

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659189

研究課題名(和文)脳マラリア発症過程の最先端ライブイメージング技術による解析

研究課題名(英文)Live imaging of experimental cerebral malaria

研究代表者

由井 克之(YUI, Katsuyuki)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90274638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：脳マラリアのマウスモデルとして実験的脳マラリアがある。この発症機構解明のため、発光イメージング、蛍光イメージング、PET/CTイメージングの最先端イメージング技術を総動員することを計画した。発光イメージングでは、発症時原虫の脳内集積をとらえることを検討したが、発症マウスと非発症マウスの有意な差を見いだすことはできなかった。蛍光イメージングでは、抗原特異的CD8+ T細胞の脳内における動態を観察することを目指して、予備実験を行った。肝細胞期のマラリア原虫感染については成果をあげる事ができたが、今後の課題が残った。PET/CTイメージングに関しては、今後の解析に向けて道筋をつけた。

研究成果の概要(英文)：I planned to investigate the cellular mechanisms underlying the pathogenesis of experimental cerebral malaria using 3 imaging techniques; luciferase imaging, fluorescence imaging using multiphoton microscope, and PET/CT imaging. I was able to get enough information and preparation for the analysis using these techniques.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：マラリア イメージング 感染 脳

1. 研究開始当初の背景

脳マラリアは、マラリアの最も重篤かつ重要な合併症であり主要な死因である。実験モデルとして *Plasmodium berghei* ANKA の C57BL/6 マウス感染があり、ヒト脳マラリアとの異同について議論はあるものの、介入可能なモデルとして脳マラリアの病因解明に向けて重要な実験系と位置づけられる。脳内への CD8⁺ T 細胞の集積が発病に必須とされているが、その役割を始め病因は十分に解明されていない。

近年の技術の急速な進展により、生きた動物の体内で起きる様々な現象を動的に観察する生体イメージングが可能になりつつある。ポジトロン断層法 (positron emission tomography; PET) では、フルオロデオキシグルコース (FDG) を用いてグルコース代謝を測定することが可能である。発光イメージング技術では、レポーター遺伝子組換え原虫の脳内局在を定量的に測定することが出来る。多光子レーザー顕微鏡は、蛍光蛋白発現細胞を用いて生きた動物体内における個々の原虫や細胞の動態を経時的に観察することができる。

2. 研究の目的

萌芽期にあるこれらの最先端イメージング技術を応用し、脳マラリア発症過程に新しい光を当てることを目的とした。具体的には、発光イメージング、多光子レーザー顕微鏡による蛍光イメージング、PET/CT の 3 種類のイメージング技術を導入し、実験的脳マラリアの発症機構に新しい光を当ててことを目標にした。

3. 研究の方法

発光イメージング

ルシフェラーゼを恒常的に発現する *P. berghei* ANKA は、ライデン大学の Dr. Chris Janse より譲渡された。C57BL/6 マウス及び T 細胞受容体欠損遺伝子ノックアウトマウスにこの原虫を感染させた。脳マラリア発症前後の時期にマウスの背部及び頭部を、脱毛剤を用いて脱毛した。腹腔内にルシフェリン液を注入し、10-20 分後に IVIS イメージングシステムを用いて発光イメージングを行った。

蛍光イメージング

多光子レーザー顕微鏡を用いて実験的脳マラリアの発症現場を観察するための実験準備を進めた。マラリア抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の動態を観察するため、モデル抗原として卵白アルブミン(OVA)を用い、OVA を発現するマラリア原虫 *P. berghei* ANKA と、OVA 特異的 T 細胞受容体トランスジェニ

ックマウス OT-I を用いることにした。さらに、原虫に蛍光蛋白を発現させるため、三重大学・油田教授との共同研究により、egfp と OVA エピトープの融合タンパクを発現する組換えマラリア原虫 PbA-gfpOVA と、tdTomato と OVA エピトープの融合タンパクを発現する組換えマラリア原虫 PbA-tdTomatoOVA を作成した。

T 細胞活性化の鍵となる樹状細胞の可視化のために CD11c-Venus マウスを導入した。T 細胞については、egfp, DsRed, cfp マウスを OT-I マウスと交配した。このマウスから CD8⁺ T 細胞を精製して C57BL/6 マウスに受け身移入し、感染実験に供した。これらの材料を準備した上で、実際のイメージングはマラリア原虫肝細胞期のイメージングを繰り返すことにより実験技術の向上に努めた。

PET/CT

長崎大学・先導生命科学研究支援センターには、P3 レベルまでの感染動物を観察することができる PET/CT が導入された。この機器を利用して実験的脳マラリアの病態観察を計画した。マウスに ¹⁸F-fluorodeoxy glucose (FDG) を投与し、PET/CT により臓器へのトレーサー集積をモニターした。

4. 研究成果

発光イメージング

C57BL/6 マウスは、*P. berghei* ANKA 感染により実験的脳マラリアを発症する。一方、T 細胞受容体欠損遺伝子ノックアウトマウスは、T 細胞がないために実験的脳マラリアは発症しない。ルシフェラーゼ発現マラリア原虫を用いることにより、脳組織に集まる原虫量をモニターし、実験的脳マラリアの発症機構に迫ることを目指した。しかしながら、脳マラリア発症前後数日間の範囲では脳局所の原虫量に関して両マウスの間に有意な違いを認めることはできなかった。実験的脳マラリアにおける脳組織の特性を捉えるためには、より解像度の高い検出系を用いか、原虫量以外の指標を用いる必要があると考えられた。

蛍光イメージング

多光子レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージングにより、実験的脳マラリアの現場を捉えることを目標に掲げた。この実験に向けて準備を進めたが、脳のイメージングはまだハードルが高く、十分な成果を得るには至らなかった。蛍光イメージングの準備段階として、マラリア肝細胞期のイメージングについては研究の進展があったので、その実験系に触れておく。

マラリア原虫スポロゾイトは、感染マウスを吸血したハマダラカの体内で成熟し、唾液腺

に集まる。吸血したハマダラカの唾液腺からスポロゾイトを調整した。DsRed/OT-1 細胞を試験管内で活性化後、C57BL/6 マウスに受け身移入した。このマウスに PbA-gfpOVA のスポロゾイトを感染させ、2 日後に肝臓の生体イメージングを行った。感染肝細胞は、gfp 陽性となり明確に捉えることができた。DsRed/OT-1 細胞を移入した実験では、感染肝細胞周囲に OT-1 細胞がクラスターを形成する像が観察された。移入する OT-1 細胞の数を増やすと、原虫は完全に排除されて OT-1 クラスターのみが観察された。大きな倉ストアーになると、OT-1 細胞を 1000 個以上含むクラスターもあった。また、タイムラプスイメージングにより、OT-1 クラスターの中心にいる原虫塊が、やがて消失する瞬間を捉えることもできた。このように、蛍光イメージングの材料集めと技術的な習得は進めることができた。

PET/CT

マウスに ^{18}F -fluorodeoxy glucose (FDG) を投与し、イメージングを行うための予備実験を行った。しかしながら、機器のソフトウェアの扱いが予想以上に難しく、短期間に自分で実験を行うことは困難であることが判明した。幸いに PET/CT を用いたイメージングに習熟した共同研究者を見いだすことができ、今後実験的脳マラリアのイメージングを進めていきたい。

総括

実験的脳マラリアの発光イメージング、蛍光イメージング、PET/CT イメージングを行う意欲的な実験計画を立てたが、蛍光イメージングと PET/CT イメージングに関しては技術的なハードルが高く、期間内に十分な成果を出すには至らなかった。しかしながら、今後の研究進展に道筋を付けることはできた。挑戦的萌芽研究としての目的は達成できたと考えられる。

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 8 件)

Tamura, T., Akbari, M., Kimura K., Kimura, D., Yui, K., Flt3 ligand treatment modulates rodent parasitemia infection via MyD88 and IFN-g-dependent mechanisms. *Parasite Immunol.* 36: 87-99, 2014.

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, *Inf. Immun.* 81 (10):3825-3834. 2013.

Bao, L.Q., Huy, N.T., Kikuchi, M., Yanagi, T., Senba, M., Shuaibu, M.N., Honma, K., Yui, K., Hirayama, K., CD19(+) B cells confer protection against experimental cerebral malaria in semi-immune rodent model., *PLoS One*, May 28;8(5):e64836, 2013.

Yui, K., Closeup: Cross-presentation of malaria antigen by brain microvessels: why CD8⁺ T cells are critical for the pathogenesis of cerebral malaria. *EMBO Mol. Med.* 5 (7) : 899-901, 2013.

Kamei, R., Miyakoda, M., Tamura, T., Kimura, D., Honma, K., Kimura, K., Yui, K. Accumulation of MHC class II⁺ CD11c⁻ non-lymphoid cells in the spleen during infection with *Plasmodium yoelii* is lymphocyte-dependent. *Microbiol. Immunol.* 57 (3): 213-223. 2013.

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.*, 189(9) : 4396-4404. 2012.

Inoue M., Jianxia T., Miyakoda M., Kaneko O., Yui, K., Culleton R., The species specificity of immunity generated by live whole organism immunization with erythrocytic and pre-erythrocytic stages of rodent malaria parasites and implications for vaccine development, *Int. J. Parasitol.*, 42; 859-870. 2012.

Chapman, L.M., Aggrey, A.A., Field, D.J., Srivastava, K., Ture S., Yui, K., Topham, D.J., Baldwin III, W.M., Morell, C.N., Platelets presents antigen in the context of MHC class I, *J. Immunol.*, 189 (2): 916-923. 2012.

〔学会発表〕(計 12 件)

マラリア原虫特異的 CD4⁺ T 細胞は、IL-27 を介して CD4⁺ T 細胞の防御機能を抑制する、木村大輔、都田真奈、木村一美、本間季里、原博満、堀昌平、吉田裕樹、由井克之、第 83 回日本寄生虫学会大会、松山市、3 月 27-28 日、2014 年

赤血球期マウスマラリア原虫感染における従来型樹状細胞の減少は I 型、II 型インターフェロン依存的細胞死である、田村隆彦、木村一美、由井克之、吉田栄人、第 83 回日本寄生虫学会大会、松山市、3 月 27-28 日、2014 年

T cell responses during infection with *Plasmodium berghei* ANKA, K. Yui, Mini symposium on malaria immunopathology, IFRc, 吹田市、1 月 15 日、2014 年

IL-27 is produced by CD4⁺ T cells during infection with malaria parasites and inhibits protective immune responses. KIMURA D, MIYAKODA M, KIMURA K, HONMA K, HARA H, HORI S, YOSHIDA H, YUI K、第 42 回日本免疫学会学術集会、千葉市、12 月 11-13 日、2013 年

CD8⁺ T cells form clusters around infected hepatocytes protecting against liver-stage infection with *Plasmodium berghei* ANKA. KIMURA K, KIMURA D, MIYAKODA M, YUI K、第 42 回日本免疫学会学術集会、千葉市、12 月 11-13 日、2013 年

Flt3 ligand treatment inhibits parasitemia during infection with rodent malaria parasites via MyD88-and IFN-g-dependent mechanisms. TAMURA T, KIMURA K, YUI K、第 42 回

日本免疫学会学術集会、千葉市、12 月 11-13 日、2013 年

CD8⁺ T 細胞による肝細胞期マラリア原虫感染防御の生体イメージング、由井克之、木村一美、都田真奈、木村大輔、油田正夫、第 82 回日本寄生虫学会大会、東京都、3 月 29-31 日、2013 年

マラリア原虫特異的 CD4 T 細胞は EB13 陽性サイトカインを介して他の CD4 T 細胞の IL-2 産生を制する、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 82 回日本寄生虫学会大会、東京都、3 月 29-31 日、2013 年

マラリア原虫感染における抗原特異的記憶 CD8⁺ T 細胞の二次応答抑制、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 82 回日本寄生虫学会大会、東京都、3 月 29-31 日、2013 年

Development of memory CD8⁺ T cells and their recall responses during blood-stage infection with *Plasmodium berghei* ANKA., M. Miyakoda, D. Kimura, K. Honma, K. Kimura, M. Yuda, K. Yui. Immunological mechanisms of vaccination, Part of the Keystone symposia global health series, オタワ (カナダ) Dec. 13-18, 2012.

Regulation of T cell responses during infection with *P. berghei* ANKA leading to the protective immunity and pathogenesis of cerebral malaria. D. Kimura, M. Miyakoda, K. Kimura, K. Yui. The 6th Nagasaki symposium on tropical and emerging infectious diseases, The 11th Nagasaki-Singapore medical symposium. 長崎市、Dec. 10-12, 2012

CD4⁺ T cells produce EBI-3⁺ cytokine inhibiting their own protective immune responses during infection with malaria parasites. D. Kimura, M. Miyakoda, Honma, K. Kimura, H. Hara, H. Yoshida, K. Yui 第41回日本免疫学会学術集会、神戸市、12月5-7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〕
ホームページ等
<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

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

田村 隆彦 (TAMURA, Takahiko)
旧：長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
現：金沢大学・大学院医薬保健学総合研究科・助教