

令和元年5月30日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05183

研究課題名(和文) マラリア原虫感染における新規抑制性細胞Tr27の誘導機構と防御免疫制御機序の解明

研究課題名(英文) Induction mechanisms and the regulatory roles of IL-27-producing regulatory T cells during malaria infection

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：マラリア患者では感染に伴う免疫抑制が知られているが、その機序は十分に理解されていない。我々はマラリア原虫感染マウスで、IL-27依存的に免疫応答を抑制するTr27細胞を報告した。本研究は、Tr27細胞の抗原認識、誘導機構、感染免疫応答制御における役割を明らかにすることを目的とした。抗原認識に関しては、Th1とTr27細胞が異なる原虫抗原を認識する可能性を示唆する結果を得た。誘導機構に関してはIL-27発現を蛍光蛋白でモニターするマウスを作成し、機能に関してはIL-27の組織特異的遺伝子ノックアウトマウスを作成するなど、Tr27細胞を解析する鍵となる材料を揃え、今後詳細な解析を行う準備が整った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは、世界で毎年2億人以上の感染者と50万人近くの死者を出し、最も重要な感染症のひとつである。マラリア感染者では免疫抑制がおり、他の感染に罹りやすかったりワクチン効果が低下することが知られているが、その機序は明らかではない。我々は最近、マラリアのマウスモデルを用い、マラリア原虫感染により誘導される免疫制御性T細胞の存在を報告した。本研究では、この制御性T細胞の性状解析を進めた。マラリア流行地における感染対策や、ワクチン効果改善法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Malaria patients are known to exhibit reduced immune responses, although its mechanisms are unknown. Using a mouse model, we previously reported CD4+ T cells that inhibit the immune responses in IL-27 dependent manner during malaria infection, and named them Tr27 cells. In this study, we aimed to study antigen recognition of Tr27 cells, mechanisms underlying their induction and their regulatory roles during infection. Our data suggested that specific Th1 cells and Tr27 cells recognize distinct Plasmodium antigens. Furthermore, we produced a mouse model to monitor IL-27 expression with a fluorescent protein and conditional gene knock-out mice that lack IL-27 in specific cell populations. These tools are powerful in studying the induction and function of Tr27 cells during infection with malaria parasites.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア T細胞 サイトカイン 感染 寄生虫 防御 制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、世界的に最も重要な感染症のひとつである。感染対策は進みつつあるが、十分に有効なワクチンはできていない。マラリア患者では、感染に伴う免疫抑制、他の病原体への易感染性、過去に受けたワクチン効果の減弱などが知られているが、感染による免疫修飾の機序は十分に理解されていない。我々は、これまでマウスマラリア *Plasmodium berghei* ANKA の感染実験系で、T細胞の免疫制御に関し、以下のことを明らかにしてきた (Kimura et al, Immunity, 2016)。

(1) マラリア原虫感染マウスでは、通常の foxp3⁺制御性細胞に加え、マラリア原虫抗原特異的 (CD11a^{hi}CD49^{dhi}) foxp3⁺CD4⁺T細胞が、他のT細胞のIL-2産生と増殖反応を抑制する。

(2) この原虫抗原特異的 foxp3⁺CD4⁺T細胞は、IL-27を産生し、IL-27依存性にマラリア感染マウスの防御免疫応答を抑制する。この細胞を、Tr27細胞と命名した。

IL-27は、IL-27ファミリーに属するp28とEBI3の二量体サイトカインである。当初Th1誘導に関わるサイトカインとして報告されたが、その後IL-2産生抑制、抑制性サイトカインIL-10産生誘導、Th17細胞の誘導抑制など、免疫制御機能が報告され、制御性サイトカインと位置づけられている。従来、マクロファージや樹状細胞等自然免疫系の細胞がIL-27を産生すると考えられていたが、抗原特異的CD4⁺T細胞がIL-27を産生し、免疫抑制を担うことを初めて解明した。これらの研究成果を踏まえ、本研究では、Tr27細胞の解析を中心課題に据えた。

2. 研究の目的

マラリア原虫感染に伴うTr27細胞の誘導機構と抗原認識を解明するため、以下の疑問に答えるべく研究を計画した。

(1) 原虫抗原特異的Tr27細胞とTh1細胞は、同じ原虫抗原を認識するのか？

(2) ナイーブCD4⁺T細胞原虫抗原を認識して活性化した後、Tr27細胞はTh1細胞と分岐してどのように分化するのか？

(3) Tr27細胞、樹状細胞、マクロファージはいずれもマラリア原虫感染に際してIL-27を産生するが、Tr27細胞の産生するIL-27の制御機能には、自然免疫系細胞の産生するIL-27とは異なる特性がみられるのか？

3. 研究の方法

(1) Tr27細胞の原虫抗原認識

C57BL/6マウスに *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)あるいは *P. chabaudi chabaudi* (Pcc)を感染させ、感染6-7日後に脾臓CD4⁺T細胞を抗CD4 I-Magを用いて精製した。このCD4⁺T細胞を、非感染マウスから調整した樹状細胞と原虫粗抗原存在下で2日間培養し、培養上清中のサイトカインをELISA法で測定した(論文1)。PbAとPccの粗抗原は、感染マウスの赤血球から調整した(論文1)。熱帯熱マラリア原虫粗抗原は、ヒト赤血球を用いた培養 *P. falciparum* から調整した(論文7)。熱帯熱マラリア原虫組換え抗原パネルは、愛媛大学・プロテオサイエンスセンターの高島准教授、坪井教授から供与された。

(2) Tr27細胞の誘導

IL-27を産生するT細胞をモニターするため、IL-27p28遺伝子領域に蛍光蛋白遺伝子Venusをノックインしたマウスを作成した(研究分担者 佐賀大学・吉田教授)。このマウスにPbAあるいはPcc感染を行い、脾細胞のVenus発現を抗体による染色とフローサイトメトリー解析により明らかにした。一方、IFN- γ 産生のTh1細胞は、ジャクソンラボより導入したIFN- γ eYFPノックインマウスを用いてモニターした。

(3) Tr27細胞の機能

マラリア原虫感染におけるIL-27の機能については、IL27ra^{-/-}マウスとコントロールマウスにPccを感染させ、感染経過と免疫応答を原虫血症、脾細胞のフローサイトメトリー解析、ELISA法によるサイトカイン産生解析により行った。一方、IL-27はT細胞、樹状細胞、マクロファージにより産生される。マラリア原虫感染におけるIL-27産生細胞の役割を解明するため、IL-27p28のコンディショナル遺伝子ノックアウトマウスを作成した(大阪大学・山本雅裕教授との共同研究)。

4. 研究成果

(1) Tr27細胞の原虫抗原認識

CD4⁺T細胞のレベルでは、Pcc抗原とPbA抗原の間で強い交叉反応性が認められた(論文1)。そこで、Pcc感染マウスの脾臓CD4⁺T細胞をヒトに感染する熱帯熱マラリア原虫粗抗原で刺激すると、強いIFN- γ 産生を示し、熱帯熱マラリア原虫抗原にも強い交叉反応性を示すことがわかった。そこで、愛媛大学プロテオサイエンスセンターの高島准教授、坪井教授の作成した熱帯熱マラリア原虫組換え抗原のパネルセットを用いてCD4⁺T細胞が応答する原虫抗原をスクリーニングすることにした。組換え抗原は、96穴プレートに分注されているので、これらの抗原で樹状細胞をパルスし、細胞洗浄後Pcc感染マウスから調整したCD4⁺T細胞を加えて48時間培養し、培養上清中のIFN- γ とIL-27をELISA法で測定した。これまでのスクリーニングから、CD4⁺T細胞のIFN- γ を主に誘導する抗原とIL-27を主に誘導する抗原があることが示唆されて

いる。さらにスクリーニングを進め、今後 Th1 細胞と Tr27 細胞により認識される抗原の違いを明らかにする予定である。

(2) Tr27 細胞の誘導

IL-27p28-Venus マウスに PbA あるいは Pcc 感染を行い、抗体による染色後フローサイトメトリ解析を行い IL-27p28 を発現する細胞を同定した。原虫感染により、樹状細胞、マクロファージ、T 細胞に IL-27p28 産生が誘導されることを確認した。IL-27 産生細胞の解析手段を整えることができた。感染の経過とともに発現細胞がどのように変化するのか、今後さらに詳細に調べる予定である。

(3) Tr27 細胞の機能

野生型と IL-27 受容体遺伝子欠損マウスに Pcc 感染を行った。IL-27 受容体遺伝子欠損マウスでは慢性期に原虫血症の低下、CD4⁺T 細胞の抗原特異的 IFN- γ 上昇、IL-10 産生低下がみられ、IL-27 はマラリア慢性期に免疫制御に重要な役割を担っていることが示された(論文準備中)。そこで、大阪大学・山本雅裕教授に作成していただいた IL-27p28-floxed マウスを、LyzM-Cre マウス、CD11c-Cre マウス、Lck-Cre マウスに各々交配し、マクロファージ、樹状細胞、T 細胞に IL-27p28 遺伝子を欠損するマウスを作成した。これらのマウスに Pcc 感染を行い、原虫血症、T 細胞応答を解析した。IL-27 を発現する細胞により、IL-27 欠損の感染免疫応答への影響が異なることを示唆するデータを得ている。今後さらに解析を進め、各細胞の産生する IL-27 のマラリア原虫感染免疫応答における役割を解明する。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. S Nakamae, D Kimura, M Miyakoda, O Skhbaatar, S Inoue, K Yui. Role of IL-10 in inhibiting protective immune responses against infection with heterologous *Plasmodium* parasites. *Parasitology International*, 査読有 70: 5-15, 2019. doi: 10.1016/j.parint.2019.01.003.
2. 由井克之、慢性感染症における IL-27 産生性制御性 T 細胞、医学のあゆみ 特集制御性 T 細胞 研究の現在 査読無 268 (13)、1205-1209、2019
3. M Miyakoda, B Ganchimeg, D Kimura, M. Akbari, H Udonoh, K Yui, Metformin promotes protection of mice infected with *Plasmodium yoelii* independently of T cell expansion, *Frontiers in Immunology*, 査読有 9:2942. 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.02942.
4. LE Holz, J Prier, D Freestone, TM Steiner, K English, DN Johnson, V Mollard, A Cozijnsen, GM Davey, DI Godfrey, K Yui, LK Mackay, I Caminschi, GI McFadden, P Bertolino, D Fernandez-Ruiz and WR Heath. CD8⁺ T cell activation leads to constitutive formation of liver tissue-resident memory T cells that seed a large and flexible niche within the liver. *Cell reports*, 査読有 25: 68-79, 2018. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.094.
5. M Akbari, K Kimura, G Bayarsaikhan, D Kimura, M Miyakoda, S Juriasingani, M Yuda, R Amino, K Yui. Non-specific CD8⁺ T cells and dendritic cells/macrophages participate formation of CD8⁺ T cell-mediated clusters against malaria liver-stage infection. *Infection and Immunity*, 査読有 86 (4) pii: e00717-17, 2018 doi: 10.1128/IAI.00717-17.
6. M Miyakoda, K Honma, D Kimura, M. Akbari, K Kimura, T Matsuyama, K Yui. Differential requirements for IRF4 in the clonal expansion and homeostatic proliferation of naïve and memory murine CD8⁺ T cells, *European Journal of Immunology*, 査読有 48: 1319-1328, 2018. doi:10.1002/eji.201747120.
7. 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. *Parasitology International*, 査読有 67; 284-293, 2018. doi:10.1016/j.parint.2018.01.001.
8. 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*, *Parasitology International*, 66 (3): 227-235, 2017. doi:10.1016/j.parint.2017.01.022.
9. 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, SIRPα⁺ 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. 2017doi: 10.1073/pnas.1711345114.
10. 吉田裕樹、木村大輔、由井克之 IL-27 による免疫抑制 臨床免疫・アレルギー科 査読無 67 (1): 23-29, 2017
11. 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.

Parasitology International, 査読有 65 (5) 502-505, 2016 doi:
10.1016/j.parint.2016.02.011.

12. 木村大輔、由井克之、インターロイキン 27 を産生する CD4 陽性 T 細胞によるマラリア原虫感染防御免疫の制御、臨床免疫・アレルギー科、査読無 66 (6), 560-565, 2016.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 木村大輔、都田真奈、中前早百合、O Sukhbaatar, G Bayarsaikhan、木村一美、Daniel Fernandez-Ruiz, William Heath、原博満、吉田裕樹、由井克之、マラリア原虫治癒後における記憶 CD4+T 細胞の消失は IL-27 依存的である、第 88 回日本寄生虫学会大会、長崎 3 月 15~16 日、2019 年
2. K. Yui, Regulation of protective immune responses by IL-27 during malaria infection, 14th International Congress of Parasitology (ICOPA2018), EXCO, Daegu, Korea, August 19-24, 2018. (Symposium)
3. K Yui, O Sukhbaatar, M Miyakoda, D Kimura, G Bayarsaikhan, S Tsogtsaikhan, H Hara, H Yoshida, D Kimura, Regulation of the immune responses by IL-27 producing regulatory T cells (Tr27 cells) during infection. 6th International Conference; current advances in Microbiology and Immunology, Ikh tengeriin am, Ulanbaatar, Mongolia, June 14-16, 2018
4. K. Yui, Regulation of T cell immune responses and its application towards the innovation in immune therapy, 6th International Conference; current advances in Microbiology and Immunology, Mongolian National University of Medical Sciences, Ulanbaatar, Mongolia, June 14-16, 2018
5. D Kimura, S Nakamae, O Sukhbaatar, M Miyakoda, G Bayarsaikhan, M Akbari, K Kimura, H Hara, H Yoshida, K. Yui, Interleukin-27 regulate the generation of memory CD4+ T cells during malaria infection, 6th International Conference; current advances in Microbiology and Immunology, Ikh tengeriin am, Ulanbaatar, Mongolia, June 14-16, 2018
6. 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、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 病原体の多彩な工房戦略~、第 91 回日本細菌学会総会、福岡国際会議場、福岡、3 月 27~29 日、2018.
7. D Kimura, M Miyakoda, G Bayarsaikhan, S Nakamae, O Sukhbaatar, K Kimura, H. Hara, H. Yoshida, K Yui, Interleukin-27-dependent loss of CD4+ T cell-memory during malaria infection. The 46th annual meeting of the Japanese Society for Immunology, 仙台国際センター、仙台市、12 月 12-14 日、2017
8. D Kimura, S Nakamae, O Sukhbaatar, M Miyakoda, M Akbari, K Kimura, H. Hara, H. Yoshida, K Yui, Interleukin-27 inhibits the generation of memory CD4+ T cells during malaria infection. The 5th annual meeting of the international cytokine and interferon society (ICIS 2017), ANA Crown Plaza Kanazawa, 10/29-10/31, 2017
9. S Nakamae, D Kimura, M Miyakoda, O Sukhbaatar, M Akbari, K Kimura, K Yui, Modulation of T cell responses after infection with Plasmodium berghei ANKA by prior infection with P. chabaudi. 第 16 回あわじしま感染症・免疫フォーラム(口演、ポスター) 淡路夢舞台国際会議場、9 月 5 日~8 日、2017 年
10. D Kimura, M Miyakoda, M Akbari, K Kimura, H Hara, H Yoshida, K Yui, Interleukin-27 inhibits the generation of memory CD4+ T cells after treatment with anti-malaria drug, The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium/Leading program international symposium 2017, 良順会館、長崎市、18-19 May, 2017
11. K. Yui, D. Kimura, M Miyakoda, K. Kimura, H Hara, H Yoshida, 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) 第 45 回日本免疫学会学術集会、那覇、12 月 5-7 日、2016 年
12. K. Yui, D. Kimura, M Hosokawa, H Takeyama, Single cell analysis of CD4+ T lymphocytes producing distinct cytokines during malaria infection, International conference on single cell research 2016, Tokyo, Nov 16-17, 2016.
13. マラリア原虫抗原得的 Foxp3-CD4T 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 月 5、6 日、2016 年
14. D Kimura, M Miyakoda, K Kimura, H Hara, H Yoshida, K Yui, Regulation of the immune responses by Tr27 cells during malaria infection、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 月 6 日~9 日、2016 年
15. D Kimura, Doe H T, M Miyakoda, K Kimura, H Hara, H Yoshida, K Yui, IL-27-producing CD4+ T cells regulate protective immune responses during malaria infection, (Symposia), 16th International Congress of Immunology, Melbourne, 21-26 August, 2016.

16. 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、マラリア原虫感染により誘導される IL-27 産生 CD4⁺ T 細胞、第 27 回生体防御学会、福岡市、7月7～9日、2016年
17. 由井克之（シンポジスト）、木村大輔、都田真奈、木村一美、原博満、吉田裕樹、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、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月13～14日、2016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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：吉田 裕樹

ローマ字氏名：YOSHIDA, Hiroki

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：40260715

研究分担者氏名：木村 大輔

ローマ字氏名：KIMURA, Daisukei

所属研究機関名：神戸女子大学

部局名：健康福祉学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50423637

(2)研究協力者

研究協力者氏名：都田 真奈

ローマ字氏名：MIYAKODA, Mana

研究協力者氏名：中前 早百合
ローマ字氏名：NAKAMAE, Sayuri

研究協力者氏名：バヤルサイハン ガンチメグ
ローマ字氏名：BAYARSAIKHAN, Ganchimeg

研究協力者氏名：キジョギ カロライン
ローマ字氏名：KIJYOGI, Caroline

研究協力者氏名：木村 一美
ローマ字氏名：KIMURA, Kazumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。