

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590493

研究課題名(和文) 妊娠マラリアの病態に関わる新たな宿主因子の探索

研究課題名(英文) Severe pathology in pregnant mice during malaria

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

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)：本研究では、マラリア流行地に居住する女性が妊娠し、マラリア原虫に感染した場合の症状を反映するマウスモデルを作出し、妊娠中のマラリアの病態を解析した。その結果、マラリア原虫に対する防御免疫は妊娠によって強く抑制され、マラリア原虫は妊娠後期に急激に増加することを見出した。妊娠したマウスは、マラリア原虫に感染した妊婦と同様、妊娠後期に重度の貧血、胎盤組織の傷害、および重度の肝障害を引き起こした。さらに肝障害の病態について詳細に解析したところ、肝障害の発症には一酸化窒素が重要な役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a mouse model of pathological features of pregnant women living in malaria-endemic regions and investigated the pathogenesis of malaria during pregnancy using the mouse model. Pregnant mice immunized by infection of nonlethal Plasmodium berghei (Pb) XAT were more susceptible to lethal Pb NK65 challenged infection than non-pregnant mice and showed high levels of parasitemia and poor pregnancy outcome associated with placental pathology in late phase of pregnancy. Notably, the pregnant immunized mice infected with Pb NK65 developed liver injury in late phase of pregnancy. Higher levels of IFN-gamma and NO were observed in plasma from pregnant immunized mice infected with Pb NK65 compared with those in non-pregnant immunized mice infected with Pb NK65. These findings suggest that development of liver injury and placental pathology in pregnant immunized mice infected with Pb NK65 are associated with enhanced production of pro-inflammatory cytokines.

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 妊娠 免疫抑制 病態重症化 肝障害 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

妊婦はマラリア原虫に対する抵抗性が低下していることから、マラリアの病態が重症化しやすい。妊婦が熱帯熱マラリア原虫に感染した場合に発症する主な病態は、重度の貧血と胎児の流産・死産、早産および低体重出産である。熱帯熱マラリア原虫に感染した妊婦の胎盤の病理組織学的解析によって、多数のマラリア原虫感染赤血球が胎盤組織に集積していることが明らかとなった。胎盤組織へのマラリア原虫感染赤血球の集積は胎盤マラリアとよばれ、胎児の流産・死産、早産および低体重出産の原因と考えられている。また、妊娠中の熱帯熱マラリア原虫感染によって HELLP (hemolysis, elevated liver enzyme, low platelets) 症候群様の重篤な肝障害を引き起こすことが、近年、報告された。熱帯熱マラリア原虫に感染した妊婦の体内では、マラリア原虫に対する免疫が妊娠によって抑制されるため、体内でマラリア原虫が増殖し、胎盤マラリアや肝障害などの病態を引き起こすと推測される。しかし、妊娠中のマラリアの病態発症機序については、これまでほとんど明らかにされていない。

マウスマラリア原虫の強毒株である *Plasmodium berghei* ANKA や *P. berghei* NK65 をマウスに感染させると、マウスは熱帯熱マラリアに類似した症状を引き起こすことから、これらの原虫は熱帯熱マラリアのモデルとして広く用いられている。一方、*P. berghei* XAT は *P. berghei* NK65 に X 線を照射することによって弱毒化されたマウスマラリア原虫である。*P. berghei* XAT を感染させたマウスは、低レベルの原虫血症を示すものの、感染後約 30 日以内に自然治癒する。さらに *P. berghei* XAT の感染から治癒したマウスは、強毒株マウスマラリア原虫に対する強力な防御免疫を獲得する。

妊娠中にマラリア原虫が感染した場合の病態を研究するための実験動物モデルについては、主に、強毒株のマウスマラリア原虫を用いた報告がある。しかし、これまでの多くのモデルでは、妊娠マウスに対するマラリア原虫感染は 1 回のみであるため、妊婦がマラリア原虫に初めて感染した場合のモデルにはなり得るものの、マラリア流行地に居住している女性が妊娠し、マラリア原虫に感染した場合の病態とその発症機序を探るには限界があった。

2. 研究の目的

本研究では、マラリア流行地に住む女性が妊娠し、マラリア原虫に感染した場合の症状を反映する実験動物モデルを作出し、妊娠中のマラリアにおける病態発症機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスマラリア原虫と原虫の接種

本研究では、赤色蛍光タンパク質である mCherry を発現する強毒株のマウスマラリア原虫 *P. berghei* NK65 と、緑色蛍光タンパク質である GFP を発現する弱毒株のマウスマラリア原虫 *P. berghei* XAT を使用した。

(2) 感染と交配

5-6 週齢の雌マウスの尾静脈内に、弱毒株の *P. berghei* XAT (GFP 発現) を接種して感染させ、感染後 30 日目の雌マウスを非感染の雄マウスと一晚交配させた後、強毒株の *P. berghei* NK65 (mCherry 発現) を感染させた。交配後、膣栓を確認することによって交尾の有無を判定し、膣栓の認められたマウスを妊娠群、認められなかったマウスを非妊娠群とした。対照群としては、*P. berghei* XAT 感染後 30 日目の雌マウスを非感染の雄マウスと一晚交配させ、その後 *P. berghei* NK65 による感染を行わなかったマウスと、9-10 週齢の非感染マウスを用いた。

(3) 肝臓と胎盤の組織学的解析と胎児重量の解析

マウスの肝臓、胎盤と胎児は、マウスを深麻酔下にて殺処分した後に採取した。肝臓と胎盤については、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィンブロックを作製した。肝臓の一部は 4%パラホルムアルデヒドで固定後、-80 で凍結した。組織切片は 5-6 μm で薄切し、ヘマトキシリン&エオジン (H&E) 染色と Sudan IV 染色によって標本作製した。標本は All-in-One 蛍光顕微鏡 (BZ9000; Keyence, Osaka, Japan) を用いて撮影した。脂肪滴の定量は、BZ-II Analyzer software (Keyence) を用いて計測した。胎児重量は、電子天秤を用いて測定した (TE1502S; Sartorius, Gottingen, Germany)。

(4) マウス血漿中のマラリア原虫特異的抗体、IFN- γ と IL-10 の測定

非感染マウスと感染マウスから血漿を分離し、血漿中のマラリア原虫特異的抗体、IFN- γ と IL-10 を Sandwich ELISA 法 (Kobayashi et al., 2007) によって測定した。

(5) 血漿中の一酸化窒素 (NO) 濃度の測定

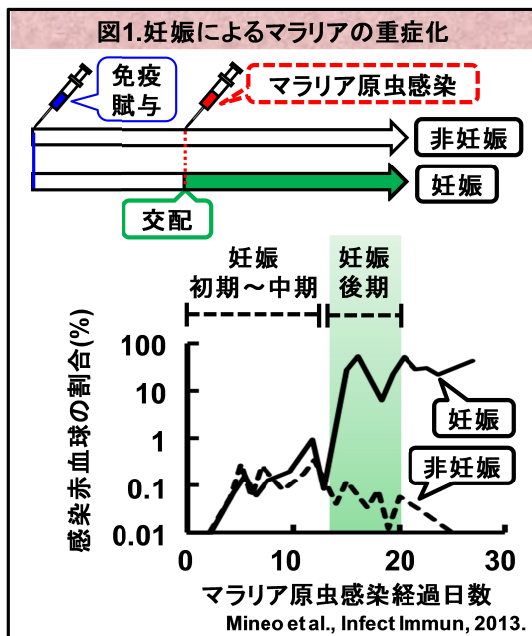
非感染マウスと感染マウスから血漿を分離し、血漿中の一酸化窒素 (NO) 濃度を、QuantiChrom™ Nitric Oxide Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, USA) を用い、添付プロトコールに従って測定した。

(6) 統計解析

有意差検定は統計ソフト Statcel (OMS, Saitama, Japan) を用いて Student's *t* 検定, Welch's *t* 検定および一元配置分散分析法 (分散分析) により行った. 各データ平均±SD で示し, $p < 0.05$ もしくは $p < 0.005$ を有意差があるものとした.

4. 研究成果

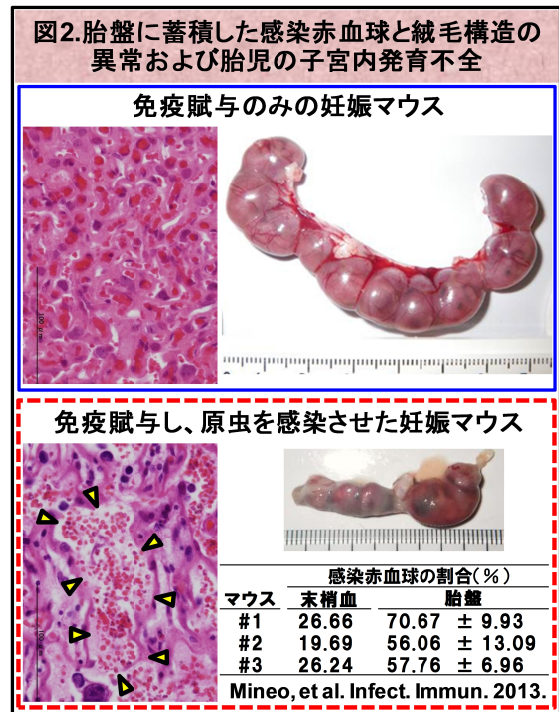
本研究では, マラリア流行地に居住する女性が妊娠し, マラリア原虫に感染した場合の症状を反映する実験モデルとして, マウスに弱毒株マラリア原虫 *P. berghei* XAT を接種してマラリア原虫に対する免疫を宿主に賦与した後に, 強毒株マラリア原虫 *P. berghei* NK65 を接種するという感染系を考案した. この実験モデルを用いて妊娠中のマラリアの病態を解析した結果, マラリア原虫に対する防御免疫が妊娠中期から強く抑制されることで, 宿主体内でマラリア原虫が急激に増殖することが明らかとなった (図 1). マラリア原虫の増殖によってマウスは妊娠後期に重度の貧血を引き起こすだけでなく, マラリア原虫感染赤血球が胎盤に蓄積することで胎盤組織が傷害され, 胎児は子宮内で発育不全となり死産, 流産となると考えられた (図 2). さらに, マラリア原虫の急激な増殖によって活性化された宿主免疫は, 自身の肝細胞に傷害を与え, 最終的にマウスは重度の肝障害を引き起こすことが示唆された.



抗炎症性サイトカインである IL-10 について解析したところ, IL-10 は妊娠によって著しく増加することが明らかになった. この結果から, 妊娠によるマラリア原虫に対する防御免疫の抑制に IL-10 が関与していることが示唆された. IL-10 は B 細胞や抗体産生細胞の活性を抑制する (Taylor et al., 2006; Couper et al., 2008).

本研究で, 妊娠中のマラリアモデルにおいてマラリア原虫排除に関わるマラリア原虫特異的 IgG は有意に低下していたことから, マラリア原虫特異的 IgG の産生抑制に IL-10 が関与している可能性が考えられた.

本研究で用いた妊娠中のマラリアのマウスモデルでは, マウスの胎盤に多数のマラリア原虫感染赤血球の蓄積が認められた (図 2 矢印). 熱帯熱マラリア原虫に感染した妊婦の胎盤においても, 多数のマラリア原虫感染赤血球が観察されている (Walter et al., 1982; Ismail et al., 2000; Hviid et al., 2010). 最近, 胎盤や脱着膜に局所的に T 細胞の活性化を抑制する「胎児 母体免疫寛容」のメカニズムが明らかになった (Nancy et al., 2012; Samstein et al., 2012). T 細胞はマラリア原虫に対する防御免疫において重要な役割を果たすことが明らかになっている (Kobayashi et al., 2007; Inoue et al., 2012). これらの報告から, 胎盤や脱着膜の強力な免疫寛容機構によってマラリア原虫に対する防御免疫が抑制され, 胎盤は感染赤血球が蓄積しやすいか, または, マラリア原虫が増殖しやすい場となっていると推察される.



マラリア原虫感染赤血球の胎盤への蓄積には, 胎盤における T 細胞の抑制だけでなく, 感染赤血球が胎盤に特異的に接着する機構も関与すると考えられている. 熱帯熱マラリア原虫には多重遺伝子の *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PEMP1*) が存在する. この *PEMP1* の変異抗原 VAR2CSA が胎盤内のコンドロイチン硫酸 A (CSA) やヒアルロン酸 (HA) と結合することから, VAR2CSA は感染赤血球が胎盤に蓄積に関わる主要な分子であると考えられてい

る (Ricke et al., 2000; Miller et al., 2002; Tutterrow et al., 2012). 一方, マウスマラリア原虫には *PfEMP1* の相同分子が存在しない. それにも関わらず感染赤血球が胎盤内に蓄積していたことから, 本研究で用いた感染系で認められたマラリア原虫感染赤血球の胎盤への蓄積は, VAR2CSA を介さない機構によると推察された.

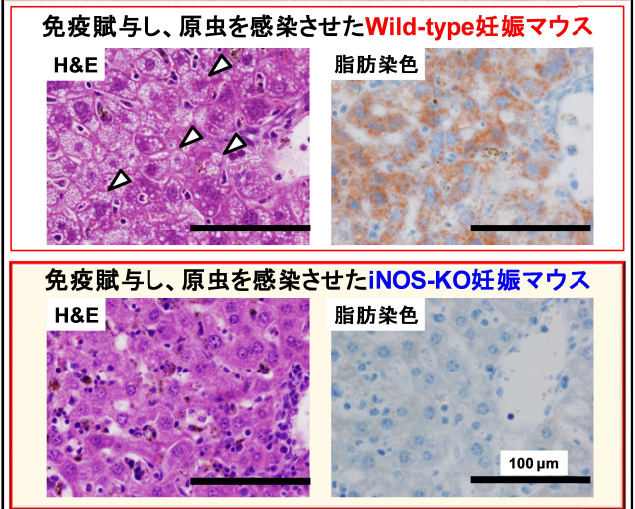
本研究で用いた妊娠中のマラリアの実験モデルでは, 胎盤絨毛構造の異常が認められた. マラリア原虫の glycosylphosphatidylinositol (GPI) やヘモゾインは, 宿主の自然免疫に重要な役割を果たす Toll-like receptor によって認識されることが知られている (Kawai and Akira, 2005). GPI やヘモゾインは赤血球内に感染していた分裂体が破裂した時にメロゾイトと共に放出される. 胎盤内でマラリア原虫が増殖を繰り返すことで, 自然免疫に関わる胎盤内の好中球や NK 細胞などが活性化されると推察される. マウスマラリア原虫 *P. chabaudi* を用いた研究によって, NK 細胞, 好中球やマクロファージなどによって産生される炎症性サイトカインである INF- γ や TNF- α が, 妊娠中のマラリア原虫感染による胎児消失に関与することが示されている (Poovassery et al., 2009). 本研究で作出したマウスモデルにおいて血漿中 INF- γ が高レベルであったことから, 胎盤絨毛構造の異常には, 胎盤内でのマラリア原虫の分裂・増殖により活性化された NK 細胞, 好中球やマクロファージなどが関与していると考えられる.

妊娠中のマラリアのマウスモデルの肝臓において, 広範囲にわたり肝細胞壊死が認められた (図 3 矢印). さらに, 肝細胞内に多量の脂肪が蓄積していることを見出した (図 3). これらの結果から, 妊娠中のマラリアのマウスモデルは熱帯熱マラリア原虫に感染した妊婦と同様に, HELLP 症候群様の肝障害を発症することが明らかとなった. マラリアにおける肝障害は, マラリア原虫の急激な増殖によって引き起こされる過剰な炎症反応が関与することが示されている (Yoshimoto et al., 1998; Adachi et al., 2001; Niikura et al., 2008). これらのことから, 妊娠中のマラリアのマウスモデルにおける高レベルの INF- γ は, 胎盤病理だけでなく肝障害にも関与していることが示唆された.

また, 本研究で用いた妊娠中のマラリアのマウスモデルでは, NO の有意な増加も認められた. 高レベルの NO は肝機能障害と相関することが明らかになっている (Harris et al., 1995; Duwaerts et al., 2013). 妊娠中のマラリアのマウスモデルの肝障害が誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) を欠損したマウス (iNOS-KO マウス) で抑制されたことから, 妊娠中のマラリアにおける HELLP 症候群様の肝障害の発症に NO が関与

することが示された (図 3). 一方, 妊娠した iNOS-KO マウスにおいても Wild-type マウスと同様に胎盤の組織傷害と胎児の発育遅延が認められたことから, 胎盤の組織傷害には NO 以外の因子が関与していると考えられた.

図3. NOは妊娠中のマラリアにおける肝細胞傷害に関わる



本研究で新たに妊娠中のマラリアのマウスモデルを作出し, 流行地で起こり得る妊娠中のマラリアにおける病態重症化機序の一端を明らかにすることができた. マラリア流行地においては, 初妊娠の女性はマラリアの病態が重症化するが, 妊娠回数が増えるにつれて病態は重症化しにくくなることが報告されている (Hviid et al., 2010). 経産婦ではマラリア原虫に対する抗体のレベルが高く, その結果, 病態の重症化が抑制されると考えられている (Fried et al., 1998; Megnekou et al., 2009). これらの報告から, マラリア原虫に対する免疫を維持し増強することが, 妊娠中のマラリアの病態重症化を防ぐための効率的な方法の一つであると推察できる. 本研究で作出した妊娠中のマラリアのマウスモデルをさらに詳細に解析することにより, 妊娠中のマラリアによる母体と胎児の病態重症化を抑制する方法を見出すのに有用な情報が得られると期待される.

5. 主な発表論文等

(1) 雑誌論文 (計 8 件)

Mineo S, Niikura M, Inoue S-I, Kuroda M, Kobayashi F: Development of severe pathology in immunized pregnant mice challenged with lethal malaria parasites. *Infect Immun* (査読あり), 81: 3865-3871, 2013.

doi: 10.1128/IAI.00749-13.

Niikura M, Inoue S-I, Mineo S, Yamada Y, Kaneko I, Iwanaga S, Yuda M, Kobayashi F: Experimental cerebral malaria is suppressed by disruption of

nucleoside transporter 1 but not purine nucleoside phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun* (査読あり), 432: 504-508, 2013.

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.004.

Inoue S-I, Niikura M, Takeo S, Mineo S, Kawakami Y, Uchida A, Kamiya S, Kobayashi F: Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing $\gamma\delta$ T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* (査読あり), 109: 12129-12134, 2012.

doi: 10.1073/pnas.1204480109.

Niikura M, Inoue S-I, Kobayashi F. Role of IL-10 in malaria: focusing on coinfection with lethal and nonlethal murine malaria parasites. In special issue "Immunology and Cell Biology of Parasitic Diseases, *J Biomed Biotechnol* (査読あり), 2011: 383962, 2011.

doi: 10.1155/2011/383962.

(2) 学会発表 (計37件)

新倉 保, 峯尾松一郎, 井上信一, 井上愛美, 小林富美恵: 妊娠によるマラリアの病態重症化機構の解明. 第83回日本寄生虫学会大会, 平成26年3月27-28日, 愛媛.

峯尾松一郎, 新倉 保, 井上信一, 井上愛美, 黒田雅彦, 小林富美恵: 妊娠マラリアの病態に関わる新たな宿主因子の探索. Development of liver dysfunction in immunized pregnant mice challenged with lethal malaria parasites. 第54回日本熱帯医学会大会, 平成25年10月4-5日, 長崎.

新倉 保, 峯尾松一郎, 井上信一, 小林富美恵: 妊娠マウスにおけるマラリアの病態重症化の解析. Development of severe pathology in pregnant mice during malaria 第6回寄生虫感染免疫研究会, 平成25年3月8日-9日, 大分.

Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Shoichiro Mineo, Fumie Kobayashi: $\gamma\delta$ T cells exert a bpsstomg effect on dendritic cell responses to *Plasmodium* parasites. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Malaria Meeting, January 20th-25th, 2013, New Orleans.

Mamoru Niikura, Shoichiro Mineo, Shin-ichi Inoue, Masahiko Kuroda, Fumie Kobayashi: Development of severe pathology in immunized pregnant mice challenged with lethal malaria parasites. The 6th Nagasaki Symposium on

Tropical Emerging Infectious Diseases/The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium, December 10th-12th, 2012, Nagasaki.

峯尾松一郎, 新倉 保, 井上信一, 黒田雅彦, 小林富美恵: 妊娠中のマウスマラリア原虫感染による肝機能障害. Liver dysfunction in pregnant mice infected with rodent malaria parasites. 第53回日本熱帯医学会大会, 平成24年9月5-6日, 帯広.

(3) 図書 (計3件)

小林富美恵, 竹尾 暁, 新倉 保, 井上信一: マウスマラリア原虫: 赤血球ステージの凍結原虫 (stabilate)の作製法, 三恵社, 寄生虫学研究: 材料と方法, 2012, 67-70.

新倉 保, 井上信一, 竹尾 暁, 小林富美恵: マウスへのマラリア原虫接種法, 三恵社, 寄生虫学研究: 材料と方法, 2012, 63-65.

井上信一, 新倉 保, 竹尾 暁, 小林富美恵: 細胞内サイトカインアッセイ: マラリア原虫感染が引き起こす免疫細胞のサイトカイン応答の解析, 三恵社, 寄生虫学研究: 材料と方法, 2012, 113-116.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 富美恵 (HOBAYASHI, 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 (NIKURA, 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