

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19085

研究課題名(和文) マラリア免疫記憶の成立・維持の分子基盤を自然免疫リンパ球から紐解く

研究課題名(英文) Elucidation whether innate-like lymphocytes are related with immunological memory during malaria

研究代表者

井上 信一 (INOUE, Shin-Ichi)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：20466030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫記憶は生体における病原体感染防御にとって必須の現象であるものの、マラリアに対する免疫記憶の形成・維持機構はほとんど分かっていない。したがって、如何にしてマラリア免疫記憶機構が働いているのかを解明することは、マラリア研究において極めて重要な課題である。本研究は、自然免疫様リンパ球である $\gamma\delta$ T細胞の機能解析を基軸としてマラリア免疫記憶機構の分子基盤を解明することを目的として遂行された。その結果、我々は、免疫記憶細胞の維持に $\gamma\delta$ T細胞が重要な働きを担っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Immunological memory is a crucial phenomenon for protective immunity against a variety of pathogens. However, it remains largely unknown the mechanism how immunological memory against malaria develops and maintains during malaria. Thus, to elucidate the mechanism, we used mice model of malaria. We have shown that gamma delta T cells, which is a innate-like lymphocyte, have crucial functions for protective immunity against malaria during primary infection with Plasmodium parasites. In this study, we suggest that gamma delta T cell would be involved in immunological memory against malaria.

研究分野：感染免疫

キーワード： T細胞 マラリア 免疫記憶

1. 研究開始当初の背景

これまで、マラリア患者の末梢血や脾臓で $\gamma\delta$ T 細胞が増加しているとの報告があることから、 $\gamma\delta$ T 細胞とマラリアの関連性が示唆されてきた。さらに、国外でのマウスを用いた研究により、ヘルパーT 細胞が活性化して原虫排除に働くのを $\gamma\delta$ T 細胞が補助していると推測されていた。しかし最近、我々は、 $\gamma\delta$ T 細胞は感染初期に CD40 ligand (CD40L) を発現して樹状細胞を活性化させ、マラリア原虫に対する防御免疫を亢進させているという宿主防御免疫機構を世界に先駆けて明らかにした(Inoue *et al.* PNAS 2012)。さらに我々は、 $\gamma\delta$ T 細胞は樹状細胞が活性化する感染初期において感染防御に重要な役割を担っていて、その後起こる $\gamma\delta$ T 細胞の急増現象は「初感染」防御免疫に必須でないことを見出した。しかし、 $\gamma\delta$ T 細胞の急増の意義は依然として謎のままである。

上述の様に、我々は、マラリア原虫感染後における $\gamma\delta$ T 細胞の CD40L 発現を明らかにしたが、CD40L は樹状細胞だけではなく B 細胞の抗原特異的応答において必須の補助刺激分子であることが知られている。すなわち、 $\gamma\delta$ T 細胞は B 細胞に対する刺激、さらには記憶 B 細胞の分化や維持に関与している可能性が考えられる。記憶 B 細胞は、リンパ組織(マラリアでは特に脾臓)の「濾胞」などの特定部位に存在する支持細胞との相互作用によって適切に分化し維持されている。したがって、脾臓の組織構造や細胞の配置は、記憶細胞の分化・維持にとって極めて重要な要素となる。これらのことから、我々は、(A) $\gamma\delta$ T 細胞は特定の分子を用いて記憶 B 細胞に働きかけている(CD40L や直接的因子)、(B) 記憶 B 細胞の分化・維持に重要な支持組織構造の形成や支持因子の産生に $\gamma\delta$ T 細胞が関与している(間接的因子)という仮説を立てた。

上記の仮説を検証するために、まず、マウスマラリア感染モデルを用いた実験系を構築した。非致死性の *Plasmodium berghei* XAT を野生型マウスに一度感染させて自然治癒させると、マラリア原虫に対する免疫記憶が形成される。そこに、*P. berghei* NK65 (ナイーブ マウスに対して致死性)を感染させても原虫は速やかに免疫的に排除される。我々は、このマラリア原虫感染の免疫記憶実験系と抗体による $\gamma\delta$ T 細胞除去法を用いることで、 $\gamma\delta$ T 細胞と免疫記憶の関連性の手がかりを得た。すなわち、 $\gamma\delta$ T 細胞が除去されることにより、致死性の *P. berghei* NK65 の排除機能が低下、つまり免疫記憶機能が低下し

ていたのである。この予備実験の結果は、 $\gamma\delta$ T 細胞は免疫記憶に何らかの重要な役割を担っていることを強く示唆している。この結果をもとに、マラリア原虫感染時の $\gamma\delta$ T 細胞における免疫記憶の制御機構について詳細な検討をおこなうこととした。

2. 研究の目的

マラリアに対する免疫記憶の形成・維持機構はほとんど分かっていないものの、免疫記憶は生体による病原体感染防御にとって必須の現象である。したがって、如何にしてマラリア免疫記憶機構が働いているのかを解明することは、マラリア研究において極めて重要な課題である。

本研究では、 $\gamma\delta$ T 細胞の機能解析を基軸としてマラリア免疫記憶機構の分子基盤を解明することを最終目的とした。

3. 研究の方法

(1) 記憶 B 細胞の分化・維持における $\gamma\delta$ T 細胞の重要性の解明

非致死性 *P. berghei* XAT の一次感染と致死性 *P. berghei* NK65 の二次感染を組み合わせた免疫記憶実験系において、免疫記憶の形成・維持に $\gamma\delta$ T 細胞が重要であることを明らかにするため、抗体による $\gamma\delta$ T 細胞除去(Inoue *et al.*, PNAS 2012)をおこなった。

[A 群] *P. berghei* XAT の一次感染 抗体で $\gamma\delta$ T 細胞除去 *P. berghei* NK65 の二次感染

[B 群] *P. berghei* XAT の一次感染 control IgG 投与 *P. berghei* NK65 の二次感染

両群について、*P. berghei* NK65 の二次感染後より経時的に血液薄層塗抹ギムザ染色標本作製し、感染赤血球の割合の推移を比較・検討した。 $\gamma\delta$ T 細胞除去は *P. berghei* XAT の一次感染後 30~90 日目におこなった。そして、*P. berghei* NK65 の二次感染は *P. berghei* XAT の一次感染後 180 日目におこなった。多数のマウスの感染赤血球の推移を経時的に観察するにあたり、研究協力者(研究代表者の所属研究室の実験助手)から支援を受けた。

(2) $\gamma\delta$ T 細胞が免疫記憶の成立・維持に及ぼす効果に関する分子の特定

$\gamma\delta$ T 細胞は樹状細胞が活性化する感染初期より後(感染 15~30 日目)において細胞数が急増する。しかし、 $\gamma\delta$ T 細胞が免疫記憶細胞

の分化・維持において重要な役割を担っているのは、この急増期以降である可能性がある。そこで、非感染(ナイーブ)、感染終息期(XAT感染後15~30日目)、感染治癒後(XAT感染後60~90日目)のマウス由来の $\gamma\delta$ T細胞をフローサイトメトリーで単離し、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現解析をおこなって候補遺伝子を探した。

(3)各分化段階の B 細胞と抗体産生細胞に対する $\gamma\delta$ T細胞の影響の解明

P. berghei XATの一次感染前後の脾臓のナイーブB細胞、活性化B細胞やマラリア原虫特異的な抗体産生細胞の細胞数や細胞分布について、フローサイトメーター、組織免疫染色法、ELISPOTを用いて解析した(XAT感染後0~30日目)。

(4)各分化段階の B 細胞と抗体産生細胞に対する $\gamma\delta$ T細胞の影響の解明

P. berghei NK65の二次感染前後において、記憶B細胞の数や産生される免疫グロブリンのアイソタイプをフローサイトメーター、ELISA、ELISPOTを用いて解析した(XAT感染後120~180日目)。さらに、 $\gamma\delta$ T細胞除去によって、それらがどの様に変化するののかについても検討した。また、長期記憶B細胞や長期抗体産生細胞は骨髄にも移行するので、骨髄の解析も同様におこなった。

4. 研究成果

本研究は、 $\gamma\delta$ T細胞の機能解析を基軸としてマラリア免疫記憶機構の分子基盤を解明することを目的としている。記憶細胞の分化・維持における $\gamma\delta$ T細胞の重要性を検討するため、*P. berghei* XAT(弱毒株マラリア原虫)の感染耐過マウスに*P. berghei* NK65(強毒株マラリア原虫)を感染させる免疫記憶実験系に、抗体による $\gamma\delta$ T細胞除去を組み合わせ免疫記憶の形成・維持に $\gamma\delta$ T細胞が重要であるのか検証した。その結果、弱毒株感染をした後に原虫排除がなされたマウスに対して $\gamma\delta$ T細胞除去をすると、その後の強毒株感染に対する免疫防御能が低下することがわかったことから、免疫記憶細胞の維持に $\gamma\delta$ T細胞が重要な働きを担っている可能性を示すことが出来た。

さらに、 $\gamma\delta$ T細胞が免疫記憶の成立・維持に及ぼす効果に関与する分子の特定するため、非感染マウスと弱毒株マラリア原虫感染より治癒したマウス由来の $\gamma\delta$ T細胞をフローサイトメトリーで単離し、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。その結果、治癒後のマウスから取った $\gamma\delta$ T細胞に

において優位に発現する遺伝子を候補分子として挙げる事が出来た。さらに、これらの候補分子に関してRT-PCRで発現の再確認をおこなった。

ナイーブ $\gamma\delta$ T細胞欠損マウスは弱毒株マラリア原虫を制御できない。したがって、このマウスを使用して $\gamma\delta$ T細胞の免疫記憶能への影響を検討することは難しいと考えられていた。しかし、弱毒株マラリア原虫の感染後に抗マラリア薬で治療することで、一定のマラリア免疫記憶を成立させることができることを発見した。ただし、野生型マウスの弱毒株マラリア原虫感染耐過マウスに比べると、その免疫記憶能は低いことが分かった。そこで、治癒後の感染耐過マウスの $\gamma\delta$ T細胞において優位に発現する遺伝子群のある候補遺伝子のタンパク質をこの感染耐過 $\gamma\delta$ T細胞欠損マウスに投与したところ、若干の免疫記憶能力の上昇が見られた。現在、発展研究として、ウイルスベクター感染による強制発現によって免疫記憶能の上昇が見られるのかを確認するため、レンチウイルスベクターの構築を行っている最中である。また、同様にsiRNAによる発現抑制により免疫記憶の低下がみられるのかを確認する予定である。

また、各分化段階のB細胞と抗体産生細胞に対する $\gamma\delta$ T細胞の影響の解明するため、弱毒株マラリア原虫の一次感染前後の脾臓のナイーブB細胞、活性化B細胞やマラリア原虫特異的な抗体産生細胞の細胞数について、フローサイトメーター解析、ELISPOT解析を行った。さらに、弱毒株マラリア原虫感染後のマウスにおける原虫特異的な抗体産生能力を経時的にELISA解析したところ、弱毒株マラリア原虫感染後120日目においても血漿中の抗体産生量は高値を維持していた。さらに、脾臓と骨髄における抗体産生細胞(ELISpot)、記憶B細胞(ELISpot)を経時的に解析したところ、抗体産生細胞は感染当初に脾臓に多く、感染120日後に骨髄における割合が増加することが分かった。ただし、脾臓内にも多数の長期生存形質細胞が維持されていた。一方の記憶B細胞は、感染120日目に、骨髄と脾臓では同程度の割合で存在し、総数としては脾臓の方が多いという結果だった。さらに、弱毒株マラリア原虫感染後、特異的な抗体による $\gamma\delta$ T細胞除去をおこなったマウス群と $\gamma\delta$ T細胞除去をしないマウス群に分け、両群における原虫特異的な抗体産生能力を解析したが、ELISAとELISpot解析ともに、両者で大きな変化が見られなかった。したがって、 $\gamma\delta$ T細胞は、記憶B細胞よりも記憶T細胞に影響を与える可能性が考えられた。

<参考文献>

Inoue *et al.*, *FEBS Lett.* Vol. 588, p2147-2153 (2014)
Inoue *et al.*, *Front. Immunol.*, Vol. 4, 258, (2013)
Inoue *et al.*, *PNAS*, Vol. 109, p12129-12134 (2012)

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 14 件)

(1)原著論文

Niikura M, Inoue S-I, Fukutomi T, Yamagishi J, Asahi H, Kobayashi F, Comparative genomics and proteomic analyses between lethal and nonlethal strains of *Plasmodium berghei*. *Exp. Parasitol.* Vol. 185: p1-9, 2018 (査読有)
DOI:10.1016/j.exppara.2018.01.001.

Inoue S-I, Niikura M, Asahi H, Iwakuwa Y, Kawakami Y, Kobayashi F, Preferentially expanding $V\gamma 1^+$ $\gamma\delta$ T cells are associated with protective immunity against *Plasmodium* infection in mice. *Eur. J. Immunol.*, Vol. 47: p685-691, 2017 (査読有)
DOI:10.1002/eji.201646699.

Niikura M, Komatsuya K, Inoue S-I, Matsuda R, Asahi H, Inaoka DK, Kita K, Kobayashi F, Suppression of experimental cerebral malaria by disruption of malate:quinone oxidoreductase. *Malar. J.* Vol. 16: 247, 2017 (査読有)
DOI:10.1186/s12936-017-1898-5.

Asahi H, Inoue S-I, Niikura M, Kunigo K, Suzuki Y, Kobayashi F, Sendo F, Pyknosis and developmental arrest induced by an opioid receptor antagonist and dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE*, Vol. 12: e0184874, 2017 (査読有)
DOI:10.1371/journal.pone.0184874

Niikura M, Inoue S-I, Mineo S, Asahi H, Kobayashi F, IFNGR1 signaling is associated with adverse pregnancy outcomes during infection with malaria parasites. *PLoS ONE*, Vol. 12: e0185392, 2017 (査読有)
DOI:10.1371/journal.pone.0185392.

(2)総説

井上信一, 小林富美恵, マラリアにおける $\gamma\delta$ T細胞の役割. *細胞*, Vol. 49, p725-729, 2017(査読無)

小林富美恵, 井上信一, 赤内型マラリア原虫感染における防御免疫機構 ~ $\gamma\delta$ T細胞の役割~, *原生動物学雑誌*, Vol. 50: p15-28, 2017 (査読有)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjprotozool/advpub/0/advpub_JJP17-01/_html/-char/ja

遠藤沙佑美, 井上信一, 蔵田訓, 新倉保, 朝日博子, 大崎敬子, 神谷茂, 小林富美恵, マラリア免疫記憶に対するサルモネラ感染の影響. *杏林医学会雑誌*, Vol. 48: s19, 2017 (査読無)

松田理沙, 新倉保, 井上信一, 朝日博子, 小林富美恵, マラリア原虫のプリンヌクレオチド合成を介した新たなエネルギー代謝システムの解明. *杏林医学会雑誌*, Vol. 48: s1-s2, 2017 (査読無)

Asahi H, Kobayashi F, Niikura M, Inoue S-I, Yagita K, Tolba ME, Copper homeostasis for the developmental progression of intraerythrocytic malarial parasite. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, Vol. 16, p3048-3057, 2016 (査読有) DOI: 10.2174/1568026616999160215151704

兼松健也, 井上信一, 新倉保, 朝日博子, 小林富美恵, サルモネラ由来エンドトキシンによるマラリア免疫記憶への影響. *杏林医学会雑誌*, Vol. 47: s1, 2016 (査読無)
井上信一, 免疫細胞のミトコンドリア活性酸素がマラリア感染防御において果たす役割. *杏林医学会雑誌*, Vol. 46: s35-37, 2015 (査読無)

山田悠騎, 井上信一, 新倉保, 小林富美恵, 弱毒株マラリア原虫感染における $\gamma\delta$ T細胞と液性免疫の関連性. *杏林医学会雑誌*, Vol. 46: s1, 2015(査読無)

井上信一, マラリア原虫感染防御における T細胞を介した樹状細胞活性化は感染初期に重要である. *杏林医学会雑誌*, Vol. 46: s41, 2015 (査読無)

[学会発表](計 26 件)

井上信一, 他: $V\gamma 1^+$ $\gamma\delta$ T細胞によるマラリア原虫感染防御機構の解明. 第 87 回日本寄生虫学会大会 2018 年 3 月 17-18 日. Shin-Ichi Inoue, 他: $\gamma\delta$ T cells are crucial for protective immunity against malaria. The 19th Forum Cheju, 2018 年 3

月 16 日 .
Shin-Ichi Inoue , 他 : Immunological memory to malaria is impaired by Salmonella infection . 第 11 回寄生虫感染免疫研究会 , 2018 年 2 月 22-23 日 .
Shin-Ichi Inoue , 他 : Maintenance of immunological memory to malaria is impaired by Salmonella infection . 第 46 回日本免疫学会学術集会 , 2017 年 12 月 12-14 日 .
Shin-Ichi Inoue , 他 : Immunological memory to malaria is affected by Salmonella infection . グローバルヘルス合同大会 2017 2017 年 11 月 24 - 26 日 .
Shin-Ichi Inoue , 他 (教育講演): Protective immunity to malaria. Seminars in Departmental Lecture Theatre of PGIMER, Chandigarh India, September 16, 2017.
井上信一 , 他 : $V\gamma 1^{+}\gamma\delta$ T 細胞はマラリア原虫感染防御を促進することでその機能低下を引き起こす . 第 86 回日本寄生虫学会大会 , 2017 年 5 月 28-29 日 .
Shin-Ichi Inoue , 他 : $\gamma\delta$ T cells are crucial effector cells for protective immunity to malaria. Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within “Strategic International Research Cooperative Program (SICP) ” , March 24, 2017.
Shin-Ichi Inoue , 他 : $\gamma\delta$ T cells are crucial effector cells for protective immunity to malaria. Seminars in PGIMER, Chandigarh, February 22-25, 2017.
Shin-Ichi Inoue , 他 : $V\gamma 1^{+}\gamma\delta$ T cell-exhaustion during *Plasmodium* infection. 第 45 回日本免疫学会学術集会 . 2016 年 12 月 5-7 日 .
井上信一 * , 他 : マラリア原虫感染は $\gamma\delta$ T cell exhaustion を引き起こす . 第 45 回杏林医学会総会 , 2016 年 11 月 19 日 . * 本発表にて第 45 回杏林医学会総会優秀賞を受賞
Shin-Ichi Inoue , 他 : Preferentially expanding $V\gamma 1^{+}\gamma\delta$ T cells are associated with protective immunity against *Plasmodium* infection. The 18th Forum Cheju, Korea, October 28-30, 2016.
Shin-Ichi Inoue , 他 : $V\gamma 1^{+}\gamma\delta$ T cell is a major subset responding to *Plasmodium berghei* XAT infection. The XIX International Congress for Tropical

Medicine and Malaria (ICTMM 2016), Australia, September 18th-22nd, 2016.

井上信一 , 他 : マラリア原虫感染防御における $V\gamma 1^{+}\gamma\delta$ T 細胞の重要性とその疲弊 . 第 27 回日本生体防御学会学術総会 , 2016 年 7 月 7-9 日 .

井上信一 , 他 : マラリア原虫感染防御において樹状細胞を活性化させる $V\gamma 1^{+}\gamma\delta$ T 細胞 . 第 85 回日本寄生虫学会大会 , 2016 年 3 月 19-20 日 .

Shin-Ichi Inoue , 他 : Protective immunity against a low virulent *Plasmodium* infection. Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within “Strategic International Research Cooperative Program (SICP) ” , February 25, 2016.

Shin-Ichi Inoue , 他 : $V\gamma 1^{+}\gamma\delta$ T cells preferentially respond to *Plasmodium* infection. 第 9 回寄生虫感染免疫研究会 , 2016 年 2 月 11-12 日 .

Shin-Ichi Inoue * , 他 : $V\gamma 1^{+}\gamma\delta$ T-cell subset preferentially responds to *Plasmodium berghei* XAT infection. 17th Forum Cheju, Osaka, November 13th, 2015.
* 座長を兼任

井上信一 (招請講演) : $\gamma\delta$ T 細胞によるマラリア免疫防御機構 . BioJapan 2015, 2015 年 10 月 14-16 日 .

井上信一 * , 他 : マラリア原虫感染防御において $\gamma\delta$ T 細胞は原虫抗原特異的抗体産生能の維持に働く . 第 26 回日本生体防御学会学術総会 (シンポジウム) , 2015 年 7 月 10-12 日 . * 座長を兼任

他 6 件の学会発表については省略

〔 図書 〕 (計 0 件)

〔 産業財産権 〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔 その他 〕

ホームページ等

<http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/staff/detail/?id=med52005>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 信一 (INOUE Shin-Ichi)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：20466030

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

横田 夏紀 (YOKOTA Natsuki)

杏林大学・医学部・実験助手