

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390125

研究課題名（和文） マラリア感染によるCD4陽性T細胞機能抑制の分子機序の解明

研究課題名（英文） Inhibition of CD4⁺T cell function during infection with malaria parasite

研究代表者

由井 克之（YUI KATSUYUKI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90274638

研究成果の概要（和文）：

マウスマラリア *Plasmodium berghei* ANKAの実験モデルを用い、感染に伴う免疫抑制機序の解析を行った。感染マウスのCD4⁺T細胞は、他のCD4⁺T細胞のIL-2産生を抑制する能力があり、それは液性因子によることを明らかにした。抑制性細胞はfoxp3⁺のマラリア特異的活性化CD4⁺T細胞であった。抑制因子はIL-10やTGF-βではなく、T細胞の産生する新たな抑制性サイトカインXであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated mechanisms of the modulation of T cell immune responses during infection with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). CD4⁺T cells from PbA-infected mice inhibited IL-2 production of other CD4⁺T cells by cytokine-mediated mechanisms. The inhibitory cells were foxp3⁺ activated CD4⁺T cells and were distinct from Tregs. The inhibitory cytokine produced by these CD4⁺T cells was not TGF-β or IL-10, and was identified as a novel T cell producing inhibitory cytokine X.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：マラリア、原虫、T細胞、感染防御、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

人類との長い歴史を有し高度に発達した真核細胞寄生体であるマラリア原虫は寄生適応に優れ、血液内で長期間にわたり持続的に慢性感染をすることができる。この際マラリ

ア原虫のGPIアンカーやヘモゾインは自然免疫系に対して強い活性化刺激能を有する。一方で、原虫は種々の免疫エスケープ機構を有し、感染に伴い宿主の免疫応答が抑制される。特にマラリア感染防御で主要な役割を担っ

ているCD4⁺T細胞は、感染の際には免疫修飾を受けて十分な防御効果を発揮できないことが知られている。その機構としては、樹状細胞の抗原提示機能の低下、抗原特異的T細胞のアポトーシス、制御性T細胞の活性亢進などが報告されているが、その仕組みは十分に理解されていない。

我々は、モデル抗原としてOVA(ovalbumin)を発現する組換えマウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)を三重大学・油田教授らとの共同研究で作成し、マラリア感染に伴う宿主免疫応答の修飾についての研究を進めている。これらの結果、マラリア感染では、感染マウスCD4⁺T細胞はT細胞受容体 (TCR) 刺激に対してIFN- γ は産生するが、IL-2産生は殆ど示さないことを明らかにした。さらに、PbA感染マウスのCD4⁺T細胞の中には、他の細胞の抗原刺激によるIL-2産生を抑制する細胞が存在することを強く示唆する実験結果を得ていた。この抑制性T細胞は、CD25⁺CD4⁺T細胞であり、foxp3⁺の制御性T細胞とは異なる新規の制御性T細胞であると考えられた。抑制活性は感染マウスT細胞の培養上清に存在し、抑制は液性因子によると考えられた。

2. 研究の目的

これまでの研究で、マラリア感染時にマラリア特異的新規制御性T細胞の存在とこの細胞により分泌される新規抑制性サイトカイン様物質の存在が明らかになったことから、本研究ではマラリア感染マウスCD4⁺T細胞の産生するIL-2産生抑制因子を同定する。また、マラリア感染時にこのサイトカインを産生する細胞を確認・同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスのマラリア原虫 PbA 及びモデル抗原として OVA を発現する組換えマラリア原虫 (PbA-OVA) を用いた。OVA 特異的 TCR トランスジェニックマウス OT-II を用いた。通常の近交系マウスは業者から購入した。遺伝子改変マウスは、他研究者からの分与、或いはジャクソン研究所から購入した。動物実験は、長崎大学動物実験委員会により審査された実験計画に基づいて行った。感染動物の原虫血症レベルは、血液スメア標本を作製して顕微鏡下でカウントした。T細胞を養子移入する実験では、移入するT細胞と宿主側の細胞をCD45.1 或いはCD45.2 のコンジュニクマウスを用いることにより識別した。

(2) 細胞表面分子発現や、細胞内サイトカイン産生は、蛍光色素ラベル抗体を用いて染色し、フローサイトメトリー法により解析した。また、細胞の分離精製は磁気ビーズ法或いは FACS Aria II を用いてソーティングにより行った。

(3) サイトカイン産生は、培養上清中のサイトカイン量をサンドイッチ ELISA 法により測定した。また、リアルタイム RT-PCR により RNA 発現を調べた。

(4) マラリア感染マウスの培養T細胞中に含まれる抑制因子の精製は、ゲル濾過カラム、脱塩処理、陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラムなど、様々な蛋白分離法を用いて行った。活性の測定は、C57BL/6 マウスのCD4⁺T細胞を抗TCR抗体で刺激し産生するIL-2の低下により抑制能を判定した。

(5) 感染マウスと非感染マウスCD4⁺T細胞の発現遺伝子については、網羅的アレイ解析を行い、両者に高発現される遺伝子の違いを gene spring を用いて解析した。

(6) 各種サイトカイン遺伝子ノックアウトマウスを用い、PbA感染後CD4⁺T細胞を分離

し、抗TCR抗体による刺激後のIL-2産生及び抑制因子産生能について検討した。

4. 研究成果

(1) PbA感染マウスCD4⁺ T細胞のサイトカイン産生

TCR刺激に対して感染マウスCD4⁺ T細胞は、IL-2産生低下、IFN- γ 、IL-4、IL-10産生亢進を示した。このような変化は、PbA感染後5日目、原虫血症の出現と一致していた。また、クロロキン投与でマラリア治療を行うと、原虫血症低下に伴いCD4⁺ T細胞のサイトカイン産生能も回復した。

(2) サイトカイン産生細胞の解析

OVA特異的TCRトランスジェニックマウスOT-IIを受け身移入したC57BL/6マウスにPbA-OVAに感染させた。原虫血症上昇後OT-IIと宿主CD4⁺ T細胞のサイトカイン産生を調べた。感染マウスのOT-II細胞は、特にIL-2産生低下やIFN- γ 産生亢進を示さなかった。一方、宿主のCD4⁺ T細胞はIL-2産生低下とIFN- γ 産生亢進を示した。さらに、これらの宿主CD4⁺ T細胞はCD44⁺CD62L⁺活性化T細胞であり、マラリア特異的に活性化されたT細胞であることが示唆された。

(3) IFN- γ 産生亢進の解析

OT-IIを用いた実験から、OVAに対してIFN- γ 産生亢進が見られるが、IFN- γ 産生はOT-II以外のCD4⁺ T細胞であることが明らかになった。OT-II細胞の産生する液性因子が必要であることから、さらに調べた結果、OT-II細胞がIL-2を産生し、これに反応してマラリア特異的に活性化されIL-2受容体を発現した宿主CD4⁺ T細胞がIFN- γ を高産生することが明らかになった。さらに、CD4⁺ T細胞によるマラリア抗原特異的IFN- γ 産生は抗IL-2受容体抗体で完全にブロックされることから、マラリア感染動物におけるCD4⁺ T

細胞のIFN- γ 産生はIL-2依存的事であることが明らかになった。CD4⁺ T細胞のIFN- γ 産生については、我々はIL-2依存的事である場合と非依存的事である場合とがあることを明らかにしており、どのような場合にIL-2依存性が生ずるのかについては今後解析を進める必要がある。

(4) IL-2産生抑制に関する解析

感染マウスCD4⁺ T細胞は、TCR刺激に対するIL-2産生能が低い。内在的な低下なのか、抑制による低下なのかを明らかにするため、非感染マウスCD4⁺ T細胞の培養系に感染マウスCD4⁺ T細胞を加えて培養したところ、非感染マウスCD4⁺ T細胞のIL-2産生が低下し、抑制によることが明らかになった。さらに、感染マウスCD4⁺ T細胞の培養上清中に、非感染マウスCD4⁺ T細胞のIL-2産生を抑制する物質が含まれていることが明らかになった。この抑制物質について、既知のサイトカインを検討した。抗IL-10抗体、抗TGF- β 抗体、抗IL-4抗体、抗IFN- γ 抗体ではこの抑制活性を十分に中和することができず、新規サイトカインである可能性が高いと考えられた。

(5) 新規抑制物質の検討

感染マウスCD4⁺ T細胞を抗TCR抗体で刺激した培養上清を大量に集め、ここから抑制性サイトカインの精製を試みた。イオン交換カラム、ゲル濾過カラムなどを試みたが、抑制活性を濃縮できるフラクションには至らず、蛋白精製は困難であった。また、非感染マウスCD4⁺ T細胞、感染マウスCD4⁺ T細胞から各々RNAを回収して全ゲノム配列の発現アレイ解析により感染マウスCD4⁺ T細胞に高発現されるRNAについても検討したが、抑制物質の候補となるような物質は出現しなかった。

(6) 遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析

様々な試みを行う中で、遺伝子 X (非公開) のノックアウトマウスを用いて感染実験を行ったところ、IL-2 産生低下がみられないマウスがいた。この遺伝子 X が抑制性サイトカイン関連物質と考えられ、現在さらに詳細な解析を進めている。詳細については、現時点でまだ非公表であることから、本報告書では控えさせていただく。

(7) その他の成果

PbAはC57BL/6 マウスに脳マラリアを発病させることが知られている。そこで、脳マラリアにおけるT細胞の働きを調べる目的で、樹状細胞増殖因子Flt3 ligandのプラスミドを投与して発現させ、樹状細胞を*in vivo*で増殖させた。このモデルでは、原虫血症の低下と脳マラリアを発症しないことが明らかになった。CD8⁺T細胞は増殖するが、表現型などが通常の活性化CD8⁺T細胞と異なっていた。また、脳にCD8⁺T細胞は集積したが、表現型は脳マラリア発症マウスのCD8⁺T細胞と異なっていた。脳マラリアの発症にはCD8⁺T細胞の脳集積だけでは十分でなく、T細胞の活性化様式も関与していることが示唆された。

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 6 件)

Okamoto, K., Kinoshita, H., del Camen Parquet, M., Rawekiensya, M., Kimura, D., Yui, K., Alimul Islam, M., Hasebe, F., Morita, K., DEN2 16681 strain utilizes specific glycochain of Syndecan-2 proteoglycan as a receptor, J. Gen. Virol., 93: 761-770, 2012.

Shindo, H., Yasui, K., Yamamoto, K., Honma, K., Yui, K., Kohno, K., Ma, Y. Chua, K.J., Kubo,

Y., Aihara, H., Ito, T., Nagayasu, T., Matsuyama, T., Hayashi, H., Interferon regulatory factor-4 activates IL-2 and IL-4 promoters in cooperation with c-Rel, Cytokine, 56 (3); 564-572. 2011.

Tamura, T., Kimura, K., Yuda, M., Yui, K., Flt3 ligand prevents the development of cerebral malaria during infection with *Plasmodium berghei* ANKA. Infection and Immunity, 79 (10), 3947-3956. 2011.

Taguchi, T., Inamura, Y., Honma, K., Kimura, D., Miyakoda M., Miyazaki, T., Tsuchiya, T., Yamasaki, N., Tagawa, T., Nagayasu, T., Yui, K. Characterization of waves of leukocyte recruitment to the lung allograft and the effect of CTLA4-Ig, Acta Medica Nagasakientia. 56: 27-34. 2011

Kimura D., Miyakoda M., Honma K., Yuda M., Chinzei Y., and Yui K., Production of IFN- γ by CD4⁺ T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. Int. Immunol., 22 (12); 941-952, Dec. 2010.

Satoh, T., Takeuchi, O., Vnadenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T., Matsushita, K., Okazaki, T., Saitoh, T., Honma, K., Matsuyama, T., Yui, K., Tsujimura, T., Standley, D.M., Nakanishi, K., Nakai, K., Akira, S., The JMJD3-IRF4 axis regulates M2 macrophage polarization and host response against helminth infection. Nature Immunol., 11 (10): 936-944, Oct. 2010

[学会発表] (計 13 件)

Regulation of INF- γ Production in CD4⁺ T Cells

during Infection with *Plasmodium berghei*, K. Yui, Adaptive and innate immune responses to neglected tropical diseases, January 10-11, 2010, San Diego, USA

Production of IFN- γ by CD4⁺T cells in response to malaria antigen is IL-2 dependent during infection with *Plasmodium berghei*, D. Kimura, M. Miyakoda, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, Y. Chinzei, K. Yui, p105, April 11-16, 2010, Keystone Symposia on Molecular and cellular biology, Immunologic memory, Malaria: new approaches to understanding host-parasite interactions, Colorado, USA

CD4⁺ T細胞のマラリア原虫抗原特異的IFN- γ 産生はIL-2 依存的である。木村大輔、都田真奈、本間季里、木村一美、油田正夫、鎮西康雄、由井克之、2D-ML30 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 2010年5月20日21日

Production of IFN- γ by CD4⁺ T cells in response to malaria antigen is IL-2-dependent, D. Kimura, M. Miyakoda, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, Y. Chinzei, K. Yui, 14th International congress of Immunology Kobe August 22-27, 2010

Reduction of the memory CD8⁺ T cell responses during infection with *Plasmodium berghei* ANKA, M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, Y. Chinzei, K. Yui, 14th International congress of Immunology Kobe August 22-27, 2010

Complete abrogation of sporozoite-induced sterile immunity by blood stage parasites of homologous and heterologous malaria parasites,

M. Inoue, J. Tang, O. Kaneko, K. Yui, R. Culleton, Malaria J., 9 (suppl) O19, 2010

Prevention of cerebral malaria by Flt3 ligand during infection with *Plasmodium berghei* ANKA, T. Tamura, K. Kimura, M. Yuda, K. Yui, 45th annual Japan-US joint conference on parasitic diseases, Jan. 10-11, 2011.

Flt3 ligand発現による実験的脳マラリア発症抑制メカニズムの解析、田村隆彦、木村一美、油田正夫、由井克之、第80回日本寄生虫学会大会、7月17、18日、2011年

マラリア原虫感染における抗原特異的CD8⁺T細胞の分化、都田真奈、木村大輔、本間季里、木村一美、油田正夫、由井克之、第80回日本寄生虫学会大会、7月17、18日、2011年

モデル抗原組換えマラリア原虫を用いた肝細胞期防御免疫応答の解析、木村一美、木村大輔、都田真奈、本間季里、田村隆彦、由井克之、第40回日本免疫学会学術集会、11月27-29日、2011年

マラリア赤内型および赤外型に対する獲得防御免疫の種特異性、井上愛実、ズングラナ・オーグスチン、都田真奈、唐建霞、金子修、由井克之、カレントン・リチャード、第81回日本寄生虫学会大会、3月23-24日、2012年

マウスマラリア感染におけるFlt3 ligand発現による原虫血症抑制メカニズムの解析、田村隆彦、木村一美、油田正夫、由井克之、第81回日本寄生虫学会大会、3月23-24日、2012年

マラリア原虫感染によって引き起こされる
CD4⁺T細胞のIL-12産生抑制機序の解析、木村大輔、都田真奈、本間季里、木村一美、原博満、吉田裕樹、由井克之、第81回日本寄生虫学会大会、3月23-24日、2012年

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/im/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

由井 克之 (YUI Katsuyuki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90274638

(2)研究分担者

木村大輔 (Kimura Daisuke)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50423637

水崎 博文 (MIZUSAKI Hirofumi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40467957

(3)連携研究者

なし