

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19590433
研究課題名 (和文) 新規アポトーシス抑制因子によるマラリア原虫感染での病態修飾機構の解析
研究課題名 (英文) Apoptosis inhibitor expressed by macrophages regulates the murine malaria development
研究代表者 渡部 久実 (WATANABE HISAMI) 国立大学法人 琉球大学・分子生命科学研究センター・教授 研究者番号：50143756

## 研究成果の概要：

本研究では、自然免疫担当細胞であるマクロファージ(MΦ)が産生する新規アポトーシス抑制因子(AIM)を欠損するマウスを用い、マラリア原虫感染におけるNKT細胞及び $\gamma\delta$ T細胞の活性化機能制御とMΦの関係性を明らかにし、新しい視点での感染防御機構だけでなく病態形成の機序について検討を加えた。その結果、マラリア感染症においては、MΦの機能としての食食作用による病原体の排除やそれに伴う炎症反応の惹起にAIMが深く関与しており、その機能制御が予防・治療に有効である可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：ネズミマラリア原虫、自然免疫機構、アポトーシス抑制因子、マクロファージ、原虫の排除、食食能亢進、炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マラリアワクチン開発の基礎的研究として、マラリア原虫に対する宿主の免疫応答、特に感染防御と病態形成機構の解明に、マウスモデルとヒトマラリア患者検体を用いて取り組んできた。その成果として、マラリア原虫感染に対する防御機構としての自然免疫系が果たす役割、特にNKT細胞サブセットや $\gamma\delta$ T細胞の重要性が指摘できた。中でも、NKT細胞は自然免疫としての感染初期防御を担うだけでなく、獲得免疫機構、特に細胞性免疫と液性免疫のバランス

(Th1/Th2 バランス)を制御する機能を有することが明らかになり、免疫応答を制御する重要な細胞であることも明らかになってきた。一方、マクロファージ(MΦ)や樹状細胞(DC)は免疫監視細胞、抗原情報運搬細胞、抗原提示細胞として獲得免疫機構を動かすが、病原微生物の構成成分を認識するToll様受容体(TLR)を通じて、抗原提示を必要とせず、細胞内シグナル伝達系を直接活性化できることも分かっていた。これまでのMΦ/DCの機能は免疫応答を正に制御する側面が注目されてきたが、その機能解析が進むにつ

れ、免疫応答の質はMΦ/DCの成熟状態や活性化によって左右され、応答を抑制・不活性化する負の制御も担うことも明らかになってきた。

これらの点を踏まえ、近年解析が進んだMΦの機能を解析することで、マラリア感染において重要な働きをする自然免疫系の一員としてのMΦに焦点を当て、NKT細胞やγδT細胞の制御機構との関連を明らかにすることは重要な課題と考えられた。

## 2. 研究の目的

生体防御におけるMΦの機能としては、貪食作用による感染防御や感染による炎症反応の沈静に重要な役割を果たすことが知られている。近年、このMΦ内における特異的な遺伝子発現のネットワークの解析が進み、MΦの機能の一つであるコレステロールや脂質制御に関与する核内レセプターとしてLiver X receptor (LXL)やRetinoid X receptor (RXR)が同定され、このレセプターがアポトーシス抑制因子の発現をも制御することが明らかになり、MΦの感染防御や炎症反応抑制の機構がより詳細になってきた。すなわち、アポトーシスは形態形成や細胞分化のみならず多くの炎症性疾患、変成疾患などの病態生理に関与していることが示唆されており、このアポトーシスが関与する疾患のメカニズムの解明は、その治療法の確立に重要である。

本研究で取り上げる新規アポトーシス抑制因子AIM(apoptosis inhibitor expressed by macrophages)は、マクロファージスカベンジャーレセプターのシステインリッチドメインスーパーファミリーの一つとして見いだされ、腹腔内マクロファージや肝臓のkupffer細胞/MΦにその発現が強く見られている。研究代表者は、AIMの生体内機能に注目しAIMを欠損するマウス(AIM<sup>-/-</sup>)を用いて、細菌感染による肝臓の炎症性病態モデルとしての*C. parvum*により誘導される肝肉芽腫形成を解析し、kupffer細胞/MΦからのAIMがNKT細胞の動態を制御し病態の沈静化に関与することを明らかにした(Kuwata, K., Watanabe, H., et al., *Am. J. Pathol.* 162: 837-847, 2003)。

本研究では上記の研究成果に基づき、ネズミマラリア原虫*P. yoelli* 17XNL(非致死株)感染におけるNKT細胞サブセットの機能制御に関しても、AIMが深く関与するとの仮説を立て、マラリア原虫感染におけるNKT細胞及びγδTの活性化機能制御とMΦの関係を明らかにし、新しい視点での感染防御機構だけでなく病態形成の機序について検討を加えることを目的とした。最近、AIM

の機能制御が動脈硬化の予防・治療に有効である可能性が報告されており、マラリア感染防御への臨床応用も期待できると考えられた。

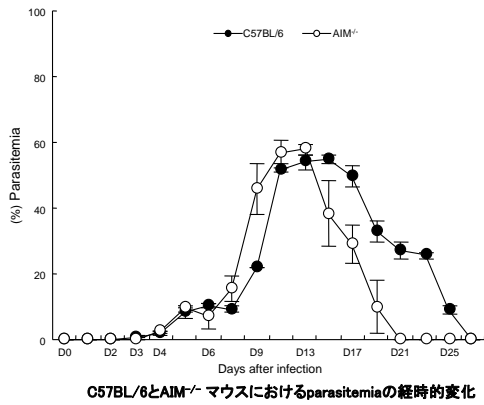
## 3. 研究の方法

ネズミマラリア原虫*Plasmodium yoelli* 17XNL(非致死株)の赤内型虫体(10<sup>4</sup>)を、野生型であるC57BL/6(B6)マウスと前述のAIM欠損マウス(AIM<sup>-/-</sup>)に感染させる実験系を用いた。(1) Parasitemiaの経時的変化は常法のギムザ染色を用いた。(2)免疫臓器としての肝臓からのリンパ球の分離は比重遠心法を用い、その性状解析はFlowcytometry法によった。(3) γδT細胞のレポートワー解析は、RT-PCR法とFlowcytometry法を用いた。(4) 血清サイトカインレベルの解析はELISA法とcytokine beads array(CBA)法を用いた。(5) 感染に伴う肝臓の病理学的解析は、肝臓の指標となる血清トランスアミラーゼレベルと免疫組織染色による細胞浸潤の動態を調べることにより評価した。(6)マラリアの重症度とその回復を、炎症性サイトカイン(TNF-α)と抗炎症性(調節性)サイトカイン(IL-10とTGF-β)産性のバランスにより解析するために、磁気ビーズにより分離した肝局在MΦと骨髄細胞からGM-CSFとIL-4の添加培養により誘導したMΦを用いて、*in vitro*でLPS刺激を行い、得られた培養上清を用いて測定した。

## 4. 研究成果

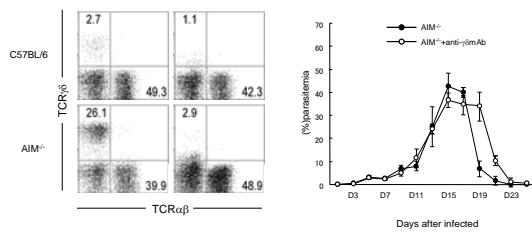
これまでの研究成果から、AIM欠損(AIM<sup>-/-</sup>)マウスにネズミマラリア原虫*Plasmodium yoelli* 17XNL(非致死株)を感染させると、①AIM<sup>-/-</sup>マウスではparasitemiaのピークは感染2週間前後と野生型のC57BL/6(B6)マウスと同様であったが、原虫は約3週間でB6マウスより速やかに排除されること、②感染初期防御を担うNK1.1<sup>+</sup>T細胞とγδT細胞は、原虫が排除された感染後期に著しい増加を示し、しかもAIM<sup>-/-</sup>マウスで増加したNK1.1<sup>+</sup>T細胞の約40%がγδT細胞であることが明らかとなっていた。

そこで本研究では、parasitemia(血中の原虫感染赤血球数)がピークの達するまでの感染前期と原虫が排除される感染後期では自然免疫応答の質的変動が生じるとの観点から、MΦの役割に焦点を当て解析を行い、以下の成果が得られた。



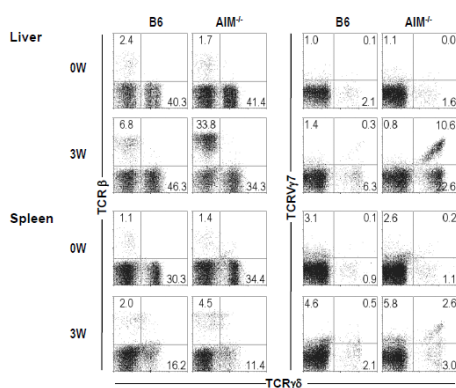
C57BL/6とAIM<sup>-/-</sup>マウスにおけるparasitemiaの経時的変化

- (1) AIM<sup>-/-</sup>マウスでの病理学的解析から、肝傷害の指標となる血中トランスアミナーゼ (ALT) のピーク値は野生型マウスに比べて約75%も低下していたが、肝組織では胆管や血管周囲に細胞凝集塊が顕著に認められた。そこで免疫組織染色を行った結果から、F4/80抗原陽性のMΦとγδT細胞は細胞凝集塊での局在は認められず、類洞内に散在することが明らかとなった。
- (2) 抗γδTCR抗体投与によりγδT細胞を除去すると、明らかに原虫の排除が遷延した。



抗γδTCR抗体投与によるparasitemiaの遷延

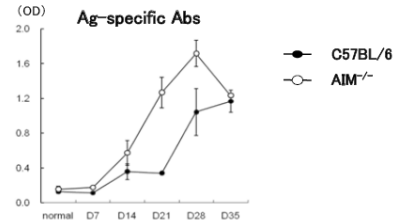
- (3) 肝臓と脾臓で増加するγδT細胞のレパートワーをFlowcytometryとRT-PCR法を用いて解析した結果、γδT細胞の30~50%が胸腺外分化する腸管局在のVγ7TCR陽性細胞であり、この細胞が原虫の排除の一翼を担っているものと思われた。



感染により肝臓と脾臓ではTCRVγ7を発現する細胞が増加する。

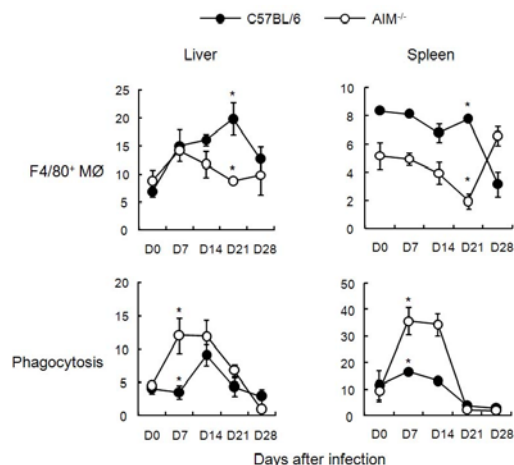
- (4) AIM<sup>-/-</sup>マウスで認められる NKT 細胞とγδT 細胞の活性化が、感染後期の原虫特異抗体の誘導を主体とする獲得免疫の誘導への

影響を検討するために、血中の原虫特異抗体の経時的変化を調べた。その結果、AIM<sup>-/-</sup>マウスでは感染前期より特異抗体が誘導され、原虫の排除が見られる感染後期 (Day 21) では野生型マウスと比較して約4倍もの高い特異抗体が検出された。



AIM欠損マウスでは抗原特異的抗体が感染初期から強く誘導される。

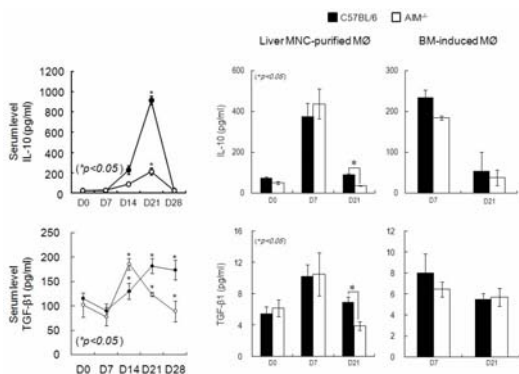
- (5) ネズミマラリア感染系では、原虫由来抗原がMΦ/DCのTLRやスカベンジャーレセプターのCD36を介して両細胞を活性化させIL-12の産生を誘導するが、DCと異なりMΦではTNFなどの炎症性サイトカインを産生し炎症を誘導すると共に、NO産生により原虫の殺滅を行うとされている。そこでAIM<sup>-/-</sup>マウスのMΦ機能を解析した結果、肝臓と脾臓での動態は異なるものの、肝MΦはAIM<sup>-/-</sup>マウスでparasitemiaのピークから感染後期にかけて減少していたが、MΦのCD36発現は亢進する傾向にあった。また、蛍光標識ビーズを用いたMΦ食食能の経時的変動では、感染初期より明らかにAIM<sup>-/-</sup>マウスで亢進していたが、感染後期ではその差異は認められなかった。これらの結果から、AIM<sup>-/-</sup>マウスではMΦの機能亢進、すなわち、感染赤血球の食食を亢進させると共に自らのアポトーシスを誘導し、その後の病態の沈静化に関与するものと推察された。



感染AIM<sup>-/-</sup>マウスの肝臓と脾臓MΦは食食能を亢進させるが、アポトーシスに陥ることにより、その総数を減少させる。

- (6) MΦはGM-CSFにより分化・誘導されるGM-MΦとM-CSFにより分化・誘導されるM-MΦに大別され、GM-MΦは抗原刺激や病原

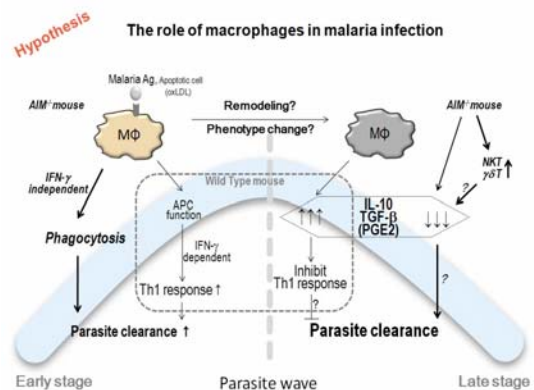
体の貪食により IL-12、IL-6 や IFN- $\gamma$  を産生し Th1 免疫応答を誘導するが、M-M $\Phi$  は貪食能が弱いものの IL-10 や TGF- $\beta$  の産生誘導能が強いことから、感染の治癒過程に関与することが推察されている。また、マラリア原虫感染における病態形成、すなわち組織傷害を含むマラリアの重症度とその回復が、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  と抗炎症性（調節性）サイトカインの IL-10 と TGF- $\beta$  産生のバランスに左右されることが明らかになりつつあることから、M $\Phi$  の IL-10 及び TGF- $\beta$  産性能の経時的変動を解析した。血清サイトカインレベルの解析では、IL-10 と TGF- $\beta$  産性は、AIM $^{-/-}$  マウスの感染後期で明らかな低下を示していた。そこで、肝局在 M $\Phi$  と骨髄細胞から GM-CSF と IL-4 の添加培養により誘導した M $\Phi$  を用いて、in vitro での LPS 刺激により産生させた IL-10 と TGF- $\beta$  レベルについても同様の結果が得られた。また、現在までの解析から、感染 AIM $^{-/-}$  マウスの感染防御は野生型 B6 マウスとは異なり、IFN- $\gamma$  非依存性であり、感染後期においては IL-12 や TNF- $\alpha$  産生も低下していることが示されている。これらの結果から、AIM $^{-/-}$  マウスではマラリア感染野生型マウスとは異なり、感染後期においては TNF- $\alpha$  と IL-10 及び TGF- $\beta$  産生バランスに関係なく原虫の排除を亢進させていることが明らかとなった。



血清と培養 M $\Phi$  レベルでの IL-10 と TGF- $\beta$ 1 産生の経時的変動

以上の成果から M $\Phi$  が産生するアポトーシス抑制因子 (AIM) を欠損するマウスでは、マラリア原虫の早期排除の一端を担う  $\gamma\delta$ T 細胞は胸腺外分化する腸管局在の V $\gamma$ 7TCR 陽性細胞であることが明らかとなったが、V $\gamma$ 7TCR 陽性細胞の肝臓や脾臓への移動・集積の機構は現在のところ不明である。また、M $\Phi$  の機能解析から、AIM $^{-/-}$  マウスでは感染初期の M $\Phi$  の貪食能亢進が原虫排除に大きく貢献しており、しかも原虫を貪食した M $\Phi$  は速やかにアポトーシスにおちいることで肝傷害を軽減していることが強く示唆された。これらの

結果は、近年、動脈硬化の原因として酸化コレステロールを摂取した M $\Phi$  の AIM 産生亢進が報告され、AIM の機能制御がその予防・治療に有効である可能性が示唆する報告とも一致し (Arai, S., Miyazaki, T. *et al. Cell. Metabolism*, 1: 201-213, 2005)、マラリア感染における新しい視点での感染防御機構だけでなく病態形成機序への解明及びその臨床応用も期待できると考えられる。さらに、マラリアをはじめとする感染症においては、M $\Phi$  の機能としての貪食作用による病原体の排除やそれに伴う炎症反応の惹起が、スカベンジャーレセプターを介した脂質代謝の変動を受ける可能性が推察され、さらなる解析を進めている。



野生型マウスと AIM $^{-/-}$  マウスにおける原虫排除機構 (概念図)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- Mannoor, M. K., Shimabukuro, I., Tsukamotoa, M., Watanabe, H., Yamaguchi, K. and Sato, Y. Honeybee royal jelly inhibits autoimmunity in SLE-prone NZB x NZW F1 mice. *Lupus*. 18: 44-52, 2009. 査読 有
- Mannoor, M. K., Tsukamotoa, M., Watanabe, H., Yamaguchi, K. and Sato, Y. The efficacy of royal jelly in the restoration of stress-induced disturbance of lymphocytes and granulocytes. *Biomedical Research* 19: 69-77, 2008. 査読 有
- Oku, H., Li, C., Shimatani, M., Iwasaki, H., Toda, T. and Watanabe, H. Tumor specific cytotoxicity of  $\beta$ -glucosylceramide: structure-cytotoxicity relationship and anti-tumor activity in vivo. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2008, Dec. 査読 有
- Taniguchi, T., Saoko Tachikawa, S., Kanda, Y., Kawamura, T., Tomiyama-Miyaji, C., Watanabe, H.,

Sekikawa, H. and Abo, T. Malaria protection in  $\beta_2$ -microglobulin-deficient mice lacking MHC class I antigens: Essential role of innate immunity, including  $\gamma\delta$ T cells. *Immunology*, 122: 514-521, 2007. 査読 有

[学会発表] (計 19 件)

1. 谷口委代、李 長春、當眞 弘、渡部久実、Analysis of B cell memory in falciparum malaria patients、第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月 27 日～28 日、東京
2. 李 長春、谷口委代、當眞奈海、渡部久実、Apoptosis inhibitor regulates the murine malaria development via the influence of anti-inflammatory cytokines production、第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月 27 日～28 日、東京
3. 富山一宮路智香子、渡部久実、安保 徹、Concanavalin A 肝障害における肝内樹状細胞の防御的役割について、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日～3 日、京都
4. マヌール・カイサール、渡部久実、李 長春、谷口委代、ネズミマラリア感染における抗 ssDNA 抗体産生 B 細胞の感染防御機能、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 12 月 1 日～3 日、京都
5. 谷口委代、マヌール・カイサール、李 長春、渡部久実、Analysis of  $\gamma\delta$ T cells subsets and natural acquired antibody in patients with falciparum malaria in Lao PDR、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日～3 日、京都
6. 李 長春、マヌール・カイサール、谷口委代、渡部久実、Apoptosis inhibitor regulates the production of anti-inflammatory cytokines in murine malaria development、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日～3 日、京都
7. 當眞奈海、谷口委代、野中大輔、小林 潤、狩野繁之、渡部久実、ラオス国南部のマラリア流行地におけるデング熱感染の疫学的解析、第 49 回日本熱帯医学会大会、2008 年 10 月 25 日～26 日、東京
8. 谷口委代、李 長春、當眞弘、佐藤良也、渡部久実、ラオス国の熱帯熱マラリア患者における $\gamma\delta$ T 細胞サブセットと自然獲得抗体の解析、第 49 回日本熱帯医学会大会、2008 年 10 月 25 日～26 日、東京
9. Taniguchi, T., Mannor, K., Li, C., Toma, H., Sato, Y., Watanabe, H.、Analysis of  $\gamma\delta$ T cell subsets in patients with falciparum malaria in Lao PDR、16<sup>th</sup> International Congress for Tropical Medicine and Malaria、Sep.29-Oct.3, 2008、Jeju(Korea)
10. Li, C., Mannor, K., Taniguchi, T., Watanabe, H.、Role of macrophages in murine malaria protection in apoptosis inhibitor deficient mice、16<sup>th</sup> International Congress for Tropical Medicine and Malaria、Sep.29-Oct.3, 2008、Jeju(Korea)
11. マヌール・カイサール、李 長春、谷口委代、當眞 弘、渡部久実、佐藤良也、Erythrocyte binding antibodies and extramedullary erythropoiesis may have possible association with protection from murine malaria infection、第 77 回日本寄生虫学会大会、2008 年 4 月 3 日—4 日、長崎
12. 谷口委代、マヌール・カイサール、李 長春、當眞 弘、渡部久実、マラリア患者における自然免疫による感染防御機構の解析、第 77 回日本寄生虫学会大会、2008 年 4 月 3 日—4 日、長崎
13. 李 長春、マヌール・カイサール、谷口委代、渡部久実、Role of macrophages in murine malaria protection in apoptosis inhibitor AIM deficient mice、第 77 回日本寄生虫学会大会、2008 年 4 月 3 日—4 日、長崎
14. Tomiyama-Miyaji, C., Watanabe, H.、TAbó, T.、Proportional changes of liver dendritic cells in Concanavalin A-induced hepatitis mice、第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、2007 年 11 月 20—22 日、東京
15. Taniguchi, T., Tachikawa, S., Kanda, Y., Kawamura, T., Tomiyama-Miyaji, C., Li, C., Watanabe, H.、Abo, T.、Essential role of  $\gamma\delta$ T cells in protection against malaria in  $\beta_2$ -microglobulin-deficient mice、第 37 回日本免疫学会総会・学術集

会、2007年11月20—22日、東京

16. Mannoor, K., Li, C., Taniguchi, T., Watanabe, H.、Possible role of erythrocyte binding antibodies and extramedullar erythropoiesis in protection against murine malaria infection、第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20—22日、東京
17. Li, C., Mannoor, H., Taniguchi, T., Watanabe, H.、Role of  $\gamma\delta$ T cells in murine malaria protection in apoptosis inhibitor factor -AIM effected mice、第37回日本免疫学会総会・学術集会（東京）、2007年11月20—22日
18. 谷口委代、中澤秀介、佐藤良也、高木正洋、渡部久実、ベトナムのマラリア流行地におけるデング熱の侵淫状況、第48回日本熱帯医学会大会（大分）、2007年10月12—13日
19. 李 長春、カイサール・マヌール、谷口委代、渡部久実、マクロファージ由来アポトーシス抑制因子(AIM)欠損マウスでのマラリア感染防御における $\gamma\delta$ T細胞の役割、第18回日本生体防御学会学術総会、2007年7月26—28日、福岡

[図書] (計1件)

1. 開発途上国の住民に資するマラリア対策及び社会技術の開発に関する研究（主任研究者：狩野繁之、国立国際医療センター研究所部長）、平成16-18年度国際衣料協力研究委託事業（16公1）総合研究報告書（研究協力者：渡部久実）

[その他]

所属部局及び研究室のホームページ

<http://www.cc.u-ryukyu.ac.jp/~comb/>

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/immunobiology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡部 久実 (WATANABE HISAMI)

琉球大学・分子生命科学研究センター・教授

研究者番号：50143756

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし