

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790408

研究課題名(和文) マラリア原虫感染中に誘導される制御性 CD4⁺ T 細胞が産生する制御因子の同定

研究代表者

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

研究成果の概要(和文)：

IL-2 産生を抑制する因子を同定するために、イオン交換カラムを用いて精製を試みたところ抑制活性を含む分画が得られた。しかしながらこの分画には可溶性 IL-2 が含まれていることも確認されたことから、新規抑制性サイトカインではなく可溶性 IL-2 受容体による IL-2 の消失が新たな可能性が示唆された。そこで IL-2 受容体に対するカラムを作成し抑制因子を含む分画から可溶性 IL-2 受容体を除去して抑制能が失われるかを検討したところ、可溶性 IL-2 受容体除去しても除去前と同様の抑制能が得られた。

初期精製(イオン交換カラム)で得られた分画には培地に含まれる牛血清成分が多く含まれていた。さらに抑制因子とアルブミン等は等電点が近くイオン交換カラムではこれ以上の分離が不可能であることが明らかとなった。そこで硫酸塩析法による分画を検討したところ、30-40%飽和度において抑制因子を含む分画を得たうえで高濃度に濃縮することができた。

我々は CD4⁺ T 細胞のマラリア原虫抗原特異的なサイトカイン産生が IL-2 依存的であることを明らかにし報告した(*Int. Immunol.*)。これは、マラリア原虫感染によって引き起こされる IL-2 産生抑制メカニズムを明らかにしようとする本研究計画の意義について異なる角度から証明した。

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1900000	570000	2470000
2010 年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：マラリア、CD4⁺ T 細胞、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫感染すると、宿主免疫応答が抑制されることが知られている。しかしながら、その抑制メカニズムは十分に明らかにされていないばかりでなく、原虫によってどのような免疫修飾が引き起こされているのかすらよくわかっていない。このことは、有効なワクチンが未だに開発されていない大きな

原因の1つと考えられる。よって、免疫抑制メカニズムの解明および免疫修飾に関する研究は必須である。これまでに我々は以下の点について明らかにしており、マラリア原虫感染による新たな免疫抑制メカニズムの可能性を示した。

(1) *in vivo* における CD4⁺ T 細胞の増殖は、

マラリア原虫感染により抑制される。

(2) マラリア原虫感染によって、CD4⁺ T 細胞は IL-2 選択的に産生欠如となる。

(3) マラリア原虫感染マウスの CD4⁺ T 細胞は、CD25⁺ Treg 非依存的に T 細胞の IL-2 産生を抑制する。

(4) マラリア原虫感染マウスの CD4⁺ T 細胞は、液性因子によって T 細胞の IL-2 産生を抑制する。

(5) IL-2 産生の抑制は、既知の抑制性サイトカインによるものではない。

2. 研究の目的

新規抑制性サイトカインを同定するために、マラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA) 感染マウス CD4⁺ T 細胞の培養上清から正常 T 細胞の抗原刺激に対する IL-2 産生を抑制する物質を分離精製することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 感染マウス CD4⁺ T 細胞の培養上清の回収
目的分子をできるだけ多く含む検体を準備するために以下の操作を行う。

- ・感染マウスの脾細胞から CD4⁺ T 細胞を精製する。
- ・抗 T 細胞受容抗体をコーティングしたプレート内にて 48 時間培養後上清を回収する。
- ・回収上清の一部を非感染マウスの CD4⁺ T 細胞の培養に添加し、IL-2 抑制能を確認する。
- ・限外濾過等を用いた濃縮の検討を行う。

2) カラムクロマトグラフィによる精製

準備した検体よりできるだけ少ないステップで効率よく目的分子を精製するために初期精製、中間精製、最終精製の特性を考えて行う。

- ・初期精製：大量の検体を一度にカラムに

かけることが可能で分離能の高いイオン交換カラムを用いて分画する。

- ・中間・最終精製：初期精製後透析の必要がないだけでなく、イオン交換カラムでは不可能な低塩濃度での分離に適している疎水性カラム、あるいは分子量で分離できるゲルろ過を適宜使い分けて分画する。
- ・各カラムによる分画後、蛋白を含む分画について透析および濾過滅菌処理を行う。これを非感染マウス CD4⁺ T 細胞の培養に添加し、IL-2 抑制分子を含む分画を特定する。

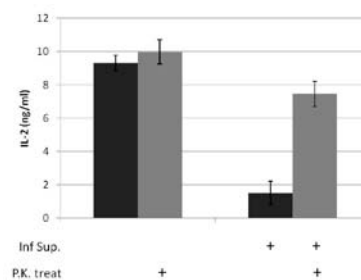
3) 抗原特異的増殖抑制の解析

- ・OT-II 細胞を CFSE ラベルし、B6 マウスに移入して PbA 感染させた。その後、原虫血症が上昇し始めたなら OVA を腹腔から 100mg、pCAGGS/mIL-2 を尾静脈から 0.5mg/2ml を投与した。

4. 研究成果

1) 抑制因子は蛋白質である。

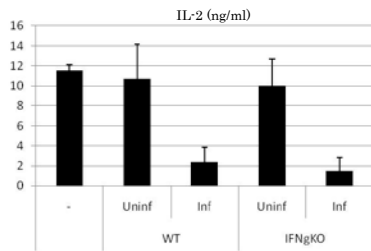
マラリア原虫感染マウスの CD4⁺ T 細胞を刺激・培養することで得た上清を蛋白分解酵素 (proteinase K) で十分な処理 (37°C, 120min) を行った後、非感染マウスの CD4⁺ T 細胞を抗 TCR 抗体刺激と同時に加えた。未処理の感染マウスの CD4⁺ T 細胞培養上清を添加した場合、IL-2 産生は低下するのに対し、処理したものを加えた場合 IL-2 産生は低下しなかった (図 1)。このことから抑制因子がたんぱく質であることが強く示唆された。



2) 抑制因子は IFN- γ ではない。

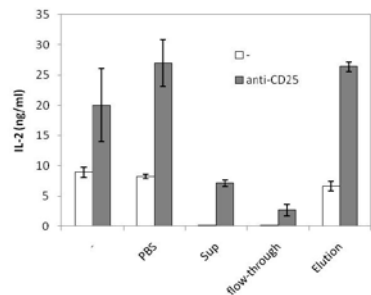
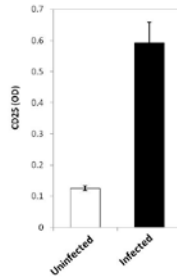
感染マウスの CD4⁺ T 細胞培養上清中に含ま

れるサイトカインで最も高値を示すのが IFN- γ である。さらに以前に IFN- γ を中和した結果抑制効果がわずかに減弱した。そこで IFN- γ の IL-2 産生抑制への関与について確認する目的で、IFN- γ KO マウスを用いて再検討した。マラリア感染した KO マウスの CD4⁺T 細胞を抗 TCR 抗体刺激したところ、その培養上清には IFN- γ は含まれていないにも関わらず IL-2 産生を抑制する能力が認められた。



3) IL-2 産生低下に可溶性 IL-2 受容体は関与していない。

感染マウスの CD4⁺T 細胞の培養上清には、非感染に比べ有意に高いレベルの可溶性 IL-2 受容体が認められた。このことから、CD4⁺T 細胞が産生した IL-2 は、可溶性 IL-2 受容体と結合することで中和されている可能性が新たに考えられた。そこで、感染マウスの CD4⁺T 細胞の培養上清中に含まれる可溶性 IL-2 受容体をカラムを用いて除去し、IL-2 抑制能が残存するか確認した (図 3-b,c)。

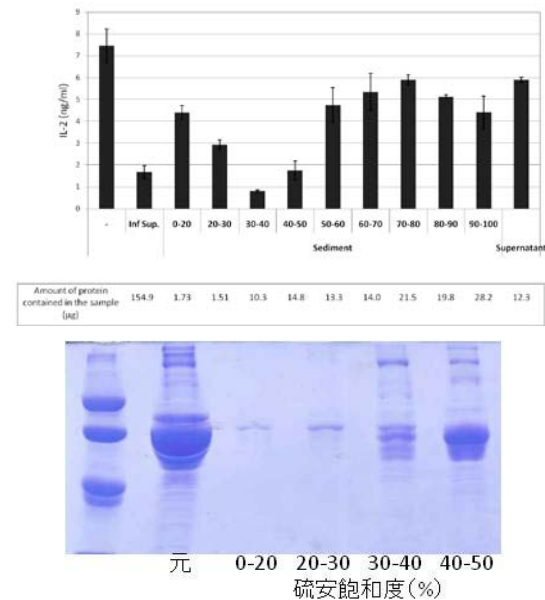


その結果、可溶性 IL-2 受容体が除去された

分画に抑制活性が認められ、可溶性 IL-2 受容体が含まれる分画には抑制活性は認められなかった。以上から IL-2 産生抑制に可溶性 IL-2 受容体は関与していないことが明らかとなった。

4) 硫酸分画による粗精製

結果硫酸アンモニウムをサンプルに 30-40% 飽和度になるように添加した際の析出したものに IL-2 産生抑制効果が認められた。蛋白量としては 1/15 程度まで減らすことが出来、且つサンプルを高濃度に濃縮できた。

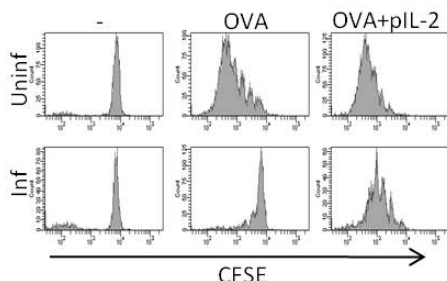


現在この濃縮サンプルを用いてゲルろ過による分離精製を検討中である。

5) マラリア原虫感染中における IL-2 増補効果の検討。

前述したようにマラリア原虫感染によって CD4⁺T 細胞の抗原特異的増殖は抑制される。この原因が CD4⁺T 細胞の IL-2 産生低下によるものかどうか明らかにする目的で、強制的にマウス体内で IL-2 を発現させることができる pCAGGS/mIL-2 の大量投与法を用いた。その結果、非感染マウスへの OVA 単独投与で認められた OT-II の分裂は感染マウスでは著しく低下していた。しかしながら、

pCAGGS/mIL-2 を投与することで、PbA 感染による増殖低下は回復していた。このことから、感染による抗原特異的 CD4⁺T 細胞増殖抑制は、IL-2 低下が原因である可能性が示唆された。



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 2 件)

1. Kimura D, Miyakoda M, Honma K, Shibata Y, Yuda M, Chinzei Y, Yui K. Production of IFN- γ by CD4⁺ T cells in response to malaria antigens is IL-2-dependent. *International Immunology* 22: 941-952 2010

2. T. Taguchi, Y. Inamura, K. Honma, D. Kimura, M. Miyakoda, T. Miyazaki, T. Tsuchiya, N. Yamasaki, T. Tagawa, T. Nagayasu and K. Yui Characterization of waves of leukocyte recruitment to the lung allograft and the effect of CTLA4-Ig. *Acta medica Nagasakiensis* in press

[学会発表] (計 4 件)

Daisuke Kimura, Mana Miyakoda, Kiri Honma, Kazumi Kimura, Katsuyuki Yui

CD4⁺ T-cells from mice infected with Plasmodium berghei ANKA produce high levels of IFN- γ in response to cytokine-like molecule generated by other CD4⁺ T cells

日本免疫学会 大阪 2009 年 12 月 2-4 日

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

マラリア原虫感染における抗原特異的 CD4⁺
T 細胞の IFN- γ 産生は IL-2 依存的である
感染症沖縄フォーラム 沖縄 2010 年 2 月
11-13 日

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

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

第 79 日本寄生虫学会 旭川 2010 年 5 月
20-21 日

Daisuke Kimura, Mana Miyakoda, Kiri
Honma, Kazumi Kimura, Masao Yuda,
Yasuo Chinzei and Katsuyuki Yui

Production of IFN- γ by CD4⁺ T cells in
response to malaria antigen is
IL-2-dependent

第 14 回国際免疫学会 神戸 2010 年 8 月
22-27 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし