

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07091

研究課題名(和文) 赤血球型マラリア感染における記憶B細胞維持の場の可視化

研究課題名(英文) Visualization of niche where maintains memory B cells in merozoites infection

研究代表者

岸本 英博 (KISHIMOTO, HIDEHIRO)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80251213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウス赤血球型マラリア感染時における記憶B細胞の生存維持の場の可視化とそのサブセットの同定を目的としている。本研究では、群馬大学生体防御学講座にて作製されたGFPとOVAを発現した赤血球型マウスマラリアを使用し、マウスの生体内で可視化する系を用いた。OVA特異的TCR-TgマウスのT細胞を精子移入したマウスに、OVA-GFP-マラリアを感染させ、IFN γ を発現する細胞とOT-I、OT-II T細胞の免疫応答を時系列で解析した。その結果、OVAに対する免疫応答も抗体もほとんど検出されなかった。免疫記憶の応答(二次応答)もOVAに対する免疫応答はごく弱いという結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寄生虫であるマラリアは、免疫応答から逃避する様々な機構を持っている。本研究は、ワクチン効果の基礎となる免疫記憶成立の場の同定とそれに関わる重要な記憶B細胞サブセットの同定を当初の目的としていた。マラリアに対する免疫応答を可視化するために用いたOVA-GFP-マラリアを使用し、OVAをマラリアの新たな仮想抗原としたが逆に、マラリアの免疫回避の新たな機構となることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to visualize the field of memory B cell survival during mouse malaria infection and to identify a subset of memory B cells. In this study, we used mouse malaria that expressing GFP and OVA established in the Department of Biodefense, Gunma University, and to visualize in the mice. OVA-GFP-malaria was infected into mice in which T cells of OVA-specific TCR-Tg mice were transferred, and the immune responses of IFN γ -expressing cells and OT-I and OT-II T cells were analyzed in the various time. As a result, almost no immune response or antibody to OVA was detected. The immunological memory response (secondary response) also resulted in a very weak immune response to the OVA.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア 記憶B細胞

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、亜熱帯・熱帯地域において1年に100万人以上の死者を出す3大感染症の一つである。そのためマラリア感染に対するワクチン開発は、古くから多くの研究者によって試みられてきたが、決定的なワクチンの開発には至っていない。動物実験においてマラリアワクチン開発や免疫応答惹起のターゲットは、赤血球型マラリア（メロゾイト）や肝臓型のスポロゾイト由来の分子が多く試みられている。最近では米国のNIH主導のもと製薬会社サナリアがスポロゾイトを不活化したワクチンの臨床研究が行われ、50%以上の感染防御効果があるという報告が出ている (*Science* 341:1359 (2013))。また、日本でも大阪大学微生物研究所の研究チームによるメロゾイトの膜表面分子の組み替えた改良タンパク質によるワクチンが良い発症防御効果を上げ、大きな規模で臨床試験中となっている (*PLoS One* 8:e64073 (2013))。研究段階であるが、ハマダラ蚊の中での増殖を阻止するワクチンの開発も試みられています。

ワクチン効果の基盤である免疫記憶の構築には、記憶T細胞への分化と共に、記憶B細胞の分化誘導が必須であり、T細胞とB細胞の細胞間の時間経過ごとの統制のとれた情報伝達が重要である。そのためには免疫応答が効率よく起きる“場”が必要であり、その免疫応答の“場”を知ることがワクチン開発の重要な知見になると考える。

マラリア感染は直接、血管から血液中に侵入するため通常の免疫応答に見られる所属リンパ節が存在しない。しかし、スポロゾイトやメロゾイトを利用した感染実験やワクチン研究では、ワクチン効果による再感染に対する予防効果を認めていることから、免疫記憶の確立が起きていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、マウス赤血球型マラリア感染時における記憶B細胞の生存維持の場の可視化とそのサブセットの同定を目的としている。本研究では、複雑な免疫応答を複雑なまま捉え、免疫応答の主な時間軸・場（環境）を可視化することにより病原体特異的で効果的な免疫応答の誘導（ワクチン開発）をゴールとしている。一般的な感染症は、皮膚や粘膜のある一箇所から侵入する事から開始するため、初期免疫応答の場所は所属リンパ節であるが、赤血球型マラリア（メロゾイト）の感染では、メロゾイトが直接、血中に侵入するため感染が即全身に広がる。これまでの私たちの研究から、赤血球型マラリア（メロゾイト）感染において重要な免疫応答の場は脾臓であるという結果を得ている。また一度感染し回復したマウスでは、二度目の感染に対して中和抗体の産生を伴う強い免疫記憶が誘導されることも知られている。記憶B細胞がどこに維持され（生存し）、効果的な抗体を産生するサブセットがどの記憶B細胞分画なのか明確にすることと赤血球型マラリア（メロゾイト）感染の際に重要な免疫記憶形成の“場”である脾臓での免疫応答を詳細に解析することにより「効果的なワクチンの投与方法の開発」に繋がると考えている。

3. 研究の方法

マウス赤血球型マラリアは、マラリア原虫（メロゾイト）: *P. yoelii* 17XNL（非致死株）を使用する。抗原特異的B細胞が、どの臓器・組織に存在するかを確認するために、脾臓、鼠径リンパ節、腸間膜リンパ節、骨髄を解析する。また、マウス赤血球型マラリアに対して正常に免

疫応答が起きているかどうかを確認するために、感染させたマウスの血清を経時的に集め、マウス赤血球型マラリア由来の抗原に対する抗体価を測定する。記憶 B 細胞の存在する臓器・組織を解析するためには、赤血球型マラリア感染が収束した時点（40 日～）で、記憶 B 細胞の表現系（IgG+記憶 B 細胞、プラズマブラスト細胞、長期生存型プラズマ細胞）を持つ細胞が増加しているかをフローサイトメトリー、免疫組織染色法を用いて解析を行う。抗原特異的な B 細胞をトレースするためには B 細胞受容体（抗体）の結合する抗原を色素で標識し、抗原に結合する B 細胞を検出することが重要である。本研究では MSP-1、2 や PfEMP1 等の抗原性の強いマラリア抗原を蛍光色素で標識し、親和力の非常に高い中和抗体を産生する記憶 B 細胞がどこに維持され、どのサブセットが赤血球型マラリア感染防御に主に働いているかの解析を進めることとした。また上記の抗原の精製、標識等が困難であった場合を考え、群馬大学大学院医学系研究科生体防御学講座にて作製された GFP 蛍光タンパク質と鶏のアルブミン (OVA) を発現した赤血球型マウスマラリアを供与していただく事とした。この OVA-GFP-赤血球型マラリアを使用する利点としては、赤血球型マラリアに対する免疫応答のみならず、外来タンパク質である OVA や GFP に対する免疫応答も抗原特異的な応答としてトレース可能な事である。

4. 研究成果

本研究は、マウス赤血球型マラリア感染時における記憶 B 細胞の生存維持の場の可視化とそのサブセットの同定を目的としている。私達は、IFN γ を産生する細胞が蛍光タンパク質を発現するマウスに赤血球型マラリアを感染させる実験系により 1.)赤血球型マラリアに対する免疫応答が脾臓で起きていること、2.)リンパ節や骨髄では免疫応答はほとんど起きていないという結果を得た。他の研究グループによる知見では、マウス赤血球型マラリアに感染し、回復後には強い中和抗体が産生されている事が知られている。初めに私達は、赤血球型マラリア感染時に強い抗原製を持つ MSP-1、2 や PfEMP1 の組み換えタンパク質を作製し、精製したタンパク質を蛍光色素で標識することを目指したが、純度の高い抗原を得ることが困難であった。そこで本研究では、群馬大学大学院医学系研究科生体防御学講座にて作製された GFP 蛍光タンパク質と鶏のアルブミン (OVA) を発現した赤血球型マウスマラリアを使用し、マウスの生体内で可視化する系を用いた。IFN γ 検出マウスに OVA 特異的 TCR を発現する TCR-Tg マウスの T 細

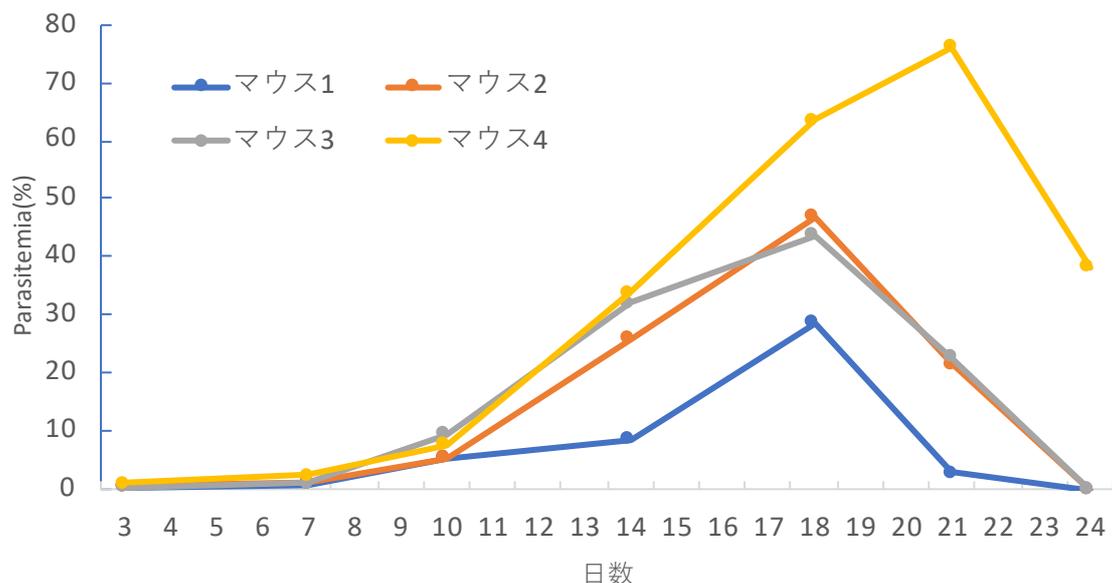


図 1 : OVA-GFPメロゾイト寄生率の変化

胞を嫡子移入したマウスに、OVA-GFP-マラリアを感染させ、IFN γ を発現する細胞と OT-I、OT-II T 細胞の免疫応答を時系列で解析した。また OVA-GFP-マラリア特異的な抗体を検出するためにマラリアの粗タンパク抗原と OVA を抗原として ELISA 法で検出を試みた。初期感染マウスにおいて、OVA 発現マラリアの感染は 18 日をピークに 30 日後には排除されている (図 1)。この時の血清抗体価を ELISA 法で検出するとマラリアの粗タンパク抗原に対しては抗体を検出したが、OVA に対する抗体もほとんど検出されなかった。また、嫡子移入された OT-I、OT-II T 細胞の細胞表面マーカーによる解析でも、OT-I、OT-II T 細胞がマラリア感染させていないマウスと比較して優位に活性化した変化を認めることができなかった。次に OVA-GFP マラリアの感染から回復したマウスに二度目の OVA-GFP-マラリアを感染させ、免疫記憶の応答(二次応答)を ELISA 法で解析した (図 2)。マラリアの粗タンパク抗原に対しての抗体価は初期応答時に比べ著しく上昇したが、OVA に対する免疫応答はごく弱いもので、抗体産生も非常に少ないという結果となった。また、OT-I、OT-II T 細胞を嫡子移入していない正常な B6 マウスのが、OVA-GFP-マラリアを効率よく排除するという結果が得られた。今回の研究では、OVA 特異的 T 細胞が存在することにより逆に OVA を発現したマラリアに対する免疫応答が減弱するという驚くべき結果を得ることができた。

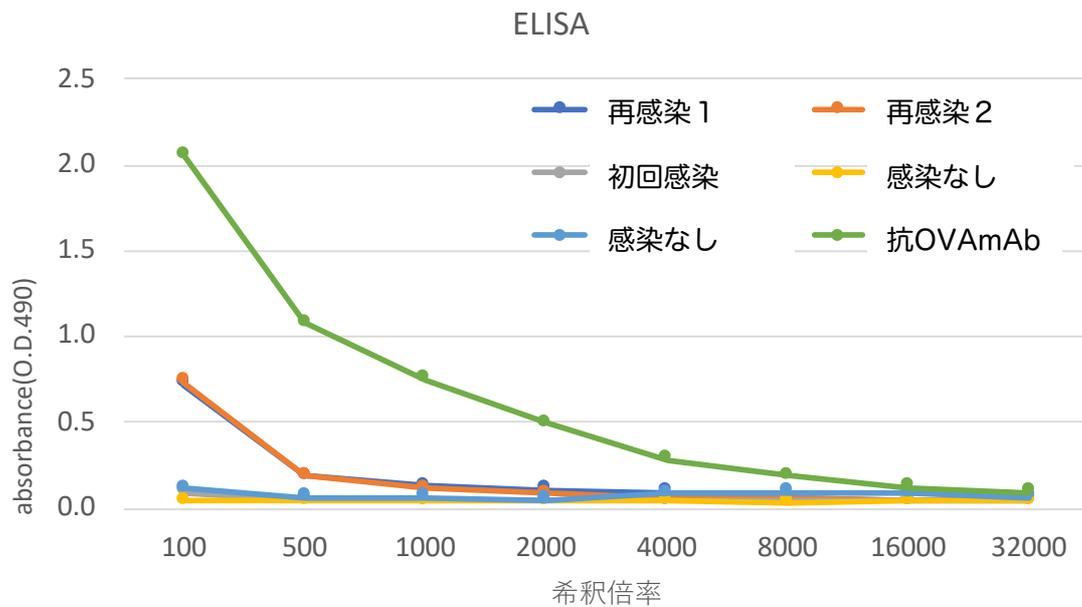


図 2 : OVA-GFPメロゾイト感染マウス血清のOVAに対する抗体価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishi Y, Murakami A, Murayama Y, Tsukahara N, Okamoto S, Nakachi S, Morichika K, Tamaki K, Noguchi H, Matsushita M, Karube K, Fukushima T, Morishima S, Kishimoto H, Masuzaki H	4. 巻 55
2. 論文標題 Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate bone marrow aplasia related with graft-versus-host disease in experimental murine models.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transpl Immunol.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.trim	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 當眞弘, 岸本英博	4. 巻 30
2. 論文標題 沖縄近海で獲れる魚介類のアニサキス科幼虫について.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床寄生虫誌	6. 最初と最後の頁 77-79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Murakami A, Hashiguchi S, Yonamine S, Suenari Y, Miyahara R, Hashimoto M, Kishimoto H
2. 発表標題 Bacteriophage-delivered peptide vaccine capable of inducing immediate and strong IgG antibody production
3. 学会等名 International Immunological Memory and Vaccine Forum (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kishimoto H, Yoshida M, Tsukahara N, Matsubara T, Nakayama H, Murakami A
2. 発表標題 Rapid modification of specificity and affinity of anti-influenza VHH antibody using two in vitro evolution methods
3. 学会等名 Immunology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 當眞弘, 岸本英博
2. 発表標題 沖縄近海で獲れる魚介類のアニサキス幼虫について - 予報 -
3. 学会等名 第30回日本臨床寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 當眞弘, 半仁田優子, 屋我栄, 岸本英博
2. 発表標題 ヒトヒフバエDermatobia hominis による皮膚ハエ幼虫症の2例
3. 学会等名 第60回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murakami A, Motohashi M, Tsukahara N, Yonamine S, Koshimoto H.
2. 発表標題 Rapid VHH antibody isolation and in vitro specificity and affinity modifications against diverse influenza hemagglutinins
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------