

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07524

研究課題名（和文）メトホルミンによる抗マラリア免疫記憶の増強とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanisms of enhancement of antimalarial immune memory by metformin

研究代表者

都田 真奈（MIYAKODA, Mana）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・教授

研究者番号：30398151

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）：マウスマラリアモデルを用いて、経口糖尿病治療薬メトホルミンがマラリア原虫特異的T細胞の活性化、記憶細胞分化・維持を増強するかまたそのメカニズムを解析した。マラリア感染で、抗原特異的CD4T細胞およびCD8T細胞は7日目をピークに増加しその後激減するが、メトホルミンは、それらT細胞をエフェクターT細胞およびエフェクターメモリーT細胞への分化を促進した。また、メトホルミンはAMPKのリン酸化ではなく、S6のリン酸化を促進した。このことからメトホルミンはマラリア感染マウスのT細胞のS6のリン酸化を促進することで、エフェクターT細胞やエフェクターメモリーT細胞の分化や増殖や生存を促す事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原虫を直接殺傷する抗マラリア薬は市販されているが、薬剤耐性マラリア原虫が次から次へと出現する現状を考えると、いたちごっこである。本研究で、メトホルミンは抗原特異的T細胞のエフェクターおよびエフェクターメモリーT細胞分化、さらに増殖や生存に促進的に働くことが明らかになったことから、メトホルミンは原虫自体の薬剤耐性、免疫回避を打破できる新規治療法開発の糸口として期待できる。また、現在十分な効果があるマラリアワクチンは存在しないため、ワクチン効果増強を目的としたメトホルミン併用療法への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Using a mouse malaria model, we analyzed whether the oral antidiabetic drug metformin enhances the activation of malaria parasite-specific T cells and the differentiation and maintenance of memory cells, and also the mechanism. Although malaria antigen-specific CD4+ T cells and CD8+ T cells increased on day 7 post infection and then decreased sharply, the differentiation of T cells into effector T cells and effector memory T cells was observed on day18 post-infection in mice treated with metformin. Also, metformin enhanced S6 phosphorylation but not AMPK phosphorylation on day18. These results suggest that metformin enhanced the differentiation, proliferation, and survival of effector T cells and effector memory T cells by promoting phosphorylation of S6 in T cells.

研究分野：感染免疫学

キーワード：マラリア メトホルミン T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは、無症候性持続感染や再感染の繰り返しなど、防御免疫が誘導されにくい感染症である。その原因の一つはT細胞の抑制・減弱であることが報告されており、この免疫抑制を打破できる新たな治療法や治療薬の開発が必要である。

T細胞の増殖、生存、分化に解糖系やミトコンドリア呼吸などの代謝が深く関わる事が報告されている。近年、II型糖尿病治療薬として長年使用されてきたメトホルミンが細胞代謝を調節することによりT細胞応答に対して促進的に働き、T細胞の免疫応答を賦活する事が分かっていたため、我々はメトホルミンをマラリア免疫の増強薬候補として着目した。メトホルミンがマラリア原虫排除を促進し、T細胞の増殖を促進させることを発見した。しかしながら、T細胞は、原虫排除の主担当細胞ではない事がわかり、メトホルミンによる原虫排除促進には別の細胞の関与が強く示唆された(Frontier in Immunology, 13;9:2942, 2018)。さらに、初感染時のメトホルミン投与が再感染に対しても有効であったことから、メトホルミンは獲得免疫に影響を及ぼすことが予想された。

## 2. 研究の目的

メトホルミンが獲得免疫、特にT細胞の応答、免疫記憶増強作用があると仮説を立て、この仮説を検証するとともに、メトホルミンがどのようなメカニズムによりT細胞応答に影響を及ぼすのか明らかにする。

## 3. 研究の方法

C57BL/6 (B6) マウスにマラリア原虫 *P. yoelii* を感染させ、メトホルミンを経口投与した。原虫血症は末梢血をギムザ染色する事で調べた。急性期から治癒後(感染60日目以降)のマウスの脾臓より細胞を回収し、T細胞の活性化および分化を各種細胞表面マーカー(CD11a、CD49d、CD62L、CD44)の発現を指標にしてフローサイトメトリーを用いて調べた。T細胞のAMPK(メトホルミンのターゲット分子との報告有)のリン酸化、mTOR経路(AMPKの抑制ターゲットとの報告有)のリン酸化をPhosflowキットを用いて染色しフローサイトメトリーで解析した。T細胞のグルコースの取り込みを指標に解糖系を、ミトコンドリア質を指標にミトコンドリア呼吸を評価した。また、脾臓よりCD4<sup>+</sup>T細胞を回収し、樹状細胞を用いてマラリア原虫粗抗原で刺激し2日後上澄みを回収した。上澄み中のIFNをELISA法を用いて調べた。

B6マウスにマラリア抗原特異的TCR組換えCD4<sup>+</sup>T細胞(PbT-II細胞)とCD8<sup>+</sup>T細胞(PbT-I細胞)を移入し、*P. yoelii*を感染させ、メトホルミンを投与した。脾臓より細胞を回収し、PbT-IおよびPbT-II細胞の活性化および分化をフローサイトメトリーを用いて調べた。また脾臓よりCD4<sup>+</sup>T細胞を回収し、PbT-Iペプチドで刺激し、PbT-II細胞の産生するサイトカインをELISA法を用いて調べた。

## 4. 研究成果

メトホルミン投与マウスの原虫血症は感染18日目以降で優位に低下し、その後早期に治癒した。メトホルミンのT細胞への影響を調べるため、マラリア原虫感染中(7、12、18日目)から自然治癒後(30日目以降)のCD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞の活性化や分化を解析した。T細胞は感染後増加し、7日をピークに減少し、12日目には非感染マウスよりも減少した。この細胞数減少に対してメトホルミンはほとんど影響を及ぼさなかった。ところが、感染18日目でメトホルミン投与群では、非投与群に比べ、抗原特異的活性化T細胞の割合が増加した。治癒後はその割合に差はなかった。また、メトホルミンは、感染18日目でセントラルメモリーT細胞よりもエフェクターT細胞およびエフェクターメモリーT細胞へ分化させた。これらの結果から、マラリア感染中、メトホルミンは、感染18日目でエフェクターT細胞およびエフェクターメモリーT細胞の増殖あるいは生存を促進すると考えられた。

T細胞の分化に伴い、T細胞の代謝は大きく変化する。マラリア感染後、グルコースの取り込みがやや低下しミトコンドリアの質量が増加したエフェクターT細胞と思われる細胞の割合が増えた。その割合にメトホルミンの影響は見られなかった。しかしながら、感染18日目にはメトホルミン投与群で、グルコースの取り込みもミトコンドリアの質量も低下した細胞つまり疲弊細胞と思われる細胞の割合が増える傾向が見られた。この結果から、メトホルミンは疲弊したエフェクター細胞およびエフェクターメモリー細胞の増殖あるいは維持を促進すると考えられた。

メトホルミンはAMPKのアクティベータとして知られているため、メトホルミンが、マラリアのT細胞のAMPKのリン酸化を促進するか調べたが、亢進することはなかった。一方で、メトホ

ルミンは、エフェクターT細胞分化、増殖、生存に関わることが報告されている S6 のリン酸化を促進した。これらの結果からメトホルミンはマラリア感染マウスの T 細胞の疲弊したエフェクターT細胞やエフェクターメモリーT細胞の増殖や生存を S6 依存的に促進する可能性が示唆された。

メトホルミンが、T細胞の機能に影響を及ぼすか調べるため、感染マウス CD4<sup>+</sup> T細胞を回収し、*in vitro*でマラリア原虫粗抗原で刺激した。感染7日目の CD4<sup>+</sup>T細胞は IFN を産生したが、メトホルミン投与群の方が低かった。持続感染中である12日目、18日目の CD4<sup>+</sup>T細胞は、抗原刺激に対して不応答で、メトホルミンの影響は見られなかった。治癒後のメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞は、抗原刺激に対して IFN を産生したが、メトホルミン投与群で低かった。以上の結果からメトホルミンは感染中のエフェクター期でも治癒後のメモリー期でも、CD4<sup>+</sup>T細胞の IFN 産生能を増強させることなくむしろ低下させることがわかった。この結果から、メトホルミンによるマラリア抵抗性の増強のメカニズムとして、CD4<sup>+</sup>T細胞が産生する IFN は考えにくいと思われた。

さらに、上記の結果を裏付けるため、B6マウスにマラリア原虫特異的 TCR 組換え CD8<sup>+</sup>T(PbT-I細胞)および CD4<sup>+</sup>T(PbT-II細胞)を受身移入し感染後6,12,18,日目の PbT-I細胞および PbT-II細胞の分化とサイトカイン産生を解析した。B6の結果と同様傾向の結果が得られた。

以上をまとめると、メトホルミンは疲弊したエフェクターT細胞やエフェクターメモリーT細胞の数を S6 依存的に増加させることによりマラリア抵抗性を増強している可能性が示唆された。また、その抵抗性には、IFN 以外の別のメカニズムが存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamae S, Kimura D, Miyakoda M, Sukhbaatar O, Inoue SI, Yui K.	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

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 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 101994, 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 Jian JY, Inoue SI, Bayarsaikhan G, Miyakoda M, Kimura D, Kimura K, Nozaki E, Sakurai T, Fernandez-Ruiz D, Heath WR, Yui K.	4. 巻 33
2. 論文標題 CD49d marks Th1 and Tfh-like antigen-specific CD4+ T cells during Plasmodium chabaudi infection.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 409, 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab020.	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 該当する

1. 著者名 Ntita M, Inoue SI, Jian JY, Bayarsaikhan G, Kimura K, Kimura D, Miyakoda M, Nozaki E, Sakurai T, Fernandez-Ruiz D, Heath WR, Yui K.	4. 巻 34
2. 論文標題 Type I interferon production elicits differential CD4+ T-cell responses in mice infected with Plasmodium berghei ANKA and P. chabaudi.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 21, 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab090.	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川 月、北里 海雄、由井 克之、鶴殿 平一郎、都田 真奈
2. 発表標題 メトホルミンによる マラリア原虫抗原特異的T細胞応答の増強
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------