

## 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 5月28日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790410

研究課題名（和文） マラリアにおける病態重症化の抑制に関する研究

研究課題名（英文） The suppression of severe pathology during coinfection with *Plasmodium berghei* ANKA and *Plasmodium berghei* XAT

研究代表者

新倉 保 (NIIKURA MAMORU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：30407019

研究成果の概要（和文）：本研究の成果により、弱毒化原虫 *Plasmodium berghei* (*Pb*) XAT との複合感染による強毒株 *Pb* ANKA の病態重症化の抑制には、弱毒化原虫に対して宿主免疫が特異的に応答することで誘導される IL-10R 発現細胞と IL-10 が重要な役割を果たしていることが示された。また、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果は、脾臓および TLR を介さずに誘導できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, it is demonstrated that IL-10 Receptor (R)<sup>+</sup> cells and IL-10 play a crucial role for suppressing the severe pathology such as cerebral malaria during coinfection with *Plasmodium berghei* (*Pb*) ANKA and *Pb* XAT. It is seemed that IL-10R<sup>+</sup> cells and IL-10 were induced by the specific immune response against *Pb* XAT. In addition, the suppression of severe pathology during coinfection with *Pb* ANKA and *Pb* XAT was independent of spleen and Toll-like receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：マラリア原虫、複合感染、病態重症化の抑制、IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

悪性の熱帯熱マラリア原虫に感染したヒトは脳マラリア、呼吸器障害または肝傷害などを併発することで急激に病態が重症化し、多くの場合死に至る。一方、良性の三日熱マラリア原虫が複合感染している場合、病態の重症化が抑制されることがある。しかし、三日熱マラリア原虫との複合感染による病態重症化の抑制機序は解明されていない。

*Plasmodium berghei* (*Pb*) ANKA は致死性

のマウスマラリア原虫である。*Pb* ANKA を感染させたマウスは、感染早期（感染後 7-8 日目）にヒトの脳マラリアと類似する脳症を引き起こし、マウスは死亡することから、その病態モデルとして研究に多用されている。一方、*Pb* XAT は弱毒化した非致死性のマウスマラリア原虫である。弱毒化原虫 *Pb* XAT をマウスに感染させると、マウスは低レベルの原虫血症を引き起こすが、感染後 30 日程度で自然治癒する。

これまでの申請者の研究成果により、*Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させると脳症の発症を抑制できることが明らかとなった。また、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果には抗炎症性サイトカインである IL-10 が関与していることを見出している。

弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果に関わる IL-10 は、宿主の免疫が弱毒化原虫 *Pb* XAT に対して応答することでその産生が誘導されていると推測される。そこで、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制機序を明らかにするためには、弱毒化原虫に対して特異的に応答する宿主免疫応答について解析する必要があると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

弱毒化マラリア原虫との複合感染による病態重症化の抑制には、弱毒化原虫に特異的な宿主免疫応答が関与していることが推察される。そこで本研究では、まず、脳症抑制効果と IL-10 の関係を明らかにすることとした。次に病態重症化の抑制に関わる弱毒化原虫特異的な宿主免疫誘導機序を解析し、最終的にマラリア感染における IL-10 の意義と役割を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果と IL-10 の関係

IL-10 KO マウスに強毒株 *Pb* ANKA または弱毒化原虫 *Pb* XAT を単独感染させ、それぞれの感染に対する脾臓の役割を解析した。次に、IL-10 KO マウスに強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させ、脳症抑制効果と IL-10 の関係を解析した。

### (2) 弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果と脾臓の関係

脾臓はマラリア原虫感染赤血球の排除およびマラリア原虫に対する宿主免疫応答の場として重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による病態重症化の抑制効果は、脾臓を介して誘導される弱毒化原虫特異的な免疫が関与していると推測した。

摘脾したマウスに強毒株 *Pb* ANKA および弱毒化原虫 *Pb* XAT を単独感染させ、それぞれの感染に対する脾臓の役割を解析した。次に、摘脾したマウスに強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させ、脳症抑制効果と脾臓の関係を解析した。

### (3) 弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果と Toll-like receptor の関係

Toll-like receptor (TLR) は病原体認識

受容体の一つで、特に樹状細胞やマクロファージなどの貪食細胞が関わる自然免疫応答において重要な役割を果たしている。弱毒化原虫 *Pb* XAT は TLR によって特異的に認識されている可能性がある。そこで、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による病態重症化の抑制効果には、TLR を介して誘導される弱毒化原虫特異的な免疫が関与していると推測した。

TLR2/4/9KO マウスおよび TLR7/9KO マウスに強毒株 *Pb* ANKA を単独感染させ、それぞれの感染に対する TLR の役割について解析を行った。弱毒化原虫 *Pb* XAT についても同様の解析を行った。次に、TLR2/4/9KO マウスおよび TLR7/9KO マウスに弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させ、脳症抑制効果と TLR の関係を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果と IL-10 の関係

強毒株 *Pb* ANKA を感染させた IL-10KO マウスは、*Pb* ANKA を感染させた野生型マウスより約 1 日早く脳症を発症した。一方、IL-10KO マウスにおける弱毒化原虫 *Pb* XAT の感染経過は、野生型マウスと比較して著しい差異は認められなかった。

強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を IL-10KO マウスに複合感染させると、IL-10KO マウスは脳症を引き起こし、感染後 7-10 日目で死亡した。病理組織解析の結果、複合感染させた IL-10KO マウスの脳では典型的な脳症の症状である点状出血が認められ、脳血管内には白血球と感染赤血球が観察された。また、複合感染させた IL-10KO マウスにおいて、炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  が強毒株 *Pb* ANKA 単独感染と同程度まで増加したことから、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染では IL-10 が IFN- $\gamma$  産生の抑制に関与していると考えられる。これらの結果から、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制には IL-10 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

強毒株 *Pb* ANKA 感染によって引き起こされる脳症は、炎症性サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、LT- $\alpha$ ) や CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞が発症に関与することが知られている。しかし、強毒株 *Pb* ANKA 感染の脳症発症時には IL-10 の産生増加も認められた。この結果から、弱毒化原虫 *Pb* XAT に対する免疫応答の結果、IL-10 Receptor (R) 発現細胞が誘導されていると推測し、FACS 解析を行った。

弱毒化原虫 *Pb* XAT 単独感染マウスについて解析を行った結果、感染後 6 日目の脾臓で高レベルに IL-10R を発現する細胞が増加することを見出した。この IL-10R 高発現細胞は形質樹状細胞のマーカーである PDCA-1 を発現していた。*Pb* ANKA 単独感染マウスにお

いても、感染後 6 日目に脾臓中 PDCA-1 発現細胞の増加が認められたが、PDCA-1 発現細胞の IL-10R 発現レベルは *Pb* XAT 単独感染マウスでの発現と比較して有意に低かった。

複合感染させた野生型マウスの感染後 6 日目の脾臓では、弱毒化原虫 *Pb* XAT 単独感染の場合と同様に IL-10R<sup>hi</sup>PDCA-1<sup>+</sup>細胞が認められた。さらに、複合感染させた IL-10KO マウスの感染後 6 日目の脾臓でも IL-10R<sup>hi</sup>PDCA-1<sup>+</sup>細胞が認められた。これらの結果から、弱毒化原虫 *Pb* XAT に対して宿主免疫が応答した結果、IL-10R<sup>hi</sup>PDCA-1<sup>+</sup>細胞が誘導され、脳症発症の抑制に関与している可能性が示唆された。

## (2) 弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果と脾臓の関係

強毒株 *Pb* ANKA および弱毒化原虫 *Pb* XAT の単独感染における脾臓の役割について解析を行った結果、強毒株 *Pb* ANKA が引き起こす脳症は、脾臓に非依存的であった。一方、弱毒化原虫 *Pb* XAT を摘脾したマウスに感染させると、原虫血症が徐々に増悪し、最終的に重症貧血を引き起こして死亡した。

*Pb* ANKA と *Pb* XAT を脾摘したマウスに複合感染させると、脾摘しないマウスと同様に脳症抑制効果が認められたことから、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果に脾臓は関与しないと推察された。一方で、複合感染させた脾摘したマウスは、脾摘しないマウスと比較して原虫血症の増悪は抑制され、生存期間が延長することを見出した。この結果から、マラリア原虫複合感染において脾臓は病態増悪に関与すると示唆された。

強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させたマウスにおける、摘脾による生存期間延長効果について検討した。まず、マラリア原虫の排除に重要な役割を果たす原虫特異抗体について解析したところ、感染後 15 日目の複合感染マウスの *Pb* XAT 特異的 IgG および IgM は、*Pb* XAT 単独感染マウスと比較して著しく低下していた。一方、摘脾することによって *Pb* XAT 特異的 IgM が *Pb* XAT 単独感染マウスと同程度まで増加した。*Pb* XAT 単独感染では、摘脾によって *Pb* XAT 特異的 IgG のみが低下したが、*Pb* XAT 特異的 IgM 濃度に変化は認められなかった。これらの研究結果から、複合感染マウスでは、脾臓に *Pb* ANKA が存在することで *Pb* XAT 特異的 IgM の産生が抑制され、原虫血症の増悪と重症貧血を引き起こした可能性が示唆された。

## (3) 弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果と TLR の関係

強毒株 *Pb* ANKA および弱毒化原虫 *Pb* XAT の単独感染における TLR の役割について解析を行った結果、強毒株 *Pb* ANKA が引き起こす

脳症は、TLR2/4/9 および TLR7/9 非依存的であった。一方、弱毒化原虫 *Pb* XAT を TLR2/4/9KO マウスおよび TLR7/9KO マウスに感染させると、野生型マウスと比較して原虫血症は増悪し、マウスは死亡した。この結果から、弱毒化原虫 *Pb* XAT は TLR によって認識されることが見出され、さらに弱毒化原虫 *Pb* XAT に対する防御免疫の誘導に TLR が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による病態重症化の抑制効果には、TLR を介して誘導される弱毒化原虫特異的免疫が関与していると推測し、TLR2/4/9KO マウスおよび TLR7/9KO マウスに強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させた。しかし、複合感染させた TLR2/4/9KO マウスおよび TLR7/9KO マウスは、野生型マウスと同様に脳症抑制効果が認められたことから、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果に TLR は関与しないことが推察された。

## 総括：マラリア感染における IL-10 の意義と役割

本研究の成果により、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による病態重症化の抑制には、宿主免疫が弱毒株マラリア原虫に対して特異的に応答することで誘導される IL-10R 発現細胞と IL-10 が重要な役割を果たしていることが示された。また、弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染による脳症抑制効果は、脾臓および TLR を介さずに誘導できることが明らかとなった。

強毒株 *Pb* ANKA 感染において、感染後 0-2 日目の CD4<sup>+</sup>T 細胞が脳症発症に重要な役割を果たすことが本研究を遂行する過程で明らかとなっている。一方、弱毒化原虫 *Pb* XAT 感染における CD4<sup>+</sup>T 細胞は防御免疫の成立に重要な役割を果たすことから、弱毒化原虫 *Pb* XAT 感染における CD4<sup>+</sup>T 細胞の誘導/活性化機構は、強毒株 *Pb* ANKA とは異なることが示唆された。樹状細胞は弱毒化原虫を貪食・処理し、MHC class II 分子-T 細胞受容体を介して抗原特異的な CD4<sup>+</sup>T 細胞を誘導することが知られている。このことから、弱毒化原虫複合感染における弱毒化原虫特異的宿主免疫の誘導機序には、脾臓以外の場における MHC class II 分子-T 細胞受容体を介した弱毒化原虫特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の誘導/活性化が関与していることが推察される。

強毒株 *Pb* ANKA 単独感染において、IL-10 の投与によりマウス脳性マラリアの発症が抑制される傾向が示されている。一方で、IL-10 の投与はマラリア原虫の排除に関わる防御免疫も抑制する可能性がある。事実、強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染マウスは感染後期に原虫血症が増悪し、重症貧血を引き起こし、感染後 24 日以内に

全てのマウスが死亡した。

本研究の成果により、強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT 複合感染マウスの病態は摘脾をすることによって軽減することが明らかとなった。複合感染マウスにおいて摘脾をすることによって *Pb* XAT 特異的 IgM が増加したことから、*Pb* XAT 特異的 IgM は原虫排除に寄与すると推測される。一方、複合感染マウスでは脾臓に *Pb* ANKA が存在することで *Pb* XAT 特異的 IgM の産生が抑制される可能性が示唆されたことから、IL-10 以外にも弱毒化原虫 *Pb* XAT に対する防御免疫抑制に関与する因子が存在することが推察される。

世界各地で報告されている多剤耐性熱帯熱マラリア原虫の存在と拡散は、致命的な経過をたどる熱帯熱マラリア原虫感染に対して治療を行う際に非常に深刻な問題となってきた。最も致死性の高い脳性マラリアの発症を宿主免疫応答を利用して制御する機構が解明されれば、熱帯熱マラリアの脅威を低減できる可能性がある。しかし、宿主免疫応答を変化させることによって脳性マラリアを抑制するためには、より詳細な機構を理解する必要がある。病態重症化の抑制に関わる弱毒化原虫特異的宿主免疫の誘導機序の解析は、病態重症化の制御機構だけでなく、マラリアにおける獲得免疫成立機構のさらなる解明の突破口となり、効果的なマラリアワクチン開発に大きく貢献するものと確信する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. **Niikura M.**, Inoue I., Kobayashi F. Role of interleukin-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, (査読あり) Article ID 383962. 2011
  2. **Niikura M.**, Kamiya S., Nakane A., Kita K., Kobayashi F. IL-10 plays a crucial role for the protection of experimental cerebral malaria by co-infection with non-lethal malaria parasites. *International Journal for Parasitology*, (査読あり) 40: 101-108. 2010.
1. 井上信一, **新倉保**, 川上泰, 内田明彦, 小林富美恵.  $\gamma \delta$  T細胞による樹状細胞活性化を介したマラリア原虫感染防御機構の解明. 第81回日本寄生虫学会大会, 西宮, 2012年3月22-24日.
  2. Inoue S., **Niikura M.**, Yokota N., Kawakami Y., Uchida A., Kobayashi F. How  $\gamma \delta$  T cells mediate protective immunity to *Plasmodium berghei* XAT infection. The 5<sup>th</sup> Immunoparasitology Meeting. Osaka, March 1-2<sup>nd</sup>, 2011.
  3. 井上信一, **新倉保**, 横田夏紀, 小林富美恵.  $\gamma \delta$  T細胞による樹状細胞活性化を介したマラリア原虫感染防御機構の解明. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月13-16日.
  4. Inoue S., **Niikura M.**, Yokota N., Kawakami Y., Uchida A., Kobayashi F.  $\gamma \delta$  T cells regulate supply and activation of immune cells during blood-stage *Plasmodium berghei* XAT infection. The 17<sup>th</sup> Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. Nara, September 12-17<sup>th</sup>, 2011.
  5. 井上信一, **新倉保**, 小林富美恵. マラリア感染が明らかにする自然免疫リンパ球の新たな役割. 第71回日本寄生虫学東日本支部大会, 東京, 2011年10月1日
  6. **新倉保**, 井上信一, 小林富美恵. *Plasmodium berghei* ANKA が引き起こす脳症の抑制に関する研究. 第40回杏林医学会総会, 東京, 2011年11月19日
  7. **Niikura M.**, Inoue S., Kobayashi F. Spleen is not essential for development of liver injury during *Plasmodium berghei* infection.

[学会発表] (計 12 件)

International Union of  
Microbiological Societies 2011  
Congress (IUMS), Sapporo, Japan,  
September 6-10<sup>th</sup>, 2011.

8. **新倉保**, 井上信一, 小林富美恵. マラリア原虫複合感染による原虫血症増悪機序の解析. 第80回日本寄生虫学会大会・第22回日本臨床寄生虫学会大会, 東京, 2011年7月17-18日.
9. **Niikura M.**, Inoue S., Kobayashi F. Spleen plays a pathological role during *Plasmodium berghei* ANKA infection. 第70回日本寄生虫学東日本支部大会, 栃木, 2010年10月2日
10. **Niikura M.**, Inoue S., Kobayashi F. The influence of splenectomy on the outcome of coinfection with lethal *Plasmodium berghei* ANKA and nonlethal *P. berghei* XAT. The 2010 XIIth International Congress of Parasitology (ICOPA). Melbourne, Australia, August 15-20<sup>th</sup>, 2010.
11. **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関与する. 第18回分子寄生虫ワークショップ, 群馬, 2010年8月2-5日
12. **新倉保**, 小林富美恵. 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26-27日

[図書] (計1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**, (査読なし) 23: 29-34. 2011

[産業財産権] (計0件)

[その他]

杏林大学医学部感染症学寄生虫学部門 HP :  
[http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/did/parasit/p\\_index.html](http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/user/medicine/did/parasit/p_index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新倉 保 (NIIKURA MAMORU)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号 : 30407019

(2) 研究協力者

小林 富美恵 (KOBAYASHI FUMIE)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号 : 20118889