

# *Plasmodium berghei* ANKA が引き起こす脳症の抑制に関する研究

新 倉 保

杏林大学医学部感染症学

## 1. 背景

悪性の熱帯熱マラリア原虫に感染したヒトは脳症、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、治療しなければ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）にヒトの脳症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。

これまでの研究成果により、強毒株 *Pb* ANKA が引き起こす脳症は弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させることで抑制されることが明らかとなっている。また、この弱毒化原虫複合感染による脳症の抑制には、弱毒化原虫に対して特異的に応答する宿主の自然免疫が関与することが示唆されている。

## 2. 研究の目的

- まず、強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT にそれぞれ異なる蛍光色素を発現させ、複合感染させたマウスにおいて強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb*XAT を判別できるようにする。
- 次に、弱毒化原虫に対して特異的に応答する宿主自然免疫について解析し、弱毒化原虫複合感染による脳症抑制効果との関係を明らかにする。

## 3. 研究成果

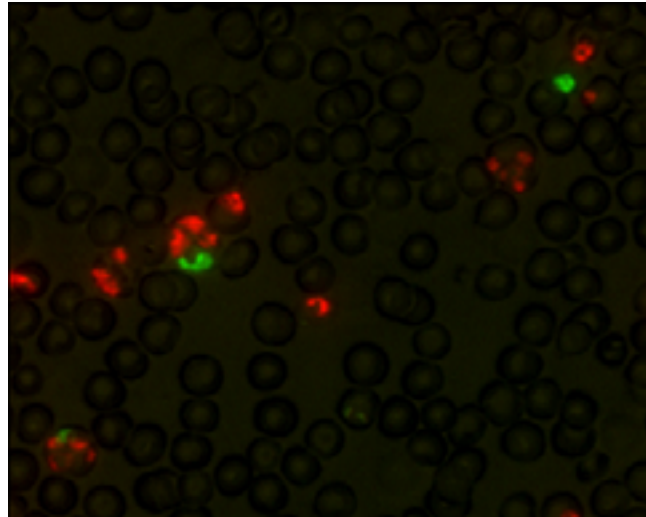
### マウスマラリア原虫への蛍光色素の導入

強毒株 *Pb* ANKA に赤色蛍光タンパク質 (mCherry) 遺伝子、弱毒化原虫 *Pb* XAT に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入し、それぞれ安定して蛍光を発する原虫を樹立することができた。この成果により、複合感染マウスにおいて強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を判別できるようになった (Figure 1)。

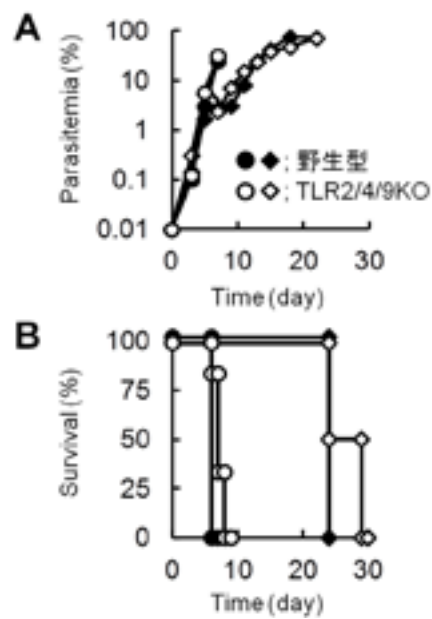
### 弱毒化原虫 *Pb* XAT 複合感染による脳症抑制効果と Toll-like receptor の関係

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 に対する防御免疫の誘導と TLR の関係を明らかにするために、弱毒化原虫 *Pb* XAT を野生型マウスと TLR2/4/9KO マウスに感染させた。その結果、*Pb* XAT を単独感染させた野生型マウスは感染後 30 日程度で自然治癒したのに対し、*Pb* XAT 感染 TLR2/4/9KO マウスは感染後 15-20 日目から原虫血症が増悪し、最終的にマウスは死亡した。この結果から、TLR は弱毒化原虫 *Pb* XAT に対する防御免疫の誘導に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方、強毒株 *Pb* ANKA を単独感染させた TLR2/4/9KO マウスは、野生型マウスと同様に原虫血症が増悪し、感染後 10 日以内に脳症を引き起こして死亡した (Figure 2)。この結果から、強毒株 *Pb* ANKA が引き起こす脳症は、TLR2/4/9 非依存的であることが示された。

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た。そこで、弱毒化原



**Figure 1** 強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させたマウスの末梢血 (感染後 9 日目)。マウスの尾静脈に  $1 \times 10^4$  個の弱毒化原虫 *Pb* XAT 感染赤血球を接種し, その 1 日後に  $1 \times 10^4$  個の強毒株 *Pb* ANKA 感染赤血球を接種した。強毒株 *Pb* ANKA (赤色蛍光), 弱毒化原虫 *Pb* XAT (緑色蛍光)。



**Figure 2** TLR2/4/9KO による強毒株 *Pb* ANKA 単独感染マウスおよび弱毒化原虫 *Pb* XAT の複合感染マウスの病態への影響。(A) 強毒株 *Pb* ANKA 単独感染マウス (circles) および強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染マウス (diamonds) における原虫血症。単独感染は, 尾静脈に  $1 \times 10^4$  個の *Pb* ANKA 感染赤血球を接種した。複合感染は, 尾静脈に  $1 \times 10^4$  個の弱毒化原虫 *Pb* XAT 感染赤血球を接種し, その 1 日後に  $1 \times 10^4$  個の *Pb* ANKA 感染赤血球を接種した。野生型マウス (filled symbol), TLR2/4/9KO マウス (open symbol)。(B) 強毒株 *Pb* ANKA 単独感染マウス (circles) および強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT との複合感染マウス (diamonds) の生存曲線。野生型マウス (filled symbol), TLR2/4/9KO マウス (open symbol)。

虫 *Pb* XAT の複合感染による脳症抑制効果と TLR の関係を明らかにするために、野生型マウスと TLR2/4/9KO 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。強毒株 *Pb* ANKA と弱毒化原虫 *Pb* XAT を複合感染させた野生型マウスは脳症が抑制され、強毒株 *Pb* ANKA 単独感染と比較して著しく生存期間が延長した (Figure 2)。複合感染させた TLR2/4/9KO マウスも、野生型マウスと同様に脳症は抑制され、生存期間が延長した (Figure 2)。この結果から、弱毒化原虫 *Pb* XAT 複合感染による脳症抑制効果に TLR は関与しないことが示された。

#### 4. まとめと今後の展望

本研究の成果により、TLR は弱毒化原虫 *Pb* XAT に対する防御免疫の誘導に重要な役割を果たしていることが見出された。これまでに、TLR とマラリア原虫に対する防御免疫の誘導の関係についてはほとんど明らかにされていない。弱毒化原虫 *Pb* XAT を感染させた TLR2/4/9KO マウスの免疫応答を詳細に解析することで、マラリアにおける TLR の新たな役割を明らかにできる可能性がある。

弱毒化原虫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示された。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 / 活性化機序は、強毒株 *Pb* ANKA とは異なることが示唆された。樹状細胞は病原体を貪食・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 細胞を誘導に関わる。弱毒化原虫複合感染による脳症抑制効果には、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 / 活性化機序が関与しているかもしれない。

弱毒化原虫に対して特異的に応答する宿主自然免疫の解析は、病態重症化の抑制機序だけでなく、マラリアに

おける防御免疫誘導機序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。

#### List of publication

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

#### 講演記録

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. 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.