

令和元年6月5日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08763

研究課題名(和文) マラリア原虫感染における免疫記憶抑制 - IL-27依存的メカニズムの解明 -

研究課題名(英文) Interleukin-27-dependent loss of CD4 T cell-memory during malaria infection

研究代表者

木村 大輔 (KIMURA, Daisuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：50423637

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)：原虫特異的CD4T細胞応答を解析するために、マラリア原虫抗原特異的T細胞受容体トランスジェニックマウス(PbT-11)を導入した。PbT-11あるいはIL-27受容体欠損(IL-27RK0)PbT-11マウスより精製したCD4T細胞を、野生型およびIL-27RK0マウスへそれぞれ移入し、感染・治療を行った。1ヶ月後、IL-27RK0PbT-11細胞はIL-27RK0マウス中で長期間生存し続け、且つ記憶応答を示したが、野生型マウス中のPbT-11細胞は消失していた。以上のことから、IL-27依存的にマラリア原虫特異的CD4T細胞にアポトーシスが誘導され、免疫記憶の維持を妨げることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアでは免疫記憶が成立しにくいことはよく知られており、マラリアに対する有効なワクチンがこれまでに開発されていない原因の1つでもある。しかしながら、そのメカニズムは未だによくわかっていなかった。本研究の「マラリア原虫特異的CD4T細胞がIL-27依存的にアポトーシスを引き起こす」は、これまで明らかにされていなかった免疫記憶抑制のメカニズムの1つであると考えられ、マラリアにおける免疫記憶抑制の解除法開発へつながるものである。

研究成果の概要(英文)：To examine the response of malaria-antigen specific CD4+ T cells, we used PbT-11 mice that express TCR specific for the malaria antigen. C57BL/6 and Il27raK0 mice were adoptively transferred with CD4+ T cells from PbT-11 and Il27raKOPbT-11 mice, respectively, infected with PbA and were cured by the drug treatment. One month later, Il27raKOPbT-11 cells were maintained in Il27raK0 mice and showed memory responses, while PbT-11 cells almost disappeared from the spleen of C57BL/6 mice, confirming the effect of IL-27 on the survival of memory CD4+ T cells after malaria infection. When the mice were re-challenged with PbA, IL-27p28K0 mice showed little parasitemia, and their CD4+ T cells exhibited enhanced IFN-gamma response, while C57BL/6 mice exhibited high parasitemia levels. These results suggest that IL-27 inhibits the generation of memory CD4+ T cells by accelerating the apoptosis of parasite-specific CD4+ T cells during contraction phase of the immune response against PbA.

研究分野：寄生虫学、感染免疫学

キーワード：マラリア 免疫記憶 抑制 T細胞 IL-27

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

1. 研究開始当初の背景

マラリア制圧困難な理由として、マラリア原虫感染によって宿主免疫応答が抑制されることや、免疫記憶が持続しにくい問題がある。これら問題の機序は明らかでなかったが、近年 T 細胞上の PD-1 などの抑制性受容体の関与が示唆された (Butler et al. *Nat Immunol.* 2012)。一方、我々はマラリア原虫感染マウスモデルにおいて抑制因子 IL-27 を産生する新規制御性 CD4⁺T 細胞「Tr27」が誘導され、CD4⁺T 細胞の IL-2 産生およびクローン増殖を抑制することを報告した (Kimura et al. *Immunity* 2016)。さらに、Tr27 研究の延長線上において、IL-27 が記憶 CD4⁺T 細胞の細胞死を誘導することを示唆する結果を得た。

2. 研究の目的

本研究では、マラリア原虫感染中 IL-27 により記憶 T 細胞の成立・維持が阻害されるという仮説を検証し、その機序を明らかにする。

- (1) 野生型マウスと比較し、IL-27 欠損マウスではマラリア治癒後に記憶 CD4T 細胞が出来やすいのか検証する。
- (2) 野生型と IL-27 欠損マウスを比較し、CD4T 細胞の分化や細胞死の違いについて詳細な解析を行い、記憶 T 細胞成立・維持の違いの機序を明らかにする。
- (3) IL-27 による記憶 T 細胞成立の阻害が、CD4T 細胞の IL-2 産生を抑制することに原因があるのかメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

IL-27 は p28 と EBI-3 の二量体であるため、IL-27 の効果を評価するために IL-27 欠損マウスとして p28^{-/-}マウスを使用する。

- (1) p28^{-/-}マウスでは PbA 感染・治癒後に記憶 CD4T 細胞が出来やすいのか明らかにする
野生型と p28^{-/-}マウスに PbA を感染させ、感染率が十分に上昇した時点(感染後約 6 日目)から 6 日間毎日クロロキンを腹腔投与し治療する。薄層塗抹標本による顕微鏡観察を行い、感染率を毎日モニターして治療の確認をする。
治療完了後から 2 か月間毎週フローサイトメトリーを用いて、末血および脾臓中の PbA 特異的 CD4T 細胞 (CD11a^{hi}CD49d^{hi}) の数や割合の推移をモニターする。
原虫粗抗原で脾臓中の CD4T 細胞を *in vitro* で刺激し、抗原特異的 IFN- γ 産生量を細胞内サイトカイン染色法および ELISA 法を用いて調べる。
治癒した野生型と p28^{-/-}マウスに PbA を再感染させて抵抗性を示すのか感染率をモニターして解析する。
- (2) 野生型と p28^{-/-}マウスにおける CD4T 細胞の分化や細胞死の違いについて明らかにする。
と同様に野生型および p28^{-/-}マウスに PbA 感染および治療を行い、感染率および CD4T 細胞の数をモニターする。
CD4T 細胞表面分子 (CD25、CD69、CD44、CD62L、KLRG-1、CD127、CD11a、CD49d) の発現を野生型と p28^{-/-}マウスとで比較解析し、両者の活性化状態の違いを明らかにする。特にエフェクター細胞 (CD44^{hi}CD62L^{lo}) に着目し、ターミナルエフェクター細胞 (CD127⁻KLRG-1⁺) とメモリー前駆細胞 (CD127⁺KLRG-1⁻) の割合や数に違いがあるか調べる。
すでに得られた解析結果から PbA 特異的 CD4T 細胞は PD-1 や LAG-3 といった抑制シグナル受容体を発現していることがわかっており、これらの受容体発現にも違いがあるのか調べる。
野生型マウスでは PbA 感染治癒後において、特異的 CD4T 細胞が速やかに消失することから細胞死を起こしていることが予想されている。そこで、AnnexinV と 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) でアポトーシス細胞を染色し、野生型と p28^{-/-}マウスで差があるのかフローサイトメトリーで調べる。また、アポトーシスを制御する抗アポトーシス蛋白 Bcl2 の発現についても違いがあるか調べる。
- (3) 我々の研究室は、PbA 感染中におけるモデル抗原 OVA (卵白アルブミン) を用いて抗原特異的細胞をモニターできる系を確立しており、これを利用した解析を行う。
野生型および p28^{-/-}マウスに OVA₃₂₃₋₃₃₉ エピトープを認識する T 細胞受容体トランスジェニックマウス (OT-II) より精製した CD4T 細胞を受け身移入し、OVA を発現する組換え PbA (PbA-OVA) を感染させる。
感染率上昇後抗マラリア薬で治療し、OT-II 細胞が記憶 CD4T 細胞として長期間生存し続けるのか、また活性化状態やアポトーシスについて継時的にフローサイトメトリーを用いて解析する。
クロロキン治療により治癒後 PbA-OVA 再感染によって記憶 OT-II 細胞が増殖するのか解析する。
- (4) IL-27 が直接 CD4T 細胞の分化・維持を阻害しているかを明らかにする。
IL-27 受容体欠損マウスの骨髄細胞 (CD45.2⁺) と野生型マウスの骨髄細胞 (CD45.1⁺) を 1:1 で移入した骨髄キメラマウスを作成する。このマウス内では CD4T 細胞の半分が野生型、半分が IL-27 受容体欠損である。このキメラマウスで PbA 感染実験を行い、各 CD4T

細胞の割合や数、活性化状態およびアポトーシスについて詳細に解析する。もし IL-27 受容体欠損マウスの CD4T 細胞のみ維持されれば、IL-27 が直接 CD4T 細胞の記憶維持を阻害していたことになる。

4. 研究成果

- (1) 野生型マウス (B6) と IL-27 欠損マウス (p28K0) の *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) 感染および治療中における CD4T 細胞を経時的に解析した。活性化状態 (CD44, CD62L, CD25, CD69, CD127, KLRG1) について両者で差は認められず、ターミナルエフェクター細胞やメモリー前駆細胞への分化の違いはなかった。しかしながら、治療開始後において AnnexinV 陽性のアポトーシス細胞が B6 で増加するのに対し、p28K0 マウスでは治療前後で変動しなかった。この結果は、治療後に野生型マウスで CD4T 細胞の数が著しく減少する結果と一致しており、マラリア原虫感染では、IL-27 依存的に CD4T 細胞が急速に死滅し、免疫記憶が維持されないことが示唆された。
- (2) IL-27 による記憶 T 細胞成立の阻害が、直接的・間接的どちらであるのか検証するために、OVA323-339 エピトープを認識する T 細胞受容体トランスジェニックマウス (OT-II) を IL-27 受容体欠損マウス (WSX1K0) バックグラウンドにかけ戻して WSX1K0OT-II マウスを作成した。OT-II (CD45.1) と WSX1K0OT-II (CD45.1/45.2) の CD4T 細胞を、B6 (CD45.2) に受け身移入し、モデル抗原 OVA を発現する組換え PbA (PbA-OVA) を感染・治療させた。OT-II 細胞の割合、細胞表面分子の発現やアポトーシス細胞について調査した。その結果、移入した両 OT-II 細胞は治療後細胞死を起こし同様に減少した。野生型マウス体内では WSX1K0OT-II が生存出来なかったことから、サイトカイン等の T 細胞周囲の環境が重要であることが明らかとなった。IL-27 直接的な要因はこの結果からは明らかには出来ておらず、受け身マウスを WSX1K0 に変えて検証する必要がある。
- (3) IL-27 は p28 と EBI-3 の二量体であるため、これまで IL-27 欠損マウスとして p28^{-/-}を使用して検討してきた。しかし、p28 は単独で IL-30 でもあることから、これまでの結果を IL-27 受容体欠損マウス (WSX1^{-/-}) でも検討した。その結果、p28^{-/-}と同様に WSX1^{-/-}でもマラリア原虫 PbA 感染・治療後において、CD4T の消失は阻止された。このことから、IL-27 が記憶 CD4T 細胞の分化や維持を制御していることが確認できた。さらに、この確認実験の中で、濾胞ヘルパー T 細胞 (CXCR5⁺PD-1⁺) が WSX1^{-/-}で増加していることが明らかとなった。これに伴って胚中心 B 細胞や形質細胞も WSX1^{-/-}でより多く分化し、治療後も長く維持されていることが新たに明らかとなった。この結果は、野生型マウスでは PbA 特異的抗体が認められないのに対し、IL-27 欠損マウスでは高値で検出された過去の結果と一致し、IL-27 欠損マウスが PbA 再感染防御を示す一因と考えられた。
- (4) (2) の結果から IL-27 が間接的に記憶 CD4T 細胞を制御している可能性が示唆された。IL-27 が間接的に記憶 CD4T 細胞を制御している可能性として、IL-2 について着目した。すなわち、IL-27 は CD4T 細胞の IL-2 産生を抑制することや、IL-2 は記憶 T 細胞の分化や再活性化に必要であることの原因からである。そこで、野生型マウスに PbA 感染・治療を行う間リコンビナント IL-2 (rIL-2) を投与して非投与群と比較検討した。その結果、rIL-2 投与により PbA 特異的 CD4T 細胞は増加したが、治療中におけるアポトーシスの割合は変化なく、結果記憶 CD4T 細胞は維持されなかった。今後は IL-7 や IL-15 など記憶細胞維持に関連するほかのサイトカインについても検討する。
- (5) 記憶細胞の解析には抗原特異的細胞のモニターをする必要があるが、これまでは抗原特異的 T 細胞を表面分子 (CD11a^{hi}CD49d^{hi}細胞) で評価するしかなく、表面分子の発現低下なのか細胞が消失したのか判断出来ない課題があった。そこで、マラリア抗原特異的 CD4T 細胞受容体トランスジェニックマウスを導入し、PbT-II 細胞 (CD45.1⁺) を C57BL/6 マウスへ養子移入して PbA を感染させたところ、PbT-II 細胞の割合は感染によって増加、治療により減少し、予備実験結果の再現性を確認できた。さらに、IL-27 受容体欠損マウス (WSX1^{-/-}) バックグラウンドにかけ戻して WSX1^{-/-}PbT-II マウスを作成し、同様の実験を行った。その結果 WSX1^{-/-}PbT-II 細胞のみ、マラリア原虫感染および治療後において長期生存することが確認できたことから、我々の仮説を証明することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Nakamae S, **Kimura D**, Miyakoda M, Sukhbaatar O, Inoue S, Yui K. Role of IL-10 in inhibiting protective immune responses against infection with heterologous *Plasmodium* parasites. *Parasitol Int*. 査読有、9(70):5-15. 2019
DOI: 10.1016/j.parint.2019.01.003.
2. Miyakoda M, Bayarsaikhan G, **Kimura D**, Akbari M, Udono H, Yui K: Metformin Promotes the Protection of Mice Infected With *Plasmodium yoelii* Independently of $\gamma\delta$ T Cell Expansion. *Front Immunol* 査読有、9: 2942, 2018.
DOI: 10.3389/fimmu.2018.02942.
3. Miyakoda M, Honma K, **Kimura D**, Akbari M, Kimura K, Matsuyama T, Yui K. Differential requirements for IRF4 in the clonal expansion and homeostatic

proliferation of naïve and memory murine CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 査読有、48, 1319-1328. 2018

DOI: 10.1002/eji.201747120.

4. Kijogi C, **Kimura D**, Bao L, Nakamura R, Chadeka E, Cheruiyot B, Bahati F, Yahata K, Kaneko O, Njenga S, Ichinose Y, Hamano S, Yui K. Modulation of immune responses by *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children living in the endemic region of Mbita, western Kenya. *Parasitol Int*. 査読有、67(3):284-293. 2018
DOI: 10.1016/j.parint.2018.01.001.
5. Akbari M, Kimura K, Bayarsaikhan G, **Kimura D**, Miyakoda M, Juriasingani S, Yuda M, Amino R, Yui K. Nonspecific CD8⁺ T Cells and Dendritic Cells/Macrophages Participate in Formation of CD8⁺ T Cell-Mediated Clusters against Malaria Liver-Stage Infection. *Infect Immun*. 査読有、22;86(4) : e00717-17.2018
DOI: 10.1128/IAI.00717-17.
6. Bayarsaikhan G, Miyakoda M, Yamamoto K, **Kimura D**, Akbari M, Yuda M, Yui K. Activation and exhaustion of antigen-specific CD8⁺ T cells occur in different splenic compartments during infection with *Plasmodium berghei*. *Parasitol Int*. 査読有、66(3):227-235. 2017.
DOI: 10.1016/j.parint.2017.01.022.
7. 都田真奈、**木村大輔** CLINICAL TOPICS : マラリア原虫感染と T 細胞反応、別冊 BIO Clinica 査読なし、6(2) : 134-137. 2017
<https://www.fujisan.co.jp/product/1281694336/b/1586738/>
8. **木村大輔**、由井克之 特集 I. 免疫機能を制御するサイトカインや受容体の新展開 : 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 査読なし、66(6):560-566. 2016
<http://www.kahyo.com/item/M201612-666>

〔学会発表〕(計 16 件)

1. マラリア原虫感染における IL-27 依存的記憶 CD4T 細胞消失. **木村大輔**, 第一回日本医学会連合 Rising Star リトリート 2019 年 3 月
2. 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. **木村大輔**、都田真奈、中前早百合、Odsuren Sukhbaatar、Ganchimeg Bayarsaikhan、木村一美、Daniel Fernandez-Ruiz、William Heath、原博満、吉田裕樹、由井克之、第 88 回日本寄生虫学会大会 2019 年 3 月
3. Interleukin-27-dependent loss of CD4+ T cell-memory during malaria infection. **Daisuke Kimura**, Mana Miyakoda, Sayuri Nakamae, Odsuren Sukhbaatar, Ganchimeg Bayarsaikhan, Kazumi Kimura, William Heath, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, 第 12 回原虫感染免疫研究会 2019 年 2 月
4. Loss of memory CD4+ T-cells mediated by IL-27 during malaria infection. **Daisuke Kimura**, Mana Miyakoda, Sayuri Nakamae, Odsuren Sukhbaatar, Ganchimeg Bayarsaikhan, Kazumi Kimura, William Heath, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会 2018 年 12 月
5. Interleukin-27 regulates the generation of memory CD4+ T cells during malaria infection. **Daisuke Kimura**, Sayuri Nakamae, Odsuren Sukhbaatar, Mana Miyakoda, Ganchimeg Bayarsaikhan, Masoud Akbari, Kazumi Kimura, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, CURRENT ADVANCES IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY 2018 年 6 月
6. マラリア原虫治癒後における IL-27 依存的免疫記憶 CD4+T 細胞の消失. **木村大輔**、都田真奈、Ganchimeg Bayarsaikhan、中前早百合、Odsuren Sukhbaatar、木村一美、原博満、吉田裕樹、由井克之、第 87 回日本寄生虫学会大会 2018 年 3 月
7. Interleukin-27 dependent loss of memory CD4+ T-cells after malaria infection. **Daisuke Kimura**, Mana Miyakoda, Odsuren Sukhbaatar, Sayuri Nakamae, Ganchimeg Bayarsaikhan, Kazumi Kimura, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, 第 11 回原虫感染免疫研究会 2018 年 2 月
8. Interleukin-27-dependent loss of CD4+ T cell-memory during malaria infection. **Daisuke Kimura**, Mana Miyakoda, Ganchimeg Bayarsaikhan, Sayuri Nakamae, Odsuren Sukhbaatar, Kazumi Kimura, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2017 年 12 月
9. 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、Masoud 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 2017 年 5 月
10. Interleukin-27 inhibits the generation of memory CD4+ T cells after treatment with anti-malarial drug. **Daisuke Kimura**, Mana Miyakoda, Masoud Akbari, Kazumi Kimura, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium 2017 年 5 月

11. Interleukin-27 inhibits the generation of memory CD4+ T cells after recovery from malaria infection. **Daisuke Kimura**, Mana Miyakoda, Masoud Akbari, Kazumi Kimura, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, 第 10 回原虫感染免疫研究会 2017 年 2 月
12. Interleukin-27 inhibits the generation of memory CD4+ T cells against malaria infection. **Daisuke Kimura**, Mana Miyakoda, Masoud Akbari, Kazumi Kimura, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会 2016 年 12 月
13. マラリア原虫治癒後における IL-27 依存的免疫記憶の消失. **木村大輔**, 都田真奈, Masoud Akbari, 木村一美, 原博満, 吉田裕樹, 由井克之, 第 69 回日本寄生虫学会南日本支部大会 2016 年 11 月
14. IL-27-producing malaria-specific CD4+ T cells regulate protective immune responses. **Daisuke Kimura**, Mana Miyakoda, Masoud Akbari, Kazumi Kimura, Hiromitsu Hara, Hiroki Yoshida, Katsuyuki Yui, International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2016 年 9 月
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**, 第 27 回日本生体防御学会学術総会 2016 年 7 月
16. マラリア原虫感染後における IL-27 依存的な免疫記憶の抑. **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 81 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2016 年 5 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔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) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：由井 克之

ローマ字氏名：YUI, Katsuyuki

研究協力者氏名：吉田 裕樹

ローマ字氏名：YOSHIDA, Hiroki

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。