

平成21年 4月 28日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19790309
 研究課題名 (和文) マラリア感染による CD8⁺T 細胞の免疫記憶抑制機構の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of memory CD8⁺ T cells during malaria infection
 研究代表者
 都田真奈 (MIYAKODA MANA)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：30398151

研究成果の概要：

赤内型マラリア感染において抗原特異的CD8⁺T細胞は増殖活性化した。さらにマラリアを治療後記憶細胞が分化誘導される事が分かった。ところが、記憶T細胞は次感染の際に増殖が制限される事が示唆された。この結果から、記憶T細胞の増加制限が、マラリア感染で見られる免疫抑制の原因の一つ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	2,300,000		2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：原虫

1. 研究開始当初の背景

マラリアに対する確立されたワクチンは未だ存在しない。ワクチン効果が十分でない原因としてマラリア感染により免疫記憶ができにくい、または持続されにくい事が予想される。また、マラリア感染症が完全に治癒すると再感染に対して抵抗性を失うという事実もある。

獲得免疫制御の中心は T 細胞が担っており、特に記憶細胞については CD8⁺T 細胞の解析が進んでいる。我々は研究当初までに人工抗原として卵白アルブミンを発現するマラリア原虫 (OVA-PbA) を作成し抗原特異的な

CD8⁺T細胞をモニターできる解析系を構築し、以下の事を明らかにしてきた。

(1) CD8⁺T細胞は赤内型原虫の細胞内抗原特異的に増殖反応を示す。

(2) マラリア感染時に CD8⁺T細胞はアポトーシスを起こす。

(3) マラリア感染時に CD8⁺T細胞は IL-2 を産生しなくなる。

2. 研究の目的

赤内型マラリア感染において免疫抑制の原因を調べるため、以下の3点を明らかにする事を目的とした。

- (1) 活性化T細胞分化に障害があるのか？
- (2) 記憶細胞分化あるいは維持に障害があるのか？
- (3) 記憶細胞の応答に障害があるのか？

3. 研究の方法

(1) 活性化T細胞分化に障害があるのか？

- ① CD45.2⁺B6マウスに 1×10^7 Ly5.1⁺OT-I細胞を受身移入し、それと同時に 2×10^4 OVA-PbAを感染させる。
- ② 感染約7から8日目に、移入したOT-I細胞の割合および活性化マーカーの発現を調べる。
- ③ OT-I CD8⁺T細胞を*in vitro*でOVA₂₅₇₋₂₆₄で刺激し、産生するサイトカイン(IL-2、IFN- γ)を細胞内染色法を用いて検討する。

(2) 記憶細胞分化あるいは維持に障害があるのか？

- ① CD45.2⁺B6マウスに 9×10^6 Ly5.1⁺OT-I細胞を受身移入し、それと同時に 2×10^4 OVA-PbAを感染させる。
- ② 感染後約8日目からクロロキンとサルファジンを2週間投薬して治療する。
- ③ 移入したOT-I細胞の割合および活性化マーカーの発現を経時的に調べる。
- ④ OT-I CD8⁺T細胞を*in vitro*でOVA₂₅₇₋₂₆₄で刺激し、産生するサイトカイン(IL-2、IFN- γ)を細胞内染色法を用いて検討する。

(3) 記憶細胞の応答に障害があるのか？

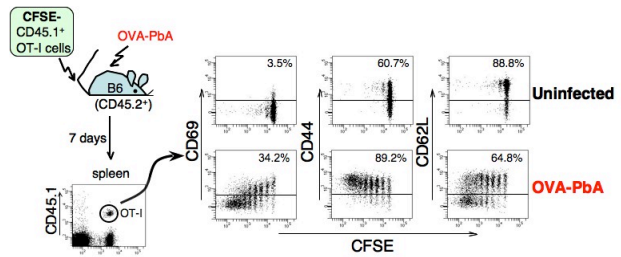
- ① CD45.2⁺B6マウスに 1×10^6 ナイープOT-I細胞と記憶OT-I細胞を1:1で混ぜたものをCFSEラベルした後受身移入し、それと同時に 2×10^4 OVA-PbAあるいはコントロールとしてOVAリステリアを感染させる。
- ② 感染後約8日(リステリア感染の場合は3日後)で移入したナイープ及び記憶OT-I細胞の増加率、増殖をフローサイトメトリーで解析する。

4. 研究成果

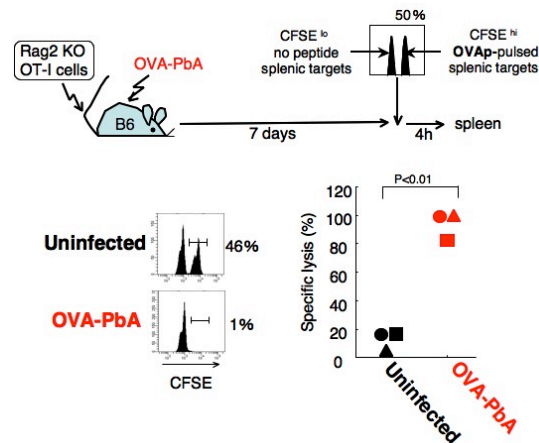
(1) 活性化T細胞分化に障害があるのか？

B6マウスに移入したOT-I細胞はOVA組換えマラリア原虫*Plasodium berghei* ANKA (OVA-PbA) 感染に対して非常に増殖し、活性化型CD8⁺T細胞の表現型を示し(図1)、抗原特異的細胞傷害活性を有した(図2)。この結果からマラリア感染によりCD8⁺T細胞は抗原特異的に活性化する事が明らかとなった(*The Journal of Immunology* 181, 1420-1428 (2008))。

(図1)



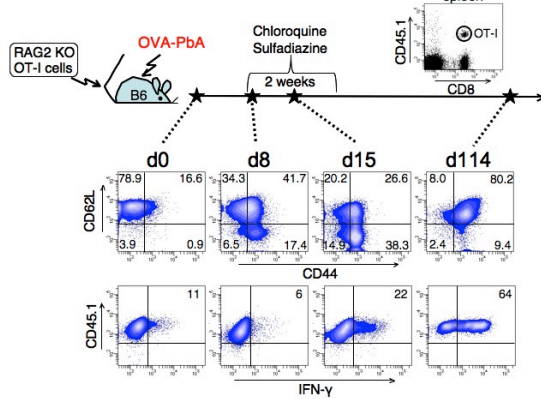
(図2)



(2) 記憶細胞分化あるいは維持に障害があるのか？

上述したマウスにおいて活性化OT-I細胞はその後記憶T細胞に分化するのか検討するため、感染マウスをクロロキンとサルファジンをを使って治療し、経時的にOT-I細胞をモニターした。その結果、感染後約120日で、CD62L^{hi} CD44^{hi} (セントラルメモリー型) OT-I細胞が残存したことから、CD8⁺T細胞は記憶細胞に分化し長期生存できる事が明らかになった(図3)。

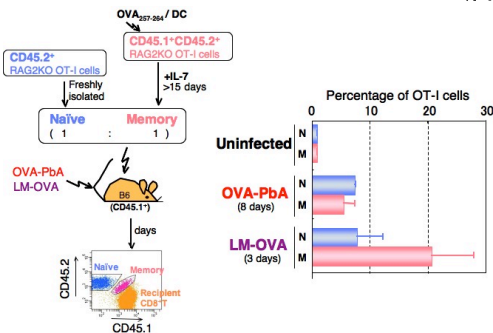
(図3)



(3) 記憶細胞の応答に障害があるのか？

記憶細胞が応答する事が知られているOVAリステリアをコントロールとして、*in vitro* 誘導記憶OT-I細胞の割合を比較した。その結果、OVAリステリアに比べ、OVAマラリア感染した場合記憶OT-I細胞の増加が抑制された (図4)。

(図4)



[意義、重要性]

本研究で、マラリア感染で CD8⁺T 細胞は活性化してその後記憶細胞に分化できるが、せっかくできたこの記憶細胞は感染中に正常に増加できない事を明らかにした。このことは、マラリアワクチンを開発してうまく記憶細胞を誘導できたとしても、実際にマラリアに感染するとその記憶細胞はうまく機能を発揮できない可能性を示唆している。今後は記憶細胞増加制限メカニズムを解明し記憶細胞の増加を導く方法を考案することで、効果的なマラリアワクチンの技術開発に貢献できると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Miyakoda M, Kimura D, Yuda M, Chinzei Y, Shibata Y, Honma K, Yui K. Malaria-specific and nonspecific activation of CD8⁺ T cells during blood stage of *Plasmodium berghei* infection *J Immunol.* **181**,1420-8. (2008) 査読有
- ② Honma K, Kimura D, Tominaga N, Miyakoda M, Matsuyama T, Yui K. Interferon regulatory factor-4 differentially regulates the production of Th2 cytokines in naive vs. effector/memory CD4⁺T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 15890-5. (2008) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 都田真奈, 木村大輔, 本間季里, 木村一美, 油田正夫, 鎮西康雄, 由井克之「マラリア感染における CD8⁺T 細胞の活性化および感染病態・防御における役割」第 77 回日本寄生虫学会、2008 年 4 月 3、4 日、長崎
- ② 都田真奈, 木村大輔, 本間季里, 木村一美, 油田正夫, 鎮西康雄, 由井克之「マラリア感染における抗原特異的エフェクターおよび記憶 CD8⁺T 細胞の解析」第 78 回日本寄生虫学会、2009 年 3 月 27、28 日、東京
- ③ Mana Miyakoda, Daisuke Kimura, Kiri Honma, Kazumu Kimura, and Katsuyuki Yui 「Specific and non-specific activation of CD8⁺T cells during malaria infection; implication for the pathogenesis of cerebral malaria.」第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 22 日、東京
- ④ Mana Miyakoda, Daisuke Kimura, Kiri Honma, Kazumu Kimura, and Katsuyuki Yui 「Activation of CD8⁺T cells and its consequences in mice infected with blood stage malaria parasites.」第 38 回日本免疫学会総会、2008 年 12 月 1-3 日、京都
- ⑤ Mana Miyakoda, Daisuke Kimura, Kazumi Kimura, Masao Yuda, Yasuo Chinzei, Kiri Honma, and Katsuyuki Yui 「Inhibition of the malaria-specific CD8⁺ T-cell memory responses during infection with *Plasmodium berghei*」キーストンシンポジア、2009 年 2 月 8-13 日、米国・キースト

ン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都田真奈 (MIYAKODA MANA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30398151

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし