

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06139・19K21254

研究課題名(和文)脳マラリアと血液脳脊髄液関門に関する研究

研究課題名(英文)A study on cerebral malaria and blood cerebrospinal fluid barrier

研究代表者

今井 孝 (Imai, Takashi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10513434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアは地球最大規模の感染症の一つで、中でも脳神経症状により死をもたらす脳マラリアが問題です。脳には血液脳関門(BBB)と血液脳脊髄液関門(BCSFB)が存在し、脳マラリアではBBBが破綻すると知られていますが、BCSFBについては不明です。

本研究では、マウスのマラリア感染系を用いてBCSFBについて精査しました。その結果、脳マラリアを発症したPbA感染マウスの、70-80%はBCSFBが破綻していました。さらに脳室内への出血や、BCSFBを構成している脈絡叢において原虫由来産物を検出しました。脳マラリアを起こさない原虫や、PbA感染マウスから悪玉細胞を除くと破綻は認められませんでした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今まで不明だった、マラリア感染における血液脳脊髄液関門の状態が明らかになりました。このことにより、マラリアの病理の理解がさらに進みます。

脳マラリアでは血液脳関門と血液脳脊髄液関門の両者の透過性が向上し、破綻しますがこのメカニズムをさらに詳しく解き明かすことで、関門を超えて脳神経細胞に作用する薬の開発に役立つかもしれません。

今回、血液脳脊髄液関門の破綻を評価する新しい手法を開発しました。この方法は、脳マラリアだけでなく他の病気の研究にも応用することが可能です。

研究成果の概要(英文)：Malaria is one of the largest infectious diseases in the world. Cerebral malaria, which causes death due to neuropathology, is a problem. There are blood-brain barrier (BBB) and blood-cerebrospinal fluid barrier (BCSFB) in the brain, and disruption of BBB in cerebral malaria is known, but that of BCSFB is unknown.

In this study, we investigated BCSFB using a mouse malaria infection model. As a result, 70-80% of PbA-infected mice that developed cerebral malaria, was disrupted BCSFB. Furthermore, we detected malaria-derived products in the choroid plexus which composes BCSFB and hemorrhaging in the ventricles. Break down of BCSFB was not seen in non-cerebral malaria or the PbA infected mice depleted with killer T cells.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア Malaria 脳マラリア 血液脳脊髄液関門 血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

マラリアはエイズ、結核とならぶ世界3大感染症の一つであり、早急な制圧が望まれています。WHOによると現在全世界で1年あたり2億人の患者と、40万人の死亡者がでると報告されています。複数あるヒトマラリアで熱帯熱マラリアが一番の死因となっています。特にサハラ砂漠以南のアフリカで問題になっており5歳以下の子供の多くの命が失われています。

重症マラリアによる死因は、脳症(脳マラリア)ならびに肺水腫、貧血が主なものと考えられています。脳マラリアに関しては、マラリア感染赤血球による脳微小血管の閉塞ならびに血液脳関門の破綻が原因であると考えられています。

血液脳関門とは脳に存在する実質と呼ばれる神経細胞などが存在する部分、液体成分を多く含む血液の境界に存在する関門のことです。壁ではなく、関門であり、細胞および物質の移動が制御されています。

血液脳関門の実体は、血液側の因子として血管壁を構成する血管内皮細胞、実質側の因子として血管内皮細胞を取り囲んでいる周皮細胞や基底膜、アストロサイトにより形成されています。

同様の関門として血液脳脊髄液関門があります。血液脳脊髄液関門は脳室と脳実質を分ける上皮細胞での関門性を指しています。上皮細胞は、脳室系の上衣と呼ばれる壁を構成する細胞です。脳室内で脈絡叢上皮や脳室正中面で脳室周囲器官を形成しています。

2. 研究の目的

マラリアの早期の治療により、たとえ患者が回復しても、脳のダメージにより後遺症が残るケースがあり問題となっています。このような不可逆的なダメージが起きるメカニズムは、上述のものだけなのでしょうか。例えば「血液脳関門はマラリアにより破綻することが報告されていますがもう一つの関門、血液脳脊髄液関門はどうなのだろうか」ということです。この未知の問いに答えを出すことを目的としました。

3. 研究の方法

研究対象は、マウスモデルを用いました。げっ歯類マラリア原虫である *Plasmodium berghei* ANKA 株(PbA)を C57BL/6 マウスに感染させると脳神経症状を呈し死にいたることが知られています。この実験系は実験的脳マラリアモデルとして脳マラリア病態解析や治療薬の開発研究などに広く用いられています。血液脳関門の破綻はエバンスブルーという色素をマウスの静脈内に投与することで調べることが出来ます。この色素は低分子であり、通常のマウスにおいては脳において血管透過性を示すことはなく、脳マラリア発症マウスにおいては血液脳関門が破綻し脳実質に浸透していきます。実際の実験においては、エバンスブルーを注入後1時間ほど放置し、その後マウスを殺し、大量の PBS を静脈内に注入し血管内容物を洗い流すいわゆる灌流を行い組織への色素の移行具

合を評価することで行われます。この時に PBS を注入しても染色された組織の色素沈着が洗い流されることはありません。脳マラリア発症マウスでは脳の実質が綺麗な青色に染まります。

では、血液脳脊髄液関門の破綻はどう評価するかですが、これもやはり同じエバンスブルーを用います。脳内には脳室（下図 1 の空間部分）と呼ばれる脳実質にも血管にも頭蓋骨にも属さない空間が広がっています。この空間には、脈絡叢とよばれる一層の細胞（上皮細胞により形成される入り組んだ袋の様な組織（下図 1 の矢印）より分泌された脳脊髄液で満たされており、脳はこの脳脊髄液の上に浮かんでいる形となります。下図 1 をご参照ください。

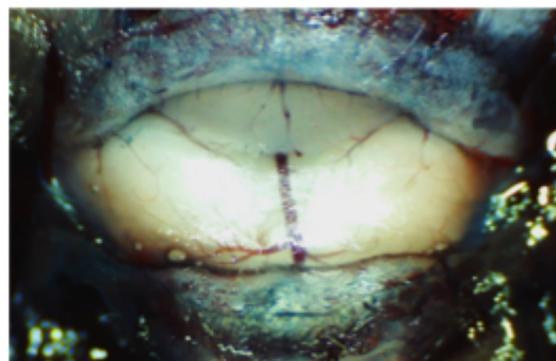


図 1 非感染マウスの脳室および脈絡叢 図 2 非感染マウスの大槽から脳を観察

図 1 は脳切片ですが、これにより脳脊髄関門が破綻しているかを評価するのは難しいです。切片作製時に上皮細胞が剥離する可能性が高いからです。しかし幸い脳には大槽（後小脳延髄槽、図 2）とよばれる小脳の延髄背面とのある大きなクモ膜下槽が存在し、これがキーポイントとなります。この場所には第四脳室の正中口ならびに外側口が開口しており、脳室とクモ膜下層の脳脊髄液の接点となり、頭蓋骨におおわれていないため筋肉を剥離することで、肉眼で透明のクモ膜および脳脊髄液を通して直接脳を観察することができます。

4. 研究成果

エバンスブルーの実験により、非感染マウスでは図 3 のような白い見たくを

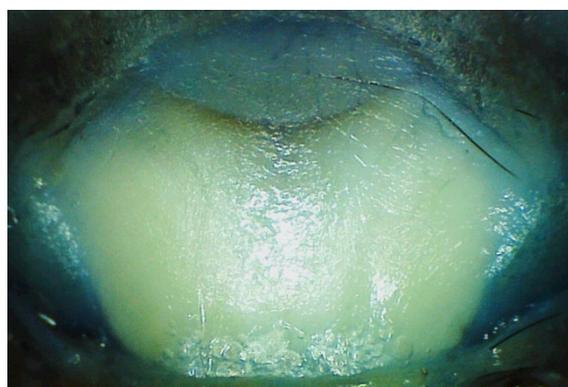


図 3 非感染マウスの大槽から脳を観察 図 4 脳マラリアマウスの大槽から脳を観察

した脳が観察されますが、脳マラリアのマウスでは図 4 のように青く染まった像が得られました。脳脊髄液を採取すると、やはり脳マラリアマウスにおいて

のみ青く染まっていました。脳脊髄液は、採取できる量が数マイクロリッターとごくわずかであるため、これを用いてエバンスブルーの濃度を定量することはできませんでした。そこで、今回、新しく血液脳脊髄液関門の破綻を評価する方法を開発しました。それは図3,4のような写真を画像解析することにより達成されました。

脳マラリアのマウスでは、脳室内への出血や脈絡層において、ヘモゾインというマラリア原虫の代謝産物が一部のマウスにおいて観察されました。

さらに、同じPbA株を感染させて、脳マラリアを発症する前に解析しますと、非感染マウスと同様でした。

それでは、脳マラリアを発症しないPyNLならびにPbNKという別のマラリア原虫にマウスを感染させ解析すると、一部の例外を除き非感染マウスと同等でした。これらのことは、血液脳脊髄液関門は脳マラリアにおいてのみ破綻することを示しています。

最後にどのようなメカニズムで、血液脳脊髄液関門の破綻がおきるのかを探りました。まず抗マラリア薬による治療をしますと、血液脳脊髄液関門ならびに血液脳関門の破綻はおきませんでした。これは十分な量のマラリア原虫がなければ破綻しないことを示しています。次にキラーT細胞という細胞が脳マラリアの発症と関与していると報告がありますので、この細胞を除去して解析しますと血液脳脊髄液関門ならびに血液脳関門の破綻はおきませんでした。このことは、マラリア原虫が直接、血液脳脊髄液関門を破壊しているのではなく、免疫細胞の一部であるキラーT細胞によって引き起こされていることを示唆しています。

なお研究成果は現在、International Journal for Parasitology 誌に以下の論文を投稿しています。

論文タイトル

Blood-cerebrospinal fluid barrier: another site disrupted 1 during cerebral malaria caused by Plasmodium berghei ANKA

著者

Ha Ngo-Thanh¹, Tsutomu Sasaki^{2,3}, Kazutomo Suzue¹, Hideaki Yokoo⁴, Koji Isoda⁴, Wataru Kamitani^{1,5}, Chikako Shimokawa⁶, Hajime Hisaeda⁶ and Takashi Imai^{1*}.

*責任著者

1. Department of Infectious Diseases and Host Defense, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Gunma, Japan.

2. Laboratory of Metabolic Signal, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, Maebashi, Gunma Japan.

3. Current address: Laboratory of Nutrition Chemistry, Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

4. Department of Pathology, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Gunma, Japan

5. Laboratory of Clinical Research on Infectious Diseases, Research Institute for Microbial Disease, Osaka University, Osaka Japan.

6. Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Catherin Marin-Mogollon, Fiona J. A. van Pul, Shinya Miyazaki, Takashi Imai, Jai Ramesar, Ahmed M. Salman, Beatrice M. F. Winkel, Ahmad Syibli Othman, Hans Kroeze, Severine Chevalley-Maurel, Arturo Reyes-Sandoval, Meta Roestenberg, Blandine Franke-Fayard, Chris J. Janse and Shahid M. Khan	4. 巻 17
2. 論文標題 Chimeric Plasmodium falciparum parasites expressing Plasmodium vivax circumsporozoite protein fail to produce salivary gland sporozoites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-018-2431-1	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 Ahmad Syibli Othman, Blandine M. Franke-Fayard, Takashi Imai, Esme T. I. van der Gracht, Anke Redeker, Ahmed M. Salman, Catherin Marin-Mogollon, Jai Ramesar, Severine Chevalley-Maurel, Chris J. Janse, Ramon Arens and Shahid M. Khan.	4. 巻 8
2. 論文標題 OX40 stimulation enhances protective immune responses induced after vaccination with attenuated malaria parasites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2018.00247	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 Marin-Mogollon Catherin, Salman Ahmed, Koolen Karin, Bolscher Judith, van Pul Fiona, Miyazaki Shinya, Imai Takashi, Othman Ahmad Syibli, Ramesar Jai, van Gemert Geert-Jan, Kroeze Hans, Chevalley Severine, Franke-Fayard Blandine, Sauerwein Robert W., Hill Adrian V. S., Dechering Koen J., Janse Chris J., Khan Shahid M.	4. 巻 9
2. 論文標題 A P. falciparum NF54 Reporter Line Expressing mCherry-Luciferase in Gametocytes, Sporozoites, and Liver-Stages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2019.00096	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 Imai Takashi, Suzue Kazutomo, Ngo-Thanh Ha, Ono Suguri, Orita Wakako, Suzuki Haruka, Shimokawa Chikako, Ochiai Alex, Obi Seiji, Taniguchi Tomoyo, Ishida Hidekazu, Van Kaer Luc, Murata Shigeo, Tanaka Keiji, Hisaeda Hajime	4. 巻 10
2. 論文標題 Fluctuations of Spleen Cytokine and Blood Lactate, Importance of Cellular Immunity in Host Defense Against Blood Stage Malaria Plasmodium yoelii	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.02207	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 Kano Shin-ichi, Choi Eric Y., Dohi Eisuke, Agarwal Swati, Chang Daniel J., Wilson Ashley M., Lo Brian D., Rose Indigo V. L., Gonzalez Santiago, Imai Takashi, Sawa Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Glutathione S-transferases promote proinflammatory astrocyte-microglia communication during brain inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 ear2124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aar2124	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 該当する

1. 著者名 Shimokawa Chikako, Obi Seiji, Shibata Mioko, Ochiai Alex, Imai Takashi, Suzue Kazutomo, Hisaeda Hajime	4. 巻 87
2. 論文標題 Suppression of Obesity by an Intestinal Helminth through Interactions with Intestinal Microbiota	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00042-19	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 今井 孝, 石田 英和, 鈴江 一友, 谷口 委代, 岡田 紘子, 下川 周子, 久枝 一
2. 発表標題 CD8T 細胞は細胞傷害性分子によりマクロファージと協調してマウス赤内期マラリア感染防御に働く
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 谷口 委代, 鈴江 一友, 今井 孝, 下川 周子, OIia Alex, Thanhha Ngo, 久枝 一
2. 発表標題 ネズミマラリア原虫感染における病態形成への腸内細菌の関与
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下川 周子, 小尾 誠司, 柴田 実央子, OIia Alex, 今井 孝, 鈴江 一友, 久枝 一
2. 発表標題 Suppression of obesity by norepinephrine produced in parasitic infection
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 孝
2. 発表標題 「スプロゾイト、メロゾイト、T細胞、赤血球」、あなたはどの細胞が好き？
3. 学会等名 第26回分子寄生虫学ワークショップ / 第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Imai, Hidekazu Ishida, Kazutomo Suzue, Makoto Hirai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko Okada, Chikako Shimokawa and Hajime Hisaeda
2. 発表標題 Cytotoxic activities of CD8+ T cells collaborate with macrophage to protect against blood-stage murine malaria
3. 学会等名 keystone symposium malaria endgame ((国際学会))
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
--	---------------------------	-----------------------	----