pregnant mice infected with Plasmodium berghei

研究代表者

小林 富美恵 (Kobayashi, Fumie)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：20118889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：妊婦はマラリア原虫に対する抵抗性が低下していることから、マラリアの病態が重症化しやすい。また、マラリア原虫に感染した妊婦では流産や死産、胎児の発育遅延が頻発することが知られている。しかし、妊娠中のマラリアにおける病態生理や病態発症機序の詳細は未だに多くの謎に包まれている。本研究で、妊娠マラリアにおける絨毛組織の変性にはIFNGR1を介して誘導される炎症反応が関わることが明らかとなった。これらの結果から、妊娠マラリアにおける胎児の子宮内発育不全や早産、流産、死産は、IFNGR1のシグナル伝達を阻害することで抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Malaria during pregnancy is a major public health problem in malaria-endemic regions. Placental malaria has been reported to be correlated with adverse pregnancy outcomes such as fetal growth restriction, stillbirth, premature delivery. However, the immunopathogenesis of placental pathology during severe malaria is poorly understood. Recently, we found that fetal mortality in IFN- $\gamma$  receptor 1-deficient (IFNGR1-KO) C57BL/6J mice infected with rodent malaria parasites, *Plasmodium berghei* NK65 (PbNK65) was much less than that in infected wild type (WT) mice. Placental pathology was also improved in infected IFNGR1-KO mice. In contrast, bioluminescence imaging showed that parasite accumulation in the placentas of IFNGR1-KO pregnant mice infected with luciferase-expressing PbNK65 was comparable to that in infected WT mice. These findings suggest that IFNGR1 signaling plays a pivotal role in placental pathology and subsequent adverse pregnancy outcomes during severe malaria.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 妊娠 重症化 胎盤 接着 炎症 IFNGR1 生体イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

妊婦はマラリア原虫に対する抵抗性が低下していることから、マラリアの病態が重症化しやすい。また、マラリア原虫に感染した妊婦では流産や死産、胎児の発育遅延が頻発することが知られている。マラリア原虫感染赤血球が胎盤に集積すると、宿主の免疫が活性化され炎症反応が誘導される。この炎症反応は、マラリア原虫を排除するだけでなく、自身の胎盤組織にも傷害を与える。この炎症反応によって胎盤組織が傷害されることで、胎盤の形成不全や機能不全が引き起こされると考えられている。実際に、流行地での疫学研究によって、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインが胎児の流産や死産に関わることが示唆されている。しかし、宿主炎症反応と胎盤組織傷害との関係を示す直接的な証拠はほとんどなかった。

## 2. 研究の目的

- (1) 妊娠中のマラリアにおいて、炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  やマクロファージ、CD8<sup>+</sup>T 細胞は胎盤の組織傷害に関わると推測される。そこで、IFN- $\gamma$  に対する受容体 (IFN- $\gamma$ R1) を欠損したマウス、抗 Gr-1 抗体または抗 CD8 抗体投与によってマクロファージまたは CD8<sup>+</sup>T 細胞それぞれを除去したマウスを用いて、妊娠中のマラリアにおける胎盤組織傷害機構を明らかにすることを第 1 の目的とした。
- (2) 本研究で確立した妊娠中のマラリアのマウスモデルを用いて、宿主体内におけるマラリア原虫感染赤血球の局在を生体分子イメージングにて解析することで、妊娠中のマラリアの病態重症化機構を明らかにすることを第 2 の目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) マウスマラリア原虫は、強毒株マウスマラリア原虫である *Plasmodium berghei* (Pb) NK65 を使用した。Pb NK65 にルシフェラーゼ発現カセットを 2 重交差相同組み換えによって導入し、ルシフェラーゼを発現する Pb NK65 を作製した。
- (2) 交配後 12 日目のマウスにマラリア原虫を感染させ、原虫血症の推移および胎児死亡率を解析した。また、感染後 6 日目に胎盤を採取し、胎盤組織における感染赤血球の集積と胎盤絨毛構造について組織学的解析を行った。
- (3) 交配後 12 日目のマウスにルシフェラーゼを発現するマラリア原虫を感染させ、感染後 3 日目または感染後 6 日目にルシフェリンを投与し、マラリア原虫の局在を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 妊娠マラリアのマウスモデルの樹立

本研究では、まず、マラリアのマウスモデルを応用して、妊娠マラリアのマウスモデルの樹立を試みた (図 1)。妊娠マウスに強毒株マウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* NK65 を感染させると、非妊娠マウスと比較して、感染後 3 日目から有意に原虫血症が増加することが明らかとなった (図 1)。さらに、妊娠中のマラリアによる胎児への影響について解析したところ、マラリア原虫を感染させた妊娠マウスの胎児の死亡率は 95.5% で、非感染マウスの胎児死亡率と比較して著しく増加することを見出した。これらの結果から、本研究によって樹立された妊娠マラリアのマウスモデルは、ヒトと同様に、妊娠中にマラリアの病態が重症化することが明らかとなった。

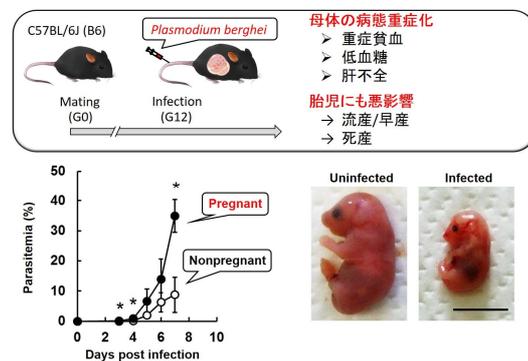


図 1. 妊娠マラリアのマウスモデル

### (2) 妊娠中のマラリアの胎盤組織傷害における IFNGR1 の役割

本研究で樹立された妊娠マラリアのマウスモデルの胎盤の病理解析を行った (図 2A-C)。その結果、マラリア原虫を感染させた野生型妊娠マウスの胎盤絨毛部に、感染赤血球の集積と絨毛組織の変性が認められた (図 2B, Infected WT)。マラリア原虫を感染させた野生型妊娠マウスの血漿中において IFN- $\gamma$  が有意に増加していたことから、IFN- $\gamma$  の受容体である IFNGR1 を欠損させたマウスを用いて IFN- $\gamma$  と胎盤絨毛組織の変性との関係を解析した (図 2C, Infected KO)。その結果、マラリア原虫を感染させた IFNGR1 欠損マウスでは、野生型妊娠マウスと同様、胎盤絨毛部に感染赤血球の集積が認められた (図 2B and C, arrows)。しかし、野生型妊娠マウスで認められた絨毛組織の変性が改善された (図 2C, Infected KO)。さらに、マラリア原虫を感染させた IFNGR1 欠損マウスの胎児の死亡率は、野生型マウスと比較して有意に減少した (図 2D)。これらの結果から、妊娠マラリアにおける絨毛組織の変性には、IFNGR1 を介して誘導される炎症反応が関与することが明らかとなった (図 3)。

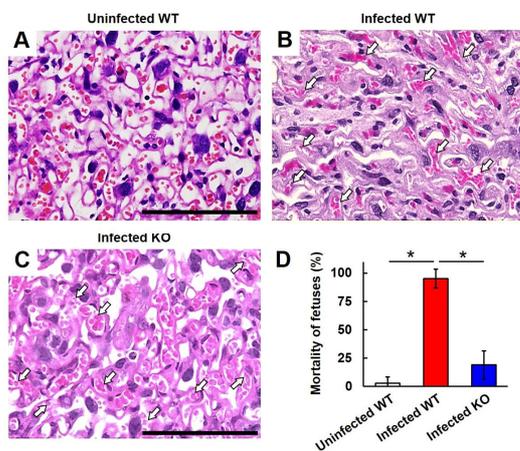


図 2. IFNGR1 欠損による胎盤組織傷害の改善

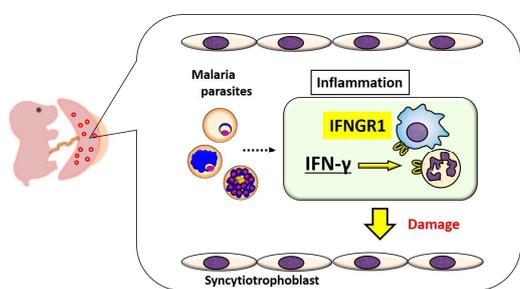


図 3. 妊娠中のマラリアの胎盤組織傷害における IFNGR1 の役割

IFN- $\gamma$  は、マクロファージなどの貪食細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞などを活性化させることが知られている。そこで、抗 Gr-1 抗体投与によってマクロファージなどの貪食細胞を除去した妊娠マウスと、抗 CD8 抗体投与によって CD8<sup>+</sup>T 細胞を除去した妊娠マウスにマラリア原虫をそれぞれ感染させ、胎子の生存率を解析した。その結果、抗 Gr-1 抗体投与および CD8<sup>+</sup>T 細胞除去マウスにおいて、胎子生存率の改善は認められなかった。これらの結果から、マクロファージや CD8<sup>+</sup>T 細胞以外の細胞が、妊娠中のマラリアにおける胎盤の絨毛傷害に関与している可能性が示唆された。

### (3) 妊娠マウスにおけるマラリア原虫の局在

熱帯熱マラリア原虫は、分裂体期に感染赤血球表面に種々の接着分子を発現することで宿主の血管内皮細胞や種々の臓器に接着することが知られている。そのため、末梢血から分裂体が観察されることは極めてまれである。マウスマラリア原虫も、熱帯熱マラリア原虫と同様に末梢血から分裂体は殆ど検出されないことから、宿主の種々の臓器に接着していると考えられる。そこで、*in vivo* imaging により非妊娠マウスと妊娠マウスにおけるマラリア原虫の局在を解析した。

その結果、マラリア原虫を感染させた非妊娠マウスでは、肺にルシフェラーゼの強い発光が認められた。脂肪組織からは低レベルの発光が検出されたが、肝臓と脾臓からはルシフェラーゼの発光は非常に低レベルであった (図 4)。これらの結果から、非妊娠マウス内でマラリア原虫は、主に肺に集積することが示唆された。一方、妊娠マウスでは、肺だけでなく脂肪組織からも強いルシフェラーゼの発光が検出された。また、胎盤からもルシフェラーゼの発光が検出されたが肺や脂肪組織と比較して低レベルだった。妊娠マウスの肝臓と脾臓における発光は、非妊娠マウスと同様非常に低レベルであった (図 4)。これらの結果から、妊娠マウスにおいてマラリア原虫は肺と脂肪組織、胎盤に集積することが示唆された。

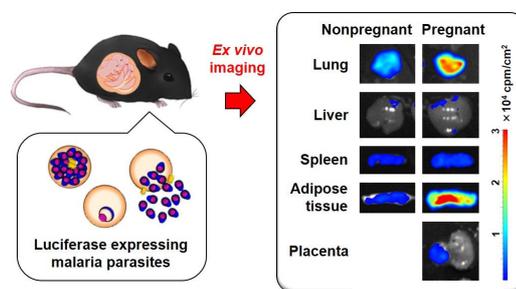


図 4. 妊娠マラリアのマウスモデルの生体イメージング解析

### (4) 妊娠による脂肪組織の分子発現変化

脂肪組織は、妊娠時にホルモンやアディポカインを分泌することで妊娠維持に関わる重要な内分泌組織である。これまでの研究成果によって、我々は妊娠マラリアによる流産や死産を再現するマウスモデルを確立した。このマウスモデルを用いて、宿主体内におけるマラリア原虫感染赤血球の局在を生体イメージングにて解析したところ、妊娠マウスの脂肪組織におけるマラリア原虫感染赤血球の蓄積量は、非妊娠マウスの脂肪組織と比較して、7~8 倍増加することを見出した (図 4)。これらの知見から、妊娠マラリアでは脂肪組織に感染赤血球が蓄積することで、脂肪組織の「質」が変化していると推測した。そこで本研究では、比較プロテオームの手法を用いて、感染赤血球の蓄積による脂肪組織の分子発現変化を明らかにすることとした。まず、マラリア原虫を感染させていない非妊娠マウスと妊娠マウスの脂肪組織からそれぞれタンパク質を抽出し、比較プロテオーム解析を実施した。解析の結果、脂肪組織から約 1200 個のタンパク質が検出された。さらに、非妊娠マウスと妊娠マウスの脂肪組織における分子発現パターンを比較したところ、妊娠マウスの脂肪組織において有意に増加する分子を複数見出した。今後、マラリア原虫を感染させた妊娠マウスの脂肪組織を採

取し、マラリア原虫を感染させていない妊娠マウスの脂肪組織における分子発現パターンと比較解析することにより、妊娠中のマラリアにおける脂肪組織の分子発現変化を明らかにする予定である。

## 総括

妊娠中のマラリアは、母体だけでなく胎児にも重大な影響を与えることから、マラリア流行地において社会問題となっている。しかし、その治療法は未だに確立されていない。本研究で、妊娠マラリアにおける絨毛組織の変性には IFNGR1 を介して誘導される炎症反応が関わることが明らかとなった。これらの結果から、妊娠マラリアにおける胎児の子宮内発育不全や早産、流産、死産は、IFNGR1 のシグナル伝達を阻害することで抑制できる可能性が示唆された。

脂肪組織は、様々な生理活性物質を分泌する最大の内分泌組織である。ヒトが妊娠すると、脂肪組織に形態や機能の変化が誘導され、妊娠の維持に関わることを示唆されている。本研究で、妊娠マラリアのマウスモデルの生体イメージング解析により、妊娠マウスの脂肪組織には、非妊娠マウスの脂肪組織と比較して、マラリア原虫感染赤血球が 7~8 倍蓄積することを見出した。これらの結果から、マラリア原虫感染赤血球の脂肪組織への集積が妊娠マラリアの病態重症化の一端を担っている可能性が示唆された。感染赤血球の脂肪組織への集積機構の全容が明らかにされることによって、妊娠マラリアの早期診断法や治療法の開発のための新たな知見が得られると期待される。

## 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 10 件)

- (1) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Toshiyuki Fukutomi, Junya Yamagishi, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: Comparative genomics and proteomic analyses between lethal and nonlethal strains of *Plasmodium berghei*. *Exp Parasitol.* (査読あり) 185: 1-9, 2018. doi: 10.1016/j.exppara.2018.01.001.
- (2) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Shoichiro Mineo, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: IFNGR1 signaling is associated with adverse pregnancy outcomes during infection with malaria parasites. *PLoS One.* (査読あり) 12 (11): e0185392, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0185392.
- (3) Hiroko Asahi, Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Keisuke Kunigo, Yutaka Suzuki, Fumie Kobayashi, Fujiro Sando: Pyknosis

and developmental arrest induced by an opioid receptor antagonist and dihydroarthemisinin in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One.* (査読あり) 12 (9): e0184874, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0184874.

- (4) Mamoru Niikura, Keisuke Komatsuya, Shin-Ichi Inoue, Risa Matsuda, Hiroko Asahi, Daniel Ken Inaoka, Kiyoshi Kita, Fumie Kobayashi: Suppression of experimental cerebral malaria by disruption of malate:quinone oxidoreductase. *Malar J.* (査読あり) 16 (1): 247, 2017. doi: 10.1186/s12936-017-1898-5.
- (5) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Yoichiro Iwakura, Yashushi Kawakami, Fumie Kobayashi: Preferentially expanding  $V\gamma 1^+ \gamma\delta T$  cells are associated with protective immunity against *Plasmodium* infection in mice. *Eur J Immunol.* (査読あり) 47 (4): 685-691, 2017. doi: 10.1002/eji.201646699.

〔学会発表〕(計 46 件)

- (1) Mamoru Niikura: Role of IFNGR1 in pregnant mice infected with *Plasmodium berghei*. Japanese-Brazil Malaria Workshop 2017, 2017.
- (2) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: The effect of schizont membrane-associated cytoadherence protein (SMAC)-deficiency on the accumulation of erythrocytes infected with murine malaria parasites to placenta. The 14<sup>th</sup> Asian-Pacific Congress for parasitic zoonoses (APCPZ-2016), 2016.
- (3) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: IFN- $\gamma$  receptor signaling plays a pivotal role in adverse pregnancy outcomes during severe malaria. The 18<sup>th</sup> Forum Cheju, 2016.
- (4) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: Maternal IFN- $\gamma$  receptor signaling promotes placental pathology during *Plasmodium* infection. The XIX International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM 2016), 2016.
- (5) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi: IFNGR1 signaling is involved in development of placental pathology during *Plasmodium* infection. 第 85 回日本寄生虫学会大会, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

杏林大学医学部 教室紹介

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/infection/>

杏林大学大学院 医学研究科 研究室・研究グループ紹介:感染症学教室

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/infect-dis/>

病理系専攻 感染症・熱帯病学分野(寄生虫学部門)

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/aboutus/outline/model/infect-trop-dis/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 富美恵(KOBAYASHI FUMIE)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号:20118889

(2)研究分担者

新倉 保(NIIKURA MAMORU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号:30407019

井上 信一(INOUE SHIN-ICHI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号:20466030

(3)研究協力者

横田 夏紀(YOKOTA NATSUKI)