

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590428

研究課題名（和文） 自然免疫リンパ球と樹状細胞の協調的制御によるマラリア原虫感染  
防御機構の成立機序研究課題名（英文） Protective immunity to malaria through cooperative regulation  
by innate immune cells

研究代表者

小林 富美恵 (KOBAYASHI FUMIE)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：20118889

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫感染において、樹状細胞(DC)や  $\gamma\delta$  T細胞といった自然免疫細胞が感染防御においてどのような役割を果たすのか、マウスマラリアモデルを用いて調べた。その結果、感染初期に conventional DCが増殖することが、その後の原虫排除にとって極めて重要であることがわかった。さらに、感染 TCR $\delta$  KO マウスの解析から、 $\gamma\delta$  T細胞は DCの成熟・活性化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We examined roles of innate immune cells such as dendritic cells (DC) and  $\gamma\delta$  T cells in immunity to malaria by using murine malaria models. We found that proliferation of conventional DC early in infection is necessary for eliminating malaria parasites in late phase of infection. Analyses of DC in TCR $\delta$ -deficient mice infected with malaria parasites suggested that  $\gamma\delta$  T cells might play a pivotal role for maturation and activation of DC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：寄生虫学

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：マラリア、防御免疫、自然免疫細胞、樹状細胞、T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

宿主にマラリア原虫が感染した場合、宿主はどのようにそれらを排除しようとするのだろうか。その謎を解くべく、マラリア感染防御免疫機構の解明のためにこれまで多くの研究がなされてきた。しかし、従来の研究は、免疫学分野で獲得免疫機構の詳細が明らかにされることと連動して、感染後期の抗体応答や CD4 陽性 T細胞を中心とした ab T細胞応答、サイトカイン応答、記憶細胞などに注目して進められてきた。その中で、Leisewitz ら(2004)は、*Plasmodium chabaudi*

AS 感染系では感染後の早い時期に樹状細胞 (CD11c<sup>+</sup>細胞) (DC)が脾臓の marginal zone から CD4<sup>+</sup> T細胞領域に遊走することを *in vivo* 実験で明らかにした。この時、DC 上では T細胞の活性化に必要な CD40、CD54、CD86 などの補助刺激分子が upregulate しており、さらに DC の IFN- $\gamma$  産生が他の抗原提示細胞である B細胞 (B220<sup>+</sup>細胞)やマクロファージより 2日間先んじていたことから、脾臓 DCこそがマラリア感染初期にアクティブに働き、引き続いて起こる感染後期の免疫応答の方向性の決定に重要な役割を果たす細胞で

あることを示唆した。しかし、DC population の中のどのサブセットがそれぞれの応答に関与しているのかについては調べられておらず、その後も詳細に検討された報告がなかった。さらに、これまでに我々は、自然免疫リンパ球である  $g\delta$  T 細胞の感染初期の応答が、原虫排除において重要な役割を果たすことを示してきているが、これらについての詳細な知見は得られていなかった。

## 2. 研究の目的

マラリア原虫感染初期におこる細胞応答がその後の感染動態に如何なる影響を与えるのか、感染初期のどの細胞サブセットが鍵を握るのかについて、自然免疫細胞である樹状細胞や  $g\delta$  T 細胞に焦点をあて、マウスマラリアモデルを用いて明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) 弱毒株と強毒株のマウスマラリア原虫をマウスに感染させ、感染経過に伴う各種免疫担当細胞、特に樹状細胞 (DC) サブセットの動態について調べる。

2) 弱毒株のマウスマラリア原虫を、自然免疫リンパ球  $g\delta$  T 細胞を欠損する TCR $\delta$  KO マウスと野生型 (WT) マウスとに感染させ、感染経過に伴うサイトカイン応答や各種免疫担当細胞、特に DC サブセットの動態や活性化について比較検討する。

## 4. 研究成果

1) 研究期間前半では、マラリア原虫感染経過に伴う各種免疫担当細胞、特に樹状細胞 (DC) サブセットの動態について調べた。*P. berghei* の弱毒株 (*Pb* XAT) と強毒株 (*Pb* NK65) を感染させたマウスの脾臓に存在する CD11c<sup>high</sup>B220<sup>-</sup> の conventional DC (cDC) と、CD11c<sup>int</sup>B220<sup>high</sup> の plasmacytoid DC (pDC)、さらに CD11c<sup>int</sup>B220<sup>int</sup> 細胞について解析した結果、*Pb* XAT 感染においてこれら DC サブセットの総数が *Pb* NK65 感染マウスと比較して原虫血症の急性期と下降期に顕著に増加した。*Pb* NK65 が感染するとマウスは重度の原虫血症を示し死亡するが *Pb* XAT 感染では自然治癒することから、これらの DC の増殖がマラリア感染防御に深く関与していると考えられた。これら DC の割合を調べると、特に *Pb* NK65 感染急性期において cDC が著しく

低下することを認めた。この低下は pDC や CD11c<sup>int</sup>B220<sup>int</sup> 細胞には認められなかったことから、感染初期の cDC の増殖抑制がその後の感染の増悪を促進する可能性があると考えられた。

一方、CD3<sup>-</sup> で gate した CD11c<sup>+</sup>B220<sup>int</sup> 細胞に注目して解析をすると、この細胞は非感染マウスでは殆ど認められなかったが、*P. berghei* 感染後 6 日目で増殖し、*Pb* NK65 に比べて *Pb* XAT 感染で割合が高かった。我々は、*Pb* NK65 感染の重症病態が *Pb* XAT や *Py* 17XNL などの弱毒株との混合感染によって抑制されることを明らかにしているが、この混合感染時に CD11c<sup>+</sup>B220<sup>int</sup> 細胞の割合が高いという弱毒株感染型のフェノタイプを示したことから、感染初期におけるこの細胞の活性化が病態抑制に関与すると推察された。

2) 研究期間後半では、自然免疫リンパ球  $g\delta$  T 細胞によるマラリア原虫排除機構を解明するため、*Pb* XAT に感染した野生型 (WT) マウスと TCR $\delta$  KO マウスの比較をおこなった。その結果、血中 IFN- $\gamma$  が感染 TCR $\delta$  KO マウスにおいて低下している事が明らかとなった。主な IFN- $\gamma$  産生細胞であるヘルパー T 細胞 (CD4<sup>+</sup>T 細胞) のうち Th1 細胞への影響を調べたところ、感染 TCR $\delta$  KO マウスでは Th1 細胞における IFN- $\gamma$  産生の割合が低下していることがわかった。さらに、感染 WT マウスの脾臓では、この Th1 細胞の IFN- $\gamma$  産生の誘導に先立って、 $g\delta$  T 細胞の IFN- $\gamma$  産生が活性化されていることを明らかにした。すなわち、 $g\delta$  T 細胞はナイーブ T 細胞から Th1 細胞への分化誘導を促進する役割を担っていることが示唆された。

Th1 細胞への分化は DC によっても促進されるため、次に、 $g\delta$  T 細胞の DC の成熟への影響について検討した。その結果、感染 WT マウスでは脾臓中の conventional DC と plasmacytoid DC が一時的に増加することがわかった。また、それと同時に MHC-class II や共刺激分子である CD80, CD86, CD40 などの発現が一時的に上昇することがわかった。感染 TCR $\delta$  KO マウスを同様に解析し比較すると、DC の増加や MHC-class II や共刺激分子の発現上昇が弱くなっていることが明らかになった。すなわち、 $g\delta$  T 細胞は DC の成熟・活性化に重要な役割を担っていると言える。先述した、感染後の  $g\delta$  T 細胞における IFN- $\gamma$  産生の活性化の始まりは、DC の増殖や成熟とほぼ同時期であり、 $g\delta$  T 細胞と DC が協調的に

活性化を行っている可能性が示唆された。マラリア原虫感染における $\gamma\delta$ T細胞とDCの関係性についてはいまだに未解明のままである。本研究の結果はその一端を明らかにした重要なものといえる。

#### 5. 主な発表論文等

(下線：研究代表者及び研究分担者)

[雑誌論文] (計6件)

①Hikosaka K, Watanabe Y, Kobayashi F, Waki S, Kita K, Tanabe K: Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. *Parasitol Int*, 60: 175-180, 2011. (査読有り)

②Niikura M, Kamiya S, Nakane A, Kita K, Kobayashi F: IL-10 plays a crucial role for the protection of experimental cerebral malaria by coinfection with nonlethal malaria parasites. *Int J Parasitol*, 40: 101-108, 2010. (査読有り)

③Ishih A, Nagata T, Kobayashi F, Muregi F.W, Ohori K, Miyase T: Possible involvement of IFN- $\gamma$  in earlier mortality of *Plasmodium berghei* NK65-infected BALB/c mice after febrifugine treatment. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 39 (6): 949-956, 2008. (査読有り)

④Niikura M, Kamiya S, Kita K, Kobayashi F: Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. *J Immunol*, 180 (10): 6877-6884, 2008. (査読有り)

[学会発表] (計14件)

①Niikura M, Inoue S-I, Kobayashi F: Spleen plays a pathological role during *Plasmodium berghei* ANKA infection. 第70回日本寄生虫学会東日本大会, 栃木, 平成22年10月2日.

②Niikura M, Inoue S-I, Kobayashi F: The influence of splenectomy on the outcome of coinfection with lethal *Plasmodium berghei* ANKA and nonlethal *P. berghei* XAT. ICOPA XII, Melbourne, Australia, August 15th-20th, 2010.

③新倉 保, 井上信一, 小林富美恵: マウス

マラリア原虫複合感染において脾臓は原虫血症の増悪に關与する. 第18回分子寄生虫ワークショップ, 群馬, 平成22年8月2日-5日.

④新倉 保<sup>1</sup>, 小林富美恵 (1杏林大・院・医・実験動物): マウスマラリア原虫複合感染における脾臓の役割. 第3回原虫感染免疫研究会, 長崎, 平成22年3月26日-27日.

⑤Ishih A, Kobayashi F: Outcome of chloroquine treatment on *Plasmodium yoelii* 17XL infection in mice. 第69回日本寄生虫学会東日本大会, 東京, 平成21年10月3日.

⑥Niikura M, Kita K, Kobayashi F: Coinfection with nonlethal malaria parasites suppresses experimental cerebral malaria in IL-10-dependent manner. 第78回日本寄生虫学会大会, 東京, 平成21年3月27-28日.

⑦新倉 保, 北 潔, 小林富美恵: マウスマラリア原虫複合感染におけるIL-10の意義と役割. 第2回原虫感染免疫研究会, 佐賀市, 平成21年2月21日-22日

⑧Kobayashi F, Niikura M, Kita K: Suppression of severe pathogenesis during coinfection with lethal and nonlethal malaria parasites: A consideration of possible mechanisms by using murine malaria models. JSPS Seminar, 2009: Strategies for controlling emerging and re-emerging infectious diseases in Southeast Asia in JSPS Core University Program, Tokyo, January 20<sup>th</sup>, 2009.

⑨Niikura M, Kobayashi F: IL-10 plays a crucial role for the suppression of experimental cerebral malaria by coinfection with nonlethal murine malaria parasites. The 38th Annual Meeting of Japanese Society of Immunologists, Kyoto, December 1-3, 2008.

[図書] (計2件)

①新倉 保, 小林富美恵: マラリア原虫複合感染と病態の重症化との関係. アニテックス (研成社), 23 (2): 29-34, 2011.

②小林富美恵: 寄生虫感染症. 分子予防環境医学研究会編「分子予防環境医学」改訂版,

本の泉社, 東京, 2010.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 富美恵 (KOBAYASHI FUMIE)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号 : 20118889

### (2) 研究分担者

新倉 保 (NIIKURA MAMORU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号 : 30407019

井上 信一 (INOUE SHIN-ICHI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号 : 20466030

(H20 : 研究分担者)

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :