

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07094

研究課題名（和文）マラリア免疫における T細胞疲弊の意義とその分子基盤の解明

研究課題名（英文）Molecular basis of gamma delta T cell exhaustion during malaria

研究代表者

井上 信一（INOUE, Shin-Ichi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（医学系）・准教授

研究者番号：20466030

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）：マラリア患者において、T細胞はマラリア原虫感染赤血球に対して免疫応答する細胞の中で非常に高い反応性をもつ細胞であることから、マラリア防御免疫やマラリア免疫病態におけるT細胞の役割を解明することは極めて重要である。最近、マラリア原虫に頻回感染した患者では、このT細胞が“T細胞疲弊”という現象を起こしていることが示唆されている。マラリア原虫感染により疲弊状態となったV₁₊V_{6.3} T細胞のマイクロアレイ解析を行うことで、T細胞疲弊の発生機序の解明に向けた手がかりとなる分子群を明らかにした。その機能的意義の解明については、今後の研究結果が待たれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞は様々な病原体に対する免疫応答のみならず、自己免疫疾患やガン免疫においても重要な役割を担うことが知られている。しかし、“T細胞疲弊”に関する報告はほとんど無い。生体内でT細胞疲弊が起こっていることが発見されたのがつい最近であるために、非常に新規性の高い研究対象である。本研究では、T細胞疲弊が起こる分子機序の手がかりとなる分子群を明らかにすることができた。そして、本研究が推進されることで得られる知見は、マラリア免疫のみならず、T細胞が関与する種々の感染免疫や自己免疫疾患やガン免疫などの様々な研究に波及効果をもたらすと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Previous reports have shown that T cells are important for the elimination of malaria parasites in humans and mice. However, how T cells are involved in protective immunity against blood-stage malaria remains unknown. Recently it has been reported that repeated infection of *Plasmodium falciparum* associated with loss and dysfunction of V₂₊ T cells. Here we investigate the molecular mechanism of T cell exhaustion by microarray analysis using mouse malaria model. We found candidates of the T cell exhaustion-associated molecules.

研究分野：感染免疫学

キーワード： T細胞 マラリア T細胞疲弊

1. 研究開始当初の背景

T細胞は、細菌やウイルスや寄生虫などの様々な病原体に対する免疫応答において重要な役割を担う自然免疫様リンパ球の一つである。マラリア患者の脾臓や血液において T細胞が増加すること、そしてマラリア原虫感染赤血球とヒト末梢血の単核細胞画分を共培養すると T細胞が最も高い割合で炎症性サイトカインを産生することから (Stanisic et al., *J. Infect. Dis.*, 2014)、 T細胞はマラリア感染に対して何らかの影響を与えることが推測されてきた。しかし、その詳細は不明であった。代表者は、マウスマラリアモデルを用いて、 T細胞は感染初期に IFN- γ の産生と CD40 Ligand の発現を介して樹状細胞の活性化を促進し、その下流の Th1 応答を誘導することによりマラリア原虫の排除に寄与しているという感染防御機構を解明した (Inoue et al. *PNAS* 2012& *FEBS Lett.*, 2014)。最近、他の研究グループより、マラリア原虫に頻回感染した患者では末梢血内の T細胞数が減少し、サイトカイン産生能が低下する現象がみられることが報告された (Jagannathan et al., *Sci. Trans. Med.*, 2014)。これは、 T細胞が “ T細胞疲弊 (T cell exhaustion) ” を引き起こすことを示唆するものであった。T細胞疲弊は、ウイルスの慢性感染において CD8⁺ キラーT細胞が引き起こす現象として良く知られている。しかし、 T細胞ではどのようにしてT細胞疲弊が誘導されるのか、その疲弊 T細胞がマラリア防御免疫にどう影響しているのかは全くの謎である。

T細胞疲弊は、ウイルスの慢性感染やガン組織などにおいて持続的な抗原刺激を受けた T細胞の機能が抑制される現象のことであり、主に CD4⁺ヘルパーT細胞や CD8⁺キラーT細胞において報告されている。表現型としては、サイトカイン産生が抑制され抑制性レセプターが強く発現することが挙げられる。極めて最近、代表者は、弱毒株マラリア原虫感染マウスにおける T細胞の免疫応答の解析により、脾臓の T細胞が感染初期に活性化して IFN- γ 産生能を向上させるものの、感染後期になると IFN- γ 産生能が低下し、抑制性レセプター群 (PD-1, LAG-3, TIM-3) を強発現するようになることを発見した (Inoue et al., *Eur. J. Immunol.*, 2017)。ただし、依然として T細胞疲弊については、その誘導機序やマラリア免疫における機能が未解明のままであった。

これまでの研究では、T細胞疲弊は “ 機能不全に陥って細胞死に至るまでの過渡期 ” の状態であると考えられていた。しかし、最近、T細胞疲弊を引き起こした CD8⁺キラーT細胞は、単に機能不全に至る過渡期状態ではないとする報告がされた。疲弊表現型をもった CD8⁺キラーT細胞は、その応答能力はやや減弱するもののウイルス感染防御においてより効果的に働くということが分かったのである (Utzschneider et al., *Nat. Immunol.*, 2013)。したがって、疲弊期 T細胞もマラリア感染防御に働く可能性が十分に考えられる。また、疲弊表現型をもった T細胞は記憶 T細胞となる移行状態なのかもしれない。このように、 T細胞疲弊という現象には様々な興味深い謎と可能性が秘められているのである。

2. 研究の目的

本研究では、マラリアにおける T細胞の機能変化を基軸として、その獲得免疫系への影響とマラリア感染防御との関係を視野に入れつつ、 T細胞疲弊の誘導・解除の分子基盤を解明することを目的とする。この目的を達成するため、以下に到達目標を設定する。

- (1) T細胞疲弊における遺伝子発現変化の解明、(2) T細胞疲弊の誘導・解除条件の解明、(3) T細胞疲弊がマラリア防御免疫に与える影響の解明

3. 研究の方法

「研究の目的」で挙げた各目標を達成するための研究計画・方法を説明する。

- (1) T細胞疲弊における遺伝子発現変化の解明

Naïve C57BL/6 マウス、そして弱毒株マラリア原虫 *Plasmodium berghei* XAT の感染 5 日目 (

T細胞の活性化期)と感染 14 日目(T細胞の疲弊期)のマウスより T細胞をフローサイトメーターで分取して、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析をする。サイトカイン遺伝子発現の変化や転写因子遺伝子の変化を中心に比較解析する。現在、各サンプルの数個体(n=2-3)のアレイ解析は完了している。今後は、追加のアレイ解析とそのデータ解析を進める予定である。これまでの解析により、感染 5 日目で IFN- 発現レベルの増加と感染 14 日目で IFN- 発現レベルが naïve と同等になっていることが確認されたことから、アレイ解析結果は信頼出来ることが強く示唆された。

(2) T細胞疲弊の誘導・解除条件の解明

T細胞疲弊の誘導に重要な条件は分かっていない。そこで、naïve マウスから T細胞を分取して、*in vitro*培養系にて各種の刺激(TCR 刺激、サイトカイン刺激、抗原刺激等)をおこない、 T細胞疲弊の誘導される条件を明らかにする。評価は、 T細胞による IFN- 等のサイトカイン産生を調べ、抑制性レセプターの発現をフローサイトメーターで解析することによりおこなう。また、*P. berghei* XAT 感染 14 日目のマウスから疲弊期 T細胞を分取して、レンチウイルスベクターを用いた各種遺伝子の強制発現もしくは siRNA 誘導による発現抑制をおこない、IFN- 産生能力を指標にして T細胞疲弊の解除に重要な遺伝子やシグナル経路の特定をする。また、各種シグナル経路の活性化薬や阻害薬の添加培養実験をおこなうことで、 T細胞疲弊の解除に重要な遺伝子やシグナル経路を特定する。標的候補とする遺伝子やシグナル経路については、でのマイクロアレイ解析の結果を参考にする。

(3) T細胞疲弊がマラリア防御免疫に与える影響の解明

疲弊期 T細胞のマラリア感染防御における重要性を検証するため、まず naïve C57BL/6 マウスに *P. berghei* XAT を感染して、感染 14 日目(疲弊期)以前から PD1、PDL1、PDL2 抗体などの注入により、 T細胞疲弊が解除されるのかを確かめる [フローサイトによる IFN- 産生能の解析] また、それらの抗体投与が感染防御に対してどう影響するのかを確かめる [原虫感染赤血球の推移と生存曲線] そして、 T細胞疲弊の解除は、マラリア感染防御に働く獲得免疫細胞であるヘルパーT細胞の Th1 応答や抗体産生に対してどのように影響するのか解析する[フローサイト解析、ELISA、組織免疫染色]。

さらに、Rag2 KO マウスへ以下の 3 つの細胞群(A)~(C)を移入した後に *P. berghei* XAT を感染して、疲弊期 T細胞がマラリア感染防御に重要な働きを持つのかを確認する [原虫感染赤血球の推移と生存曲線] そして、感染後経時的に T細胞の機能解析をすることで、疲弊期 T細胞が免疫記憶 T細胞に成り得るのかを確認する[フローサイト解析]。移入ドナー (A) : naïve マウスの脾細胞 (B) : T細胞を除去した naïve マウスの脾細胞 (C) : T細胞を除去した naïve マウスの脾細胞 + 疲弊期 T細胞

4 . 研究成果

T細胞疲弊における遺伝子発現変化の解明を目指すにあたり、マラリア感染経過に対する T細胞の遺伝子発現の変化をマイクロアレイ解析により明らかにすることとした。本研究の開始後に、マウスマラリアモデルにおいて最も応答性の高いサブセットが V 1⁺V 6.3⁺ T細胞であることが報告された (Mamedov et al. Immunity 2018)。 *Plasmodium berghei* XAT 感染実験系でも同様にして、V 1⁺V 6.3⁺ T細胞が非常に応答性の高いサブセットであり感染 14 日目には脾臓 T細胞中の 7~8 割を占めるまでになることを確認した。そこで、マイクロアレイ解析の対象サンプルを V 1⁺V 6.3⁺ T細胞へと変更することとした。Naïve C57BL/6 マウス、そして *Plasmodium berghei* XAT の感染 7 日目(T細胞の活性化期)と感染 14 日目(T細胞の疲弊期)のマウスより V 1⁺V 6.3⁺ T細胞をフローサイトメーターで分取して、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。当初の計画では、 T細胞の活性化期のサンプルを感染 5 日目としたが、予備実験の結果からより活性化の傾向が見られる 7 日

目に変更した。それぞれの結果を比較解析する。感染初期で IFN- γ 発現レベルが増加し、感染後期で IFN- γ 発現レベルが低下するとともに抑制性レセプターの発現が増加することが確認された。フローサイトメーターを使った個別の解析結果でも同様の結果を得ることができた。主成分解析からこのマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果は信頼出来ることが強く示唆された。マイクロアレイの結果から、V β 1 γ 6.3 $^{+}$ T 細胞は感染初期において M-CSF や CCL4, 5 といったケモカインが強く発現上昇していることがわかった。また、感染 14 日目においてヒストンメチル化に關与する遺伝子が発現上昇していることがわかった。ただし、これに関しては、CD8 $^{+}$ T 細胞の T 細胞疲弊に関する報告では見られていない遺伝子であった。また、感染 14 日目において、CD8 $^{+}$ T 細胞の T 細胞疲弊に關与するいくつかの転写因子の発現上昇が見られた。このことは、T 細胞疲弊が CD8 $^{+}$ T 細胞疲弊とある程度の同一性を持った機構で誘導されている可能性を示唆している。

次に、T 細胞疲弊の誘導・解除条件の解明するにあたり、IFN- γ レポーターマウスを用いて、その非感染マウスから T 細胞を分取し、*in vitro* 培養系にてマラリア原虫抗原刺激をおこなった。T 細胞による IFN- γ サイトカイン産生を調べ、抑制性レセプターの発現をフローサイトメーターで解析したが、抗原刺激の有無によりそれらの産生や発現に有意差は見られなかった。これは、いくつかの原因が考えられる。まず、*Plasmodium berghei* XAT から調製したマラリア原虫抗原に問題があった可能性。そして、そもそもマウスの T 細胞はマラリア原虫抗原単独刺激では活性化誘導が起らない可能性が考えられた。今後は、サイトカイン刺激やその他の細胞(単球などのアクセサリー細胞)との共培養系を検討することを計画している。マイクロアレイ解析によって検出されたヒストンメチル化に關与する遺伝子のコードするタンパク質と T 細胞の T 細胞疲弊の關連性を調べるため、*P. berghei* XAT 感染マウスにそのタンパク質に対する阻害剤を投与して T 細胞疲弊表現型に変化が見られるのか検討した。その結果、阻害剤を投与したマウスでは、抑制性レセプター発現の低下が見られたが IFN- γ 産生には影響が見られなかった。このことは、このヒストンメチル化タンパク質が、部分的に T 細胞疲弊の誘導に影響していることを示している。また、レンチウイルスベクターを用いた各種遺伝子の強制発現もしくは siRNA 誘導による発現抑制については、今現在実験型を立ち上げているところである。

続いて、疲弊期 T 細胞のマラリア感染防御における重要性を検証するため、まず naïve C57BL/6 マウスに *P. berghei* XAT を感染して、感染 14 日目(疲弊期)以前から PD1、PDL1、PDL2 抗体などの注入により、T 細胞疲弊が解消されるのかを確かめたが、大きな変化は見られなかった。したがって、抑制性レセプターシグナルは T 細胞疲弊の誘導に影響していないと考えられた。また、それらの抗体投与により原虫感染赤血球の推移や生存曲線に大きな変化は見られなかった。また、Rag2 KO マウスへ(A) naïve マウスの脾細胞をまず移入して、その後 *P. berghei* XAT を感染して原虫感染赤血球の推移と生存曲線を確認した。予想に反して、移入していないコントロールと同様に、(A) naïve マウスの脾細胞を移入したマウスでも *P. berghei* XAT 感染を制御できずに全個体が死亡することがわかった。これは Rag2 KO マウスに生着する CD4 $^{+}$ T 細胞や B 細胞がその感染コントロールに不十分であったと推測できる。そこで、別の感染モデルである *Plasmodium chabaudi chabaudi* を用いて、同様に(A) naïve マウスの脾細胞を移入した Rag2KO マウスに感染を行なった。すると、移入なしのコントロール Rag2KO マウスは 1 ヶ月後には非常に高い原虫感染赤血球率を示したが、naïve マウスの脾細胞を移入した Rag2KO マウスは原虫赤血球率を非常に低い割合まで制御することがわかった。そこで、今後は、この *Plasmodium chabaudi chabaudi* 感染モデルを用いて、(B) T 細胞を除去した naïve マウスの脾細胞や(C) T 細胞を除去した naïve マウスの脾細胞 + 疲弊期 T 細胞の移入を行い、疲弊期 T 細胞のマラリア感染防御における重要性を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Sukhbaatar O, Kimura D, Miyakoda M, Nakamae S, Kimura K, Hara H, Yoshida H, Inoue SI, Yui K.	4. 巻 74
2. 論文標題 Activation and IL-10 production of specific CD4+ T cells are regulated by IL-27 during chronic infection with Plasmodium chabaudi.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 101994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2019.101994.	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 Niikura M, Fukutomi T, Fukui K, Inoue SI, Asahi H, Kobayashi F.	4. 巻 76
2. 論文標題 G-strand binding protein 2 is involved in asexual and sexual development of Plasmodium berghei.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 102059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2020.102059.	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Nakamae Sayuri, Kimura Daisuke, Miyakoda Mana, Sukhbaatar Odsuren, Inoue Shin-Ichi, Yui Katsuyuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Role of IL-10 in inhibiting protective immune responses against infection with heterologous Plasmodium parasites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 5~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2019.01.003	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Inoue Shin-Ichi, Niikura Mamoru, Asahi Hiroko, Kawakami Yasushi, Kobayashi Fumie	4. 巻 155
2. 論文標題 T cells modulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 519~532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/imm.12997	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Niikura Mamoru, Inoue Shin-Ichi, Fukutomi Toshiyuki, Yamagishi Junya, Asahi Hiroko, Kobayashi Fumie	4. 巻 185
2. 論文標題 Comparative genomics and proteomic analyses between lethal and nonlethal strains of Plasmodium berghei	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Parasitology	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.exppara.2018.01.001	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 井上信一、小林富美恵、由井克之	4. 巻 71
2. 論文標題 マラリアに対する防御免疫において T細胞が果たす役割	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 252-257
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13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shin-Ichi Inoue, Bayarsaikhan Ganchimeg, Jian Jiun-Yu, Odsuren Sukhbaatar, Ntita Mbaya, Tsogtsaikhan Sanjaadorj, Malou Maccalino, Kazumi Kimura, Hiroko Asahi, Mamoru Niikura, Fumie Kobayashi, Katsuyuki Yui
2. 発表標題 T cell-exhaustion during Plasmodium infection
3. 学会等名 第13回寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井上信一、Bayarsaikhan Ganchimeg、 Jian Jiun-Yu、 Odsuren Sukhbaatar、 Ntita Mbaya、 Tsogtsaikhan Sanjaadorj、 木村一美、 新倉保、 小林富美恵、 由井克之
2. 発表標題 T cells regulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-Ichi Inoue
2. 発表標題 Roles of T cells in protective immunity to malaria
3. 学会等名 2nd Medical Sciences Cluster Infectious Disease Symposium & 14th NUS-Nagasaki Joint Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上信一, Bayarsaikhan Ganchimega, Jian Jiun-Yua, Odsuren Sukhbaatar, Ntita Mbayaa, Tsogtsaikhan, Sanjaadorja, 木村一美, 新倉保, 小林富美恵, 由井克之
2. 発表標題 マラリアによる T細胞疲弊の誘導
3. 学会等名 2019年度日本寄生虫学会南日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-Ichi Inoue, Bayarsaikhan Ganchimeg, Jian Jiun-Yu, Odsuren Sukhbaatar, Ntita Mbaya, Tsogtsaikhan Sanjaadorj, Kazumi Kimura, Mamoru Niikura Fumie Kobayashi, Katsuyuki Yui
2. 発表標題 T cells play a crucial role for protective immunity to Plasmodium infection
3. 学会等名 ID-RiPS
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi, Katsuyuki Yui
2. 発表標題 T cells modulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection
3. 学会等名 第71回 日本寄生虫学会 南日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Mamoru Niikura, Fumie Kobayashi
2. 発表標題 Preferential response of V 1+ T cells during Plasmodium berghei infection
3. 学会等名 第47回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi, Katsuyuki Yui
2. 発表標題 T cells modulate humoral immunity against Plasmodium berghei infection
3. 学会等名 第88回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi
2. 発表標題 T cell-related protective immunity against Plasmodium berghei
3. 学会等名 ICOPA2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi
2. 発表標題 Role of T cells in protective immunity against malaria
3. 学会等名 Scientific Symposium of Japan-India Research Exchange Projects within "Strategic International Research Cooperative Program (SICP)" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi
2. 発表標題 T cells are crucial for protective immunity against malaria.
3. 学会等名 The 19th Forum Cheju
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichi Inoue, Mamoru Niikura, Hiroko Asahi, Fumie Kobayashi
2. 発表標題 V 1+ T細胞によるマラリア原虫感染防御機構の解明.
3. 学会等名 第87回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue SI, Niikura M, Asahi H, Kurata S, Osaki K, Kamiya S, Kobayashi F
2. 発表標題 Immunological memory to malaria is impaired by Salmonella infection
3. 学会等名 第11回寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/im/introduction/index.html
--

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
研究 分 担 者	小林 富美恵 (KOBAYASHI Fumie) (20118889)	麻布大学・生命・環境科学部・客員教授 (32701)	
研究 分 担 者	新倉 保 (NIIKURA Mamoru) (30407019)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	

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			
インド	PGIMER			