

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590487

研究課題名(和文)マラリア感染における記憶CD8+T細胞の再活性化抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms of suppressed recall responses of CD8+T cells during malaria infection

研究代表者

都田 真奈 (Miyakoda, Mana)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：30398151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：OVAマラリア原虫を感染させたマウスにおけるナイーブOT-I細胞(OVA特異的CD8+T細胞)(一次応答)と記憶OT-I細胞(二次応答)の増加をFTY720存在下で比較し、二次応答は全身的に起きていること示唆した。

また免疫組織染色により、OVAリステリア菌感染とは異なり、OVAマラリア原虫感染では脾臓の白脾髄にマクロファージやOT-I細胞は集積しにくいことを示し、抗原提示の場所が細胞の応答に影響を及ぼしている可能性を示唆した。

さらにOVAパルス抗原提示細胞によるOT-I細胞の増加は感染種で差がないこと明らかにし、二次応答抑制の原因は感染環境というよりむしろ抗原提示側にある可能性を示した。

研究成果の概要(英文)： FTY720, which inhibits lymphocyte emigration from lymphoid organs, did not affect against the reduced expansion of memory OT-I cells compared with naive OT-I cells during OVA malaria infection, suggesting that the recall response was reduced systemically during malaria infection.

Immunohistochemistry indicated that OT-I cells and macrophages did not accumulate in white pulp of spleen so much during OVA malaria infection. This result suggested that the location of antigen presentation may be important for cell expansion.

Immunization of OVA-pulsed BMDC did not induced the difference in the ratio of naive OT-I cells and memory OT-I cells during the infections between wild type malaria and listeria, implying the possibility that the reduced recall response might be dependent on antigen presentation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫(含衛生動物学)

キーワード：マラリア CD8+T細胞 二次応答

1. 研究開始当初の背景

マラリアは熱帯地域全体に広く蔓延しているだけでなく、近年の温暖化・熱帯化の影響で、近い将来我が国でも感染が拡大する可能性がある。そのためワクチン開発は急務であるが、現在のところ有効なワクチンは存在しない。一方で、フィールド研究よりマラリアに対する免疫記憶が持続しないことが報告されつつ有る。これらの事を考え合わせると、マラリアでは免疫記憶の獲得や維持に問題が有り、このことがワクチンができてくれない理由の一つであると考えられた。そこで、我々はこれまでに、マウスマラリア感染モデルを用いて、マラリア原虫感染で免疫記憶が抑制されるのかを検討し、以下のような成果および結果を得てきた。

- (1) 人工抗原OVA(卵白アルブミン)を発現するマラリア原虫(OVAマラリア原虫)を作成した(Miyakoda ら、J.Immunol 181,1420-8, 2008)。
- (2) OVAマラリア原虫を使った感染実験ではマウス体内でOVA抗原特異的CD8⁺T細胞(OT-I)が活性化し、CTLに分化する事を明らかにした(Miyakoda ら、J.Immunol 181,1420-8, 2008)。
- (3) OVAマラリア原虫感染後治療したマウスにおいて、2ヶ月以上たってもOT-I細胞は記憶細胞として維持される事を示した。
- (4) OVAマラリア原虫感染中、脾臓では記憶OT-I細胞はナイーブ細胞に比べて増加しなかった。一方、免疫記憶が成立する事が知られているOVAリステリア菌感染では記憶細胞はナイーブ細胞より素早く増加した。

これらの研究成果より、マラリア原虫感染では少なくとも抗原特異的CD8⁺T細胞は活性化し記憶細胞に分化できるが、記憶細胞の二次応答が抑制されている事が示唆された。言い換えると、マラリア感染で免疫記憶が成立しにくいのは、記憶細胞の分化、維持というよりはむしろ二次応答機構に問題が有る事が考えられた。

2. 研究の目的

ヒトマラリア感染において免疫記憶が成立しにくいことが報告されている。一方、我々はこれまでにマウスマラリア感染モデルを用いた研究により、マラリア原虫が感染している間は抗原特異的記憶CD8⁺T細胞の増加(二次応答)が抑制される事を明らかにしてきた。そこで本プロジェクトでは、それが免疫記憶が成立しにくい理由の一つではないかと考え、記憶細胞の二次応答抑制メカニズムを明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

- (1)二次応答抑制は臓器特異的であるのかそれとも全身的であるのか調べた。

Rag2KO OT-Iマウスの脾細胞をOVA₂₅₇₋₂₆₄を加えて、IL-7存在下で2週間培養し、記憶OT-I (OVA特異的CD8⁺T)細胞をin vitroで作製した。

あらかじめFTY720(リンパ球の移動を阻害する薬剤)腹腔投与しておいたCD45.2⁺B6マウスに 作製した1x10⁶ 記憶OT-I細胞(CD45.1⁺)と1x10⁶ ナーブOT-I細胞(CD45.1⁺ CD45.2⁺)を受身移入し、OVAマラリア原虫あるいはOVAリステリア菌を感染させた。なおFTY720は解析日まで毎日腹腔投与を行った。

感染率上昇後様々な臓器、組織を摘出し、フローサイトメトリーを用いてナイーブおよび記憶OT-I細胞の割合や数を調べた。

- (2) 抗原提示細胞側に原因が有るのかそれとも記憶T細胞が露呈されている環境に原因が有るのか明らかにしようと試みた。骨髄由来樹状細胞を用いてOVAペプチド蛋白を免疫する際に野生型マラリアあるいは野生型リステリアを感染させると、抗原提示の条件は同じで、環境だけマラリアあるいはリステリア環境にする事ができる。もしこの条件で記憶細胞の増加抑制が改善されれば、T細胞環境にその原因があると考えられ、一方改善されなければ抗原提示細胞側に原因があることが予想される。

CD45.2⁺ B6マウスに1x10⁶ CD45.1⁺記憶OT-I細胞と1x10⁶ CD45.1⁺ CD45.2⁺ ナーブOT-I細胞を受身移入し、骨髄由来樹状細胞を用いてOVAペプチド蛋白を免疫する。そのマウスに野生型マラリア原虫あるいは野生型リステリア菌を感染させた。

感染率が上昇後、記憶OT-I細胞とナイーブOT-I細胞の割合および数をフローサイトメトリーで解析した。

- (3) マラリア原虫感染では脾腫が起りその内部構造が変化しているといわれている。このことからマラリア感染マウスの脾臓構造が記憶T細胞の増加できない事と関係があるのか明らかにしようと試みた。

CD45.2⁺ B6マウスに1x10⁶ OT-I細胞を受身移入し、OVAマラリア原虫あるいはOVAリステリア菌を感染させた。

感染率が上昇した時点で、マウスの脾臓の切片標本作製し、蛍光標識CD45.1抗体、CD11b抗体(単球、マクロファージマーカー)およびCD169抗体(マ

ージナルゾーンマクロファージマーカー、今回は白脾髄と赤脾髄を区別するのに用いた)を反応させた。

蛍光顕微鏡下でCD45.1⁺OT⁻I細胞のおよびCD11b⁺細胞の局在を観察し、マalaria原虫感染とリステリア菌感染を比較した。

4. 研究成果

- (1) OVA マalaria感染原虫マウスでは、調べたすべての臓器において、記憶 OT-I 細胞はナイーブ OT-I 細胞ほど増えなかった。さらにFTY720 でリンパ球の移動を止めても、記憶 OT-I 細胞の増加が回復することはなかった。これらの結果から、二次応答抑制は全身的であることが示唆された。
- (2) 野生型マalaria原虫あるいは野生型リステリア菌を感染させたマウスに骨髄由来樹状細胞を用いてOVA ペプチド蛋白を免疫したところ、どちらの感染マウスにおいても、ナイーブ OT-I 細胞の方が記憶 OT-I 細胞よりも増加した。また非感染マウスにおいても同じ結果であった。この結果から、記憶細胞の二次応答抑制の原因は感染環境というより抗原提示細胞側にあることが考えられた。
- (3) 脾臓におけるOT-I細胞とCD11b⁺細胞の局在を観察したところ、OVAリステリア菌感染ではOT-I細胞とCD11b⁺細胞は白脾髄に集積していたが、マalaria感染では主に赤脾髄やマージナルゾーンに局在し、白脾髄ではほとんど観察されなかった。この結果から、感染の種類により抗原提示の場所が異なることが示唆された。このことが記憶細胞の二次応答が弱い原因であるかは、今後の解析が必要である。
- (4) 本プロジェクトでは、マalaria感染における記憶CD8⁺T細胞の二次応答抑制の機構を詳細に示すことはできなかったが、少なくともリステリア菌感染とマalaria原虫感染では、抗原提示細胞側に違いがあることや抗原提示を受ける場所が異なることを示すことに成功した。そして、これらの違いが二次応答の強弱に影響を及ぼす可能性を裏付ける物となった。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 8 件)

Akbari M, Honma K, Kimura D, Miyakoda M, Kimura K, Matsuyama T, Yui K. IRF4 in dendritic cells inhibits IL-12 production and controls Th1 immune responses against *Leishmania major*. *J Immunol*. 査読有, 192巻, 2014年, 2271-9.

Kurosaki T, Kodama Y, Muro T, Higuchi N, Nakamura T, Kitahara T, Miyakoda M, Yui K, Sasaki H. Secure splenic delivery of plasmid DNA and its application to DNA vaccine. *Biol Pharm Bull*. 査読有, 36巻, 2013年, 1800-6.

Kimura K, Kimura D, Matsushima Y, Miyakoda M, Honma K, Yuda M, Yui K. CD8⁺ T cells specific for a malaria cytoplasmic antigen form clusters around infected hepatocytes and are protective at the liver stage of infection. *Infect Immun*. 査読有 81巻, 2013年, 3825-34.

Kamei R, Miyakoda M, Tamura T, Kimura D, Honma K, Kimura K, Yui K. Accumulation of major histocompatibility complex class II(+)CD11c(-) non-lymphoid cells in the spleen during infection with *Plasmodium yoelii* is lymphocyte-dependent. *Microbiol Immunol*. 査読有, 57巻, 2013年, 213-23.

Miyakoda M, Kimura D, Honma K, Kimura K, Yuda M, Yui K. Development of memory CD8⁺ T cells and their recall responses during blood-stage infection with *Plasmodium berghei* ANKA. *J Immunol*. 査読有, 189巻, 2012年, 4396-404.

Inoue M, Tang J, Miyakoda M, Kaneko O, Yui K, Culleton R. The species specificity of immunity generated by live whole organism immunisation with erythrocytic and pre-erythrocytic stages of rodent malaria parasites and implications for vaccine development. *Int J Parasitol*. 査読有, 42巻, 2012年, 859-70.

由井克之, 木村大輔, 都田真奈, マalaria感染と免疫記憶からワクチン開発へ, *実験医学*, 査読無, 29巻, 2011年, 171-5.

Taguchi T, Inamura Y, Honma K, Kimura D, Miyakoda M, Miyazaki T, Tsuchiya T, Yamasaki N, Tagawa T, Nagayasu T and Yui K. Characterization of waves of leukocyte

recruitment to the lung allograft and the effect of CTLA4-Ig . Acta Medica Nagasakiensia. 56巻, 査読有, 2011年, 27-34

[学会発表] (計 5 件)

都田真奈, IRF4 is critical for proliferation and effector differentiation of CD8+T cells. 第42回日本免疫学会総会 2013年12月12日, 千葉

都田真奈, マラリア原虫感染における抗原特異的CD8+T細胞の二次応答抑制, 第82回日本寄生虫学会, 2013年3月31日, 東京

Miyakoda M, Development of memory CD8⁺ T cells and their recall responses during blood-stage infection with Plasmodium berghei ANKA, キーストンシンポジウム, 2012年12月15日, パンフ (カナダ)

Miyakoda M, IRF4 controls cytokine signals and plays critical roles for proliferation and differentiation of CD8⁺ T cells, 第41回日本免疫学会総会 2012年12月7日, 神戸

都田真奈, マラリア原虫感染中にみられる抗原特異的記憶CD8+T細胞の二次応答の抑制, 第81回寄生虫学会, 2012年3月24日, 兵庫

[図書] (計2件)

木村大輔, 本間季里, 都田真奈, 由井克之. 三恵社. 寄生虫学研究 | 材料と方法, 2012年, 51-4.

本間季里, 木村大輔, 都田真奈, 由井克之. 三恵社. 寄生虫学研究 | 材料と方法, 2012年, 81-84

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都田真奈 (MIYAKODA, Mana)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 30398151

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし