

マラリアにおける造血系攪乱とその制御機構の解明

小林 富美恵¹ 渡邊 卓² 大西 宏明²
井上 信一¹ 新倉 保¹¹杏林大学医学部感染症学教室²杏林大学医学部臨床検査医学教室

【研究背景】

マラリアは熱帯・亜熱帯地域に流行し、毎年約3億人の罹患者と100万人以上の死者を出している世界で最も被害の大きな感染症の一つである。マラリア発症は、マラリア原虫が赤血球に感染し増殖・破壊を繰り返す事によって起こる。マウスマラリアモデルを用いた研究を中心に、宿主内では、様々な免疫担当細胞が連携して働く事により、マラリア原虫に対する防御をおこなっていることが徐々に解明されてきている。一方で、それら免疫担当細胞の多くを供給する造血細胞（前駆細胞・幹細胞）がマラリア原虫感染によりどのような影響を受けて造血応答しているのかについては、ほとんど明らかにされていない。最近、マウスマラリア原虫をマウスに感染させると、骨髄内で造血幹細胞～多能性前駆細胞の分画が一時的に急増し、骨髄系前駆細胞が一時的に激減するなどの変化がみられること、更に感染赤血球の減少にもなって元に戻るなど、造血系（造血幹細胞を頂点とした造血システム）に大きな変動が生じることが報告された（Belyaev *et al.* Nature Immunology 2010）。しかしながら、マラリア原虫感染による造血系の変動に関する細胞や分子に関してはほとんど解明されていない。

【研究目的】

これまでのマラリア研究においては、マラリア原虫が宿主に感染した際の各種免疫担当細胞による防御機構に関する研究が活発に進められてきた。しかし、多くの成熟免疫担当細胞を供給する造血細胞は、マラリア原虫感染によってその動態がかなり大きく変動するにもかかわらず、その分子メカニズムや病態への影響はほとんど明らかにされていない。本研究は、マラリアにおける造血系攪乱とその制御メカニズムの解明を最終目的としている。

【研究方法】

本研究では、マウスマラリア原虫に *Plasmodium berghei* XAT（急性感染後に自然治癒する株）を用いた。マウスはC57BL/6Jマウスを用いた。マウスマラリア原虫に感染した赤血球を含む血液サンプル（感染赤血球 1×10^4 個）をマウスの尾静脈に接種することで感染が成立し、マウスマラリアモデルが作製される。このマラリアモデルを用いて実験をおこなった。末梢血の塗抹標本をギムザ染色したものから感染赤血球の割合を計測することで、マラリア原虫の感染経過を追った。

1. マラリア原虫感染で増加した造血幹細胞の機能解析

マウスマラリアモデルの骨髄内や脾臓内で一時的に増加した造血幹細胞をフローサイトメトリーにて純化・採取した。致死量放射線照射（850rad）によって造血系を機能不全にしたマウスに対して、採取した造血細胞の移植実験をおこない、その造血系を再構築する能力（造血再構築能）を *in vivo* で評価した。また、造血サイトカイン（Stem cell factor, IL-6, IL-3, erythropoietin など）を添加した *in vitro* 培養系での血球分化能の評価をおこなった。それぞれの実験は正常マウスの造血幹細胞をコントロールとしておこなった。

2. マラリアによる造血の変動に対する $\gamma\delta$ T細胞の関連性

野生型マウスとともに、 $\gamma\delta$ T細胞を欠損したマウス（TCR- δ KOマウス）にもマラリア原虫を感染させ、造血幹細胞～多能性前駆細胞（c-Kit陽性、Sca-1陽性、Lin陰性）の分画が一時的に急増して骨髄系前駆細胞（c-Kit陽性、Sca-1陽性、Lin陰性、CD34陽性、CD16/32陽性）が一時的に激減するなどの変化にどのような影響をもたらすのかを確認した。

3. マラリア造血系攪乱に対するIFN- γ の関連性

IFN- γ 受容体を欠損したマウス (IFN γ R1 KOマウス) にマラリア原虫を感染させ、造血幹細胞~多能性前駆細胞の分画が一時的に急増し、骨髓球系前駆細胞が一時的に激減するなどの変化にどのような影響をもたらすのかを確認した。

4. 増加した造血幹細胞の脾臓への動員因子の同定のためのマイクロアレイ解析

$\gamma\delta$ T細胞がマラリアにおける造血に影響することが明らかになったので、その機能に関連する遺伝子の特定をおこなうため、 $\gamma\delta$ T細胞をフローサイトメーターにより単離してその遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。(野生型マウス; Naïve, 感染5日目, 感染14日目と比較)

5. マラリア原虫感染後の樹状細胞の供給と活性化についての解析

マラリア原虫感染後の野生型マウスとTCR- δ KOマウスにおける樹状細胞の細胞数や活性化状態を比較した。活性化状態はマーカーとなるMHC-II, CD80, CD86やCD40などの発現をフローサイトメーターにて検出した。さらに、防御免疫を誘導するのに重要な樹状細胞活性化のタイミングをはかるため、*Plasmodium berghei* XAT感染後に人為的に樹状細胞の活性化を誘導することが出来るanti-CD40抗体を投与した。

【研究結果】

まず、*Plasmodium berghei* XAT感染マウスの骨髓内での造血幹細胞や各種血球細胞の数的変動をフローサイトメーターにて詳細に解析した。その結果、マラリアの免疫に重要な役割を担う抗原提示細胞の樹状細胞数に一過性の増加がみられ、さらに樹状細胞の前駆細胞数も同様に一過性の増加がみられた。この現象は、IFN- γ 受容体欠損マウス (IFN- γ R1 KOマウス) においてはみられなかったことから、マラリア原虫感染後の樹状細胞の一過性の増加は、前駆細胞レベルでのIFN- γ シグナル増進によるものである可能性が示唆された。さらに、これまでの報告では、感染後においても造血幹細胞は数の増減はみられないとされてきたが、今回の研究によって造血幹細胞でも減少と増加の時期があることが確認された。

次に、この造血系の変動における $\gamma\delta$ T細胞の関連性を調べた。まず、野生型マウスとTCR- δ KOマウスにおける樹状細胞の細胞数を比較したところ、 $\gamma\delta$ T細胞の欠損により樹状細胞数の増加が顕著に抑えられていた。さらに、マラリア原虫感染後5日目に、脾臓 $\gamma\delta$ T細胞は樹状細胞との結合の割合を上昇させていることがわかった。この時点から、 $\gamma\delta$ T細胞はIFN- γ の他にCD40 Ligandを発現する様になり、樹状細胞を活性化させる機能があることが示された。また、このCD40 Ligand発現 $\gamma\delta$ T細胞による樹状細胞活性化が*Plasmodium berghei* XATへの感染防御免疫につながるのは、感染初期においてのみであ

ることも明らかとなった (Inoue et al., *FEBS Lett*, 2014; 図1参照)。さらに、マイクロアレイ解析により、 $\gamma\delta$ T細胞はマラリア原虫感染により種々のケモカインを産生するようになることが明らかになりつつある (Inoue et al., 未発表)。今後は、どの分子が樹状細胞を $\gamma\delta$ T細胞自身に引き寄せているのかを特定する予定である。

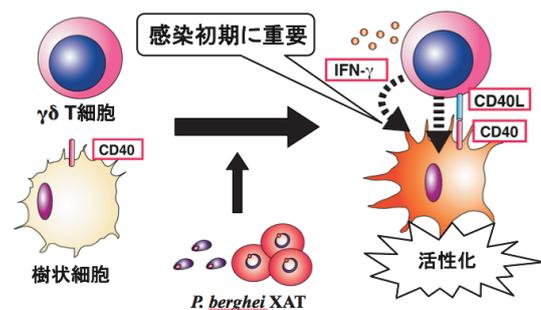


図1 $\gamma\delta$ T細胞による樹状細胞活性化のタイミングとマラリア感染防御

次に、マラリア原虫感染後に増加する造血細胞について、野生型マウスとTCR- δ KOマウスで比較解析した。まず、それら両マウスにおけるマラリア原虫感染後の脾臓や骨髓における造血細胞分画 (c-Kit陽性, Sca-1陽性, Lin陰性) の数的変動を計測したところ、脾臓での造血細胞の増加がTCR- δ KOマウスで著しく抑えられることが分かった。一方、末梢血においては、TCR- δ KOマウスの方が多くの造血細胞がみられたことから、 $\gamma\delta$ T細胞は造血細胞のホーミングに関与していることが示唆された。さらに、造血サイトカインを添加した*in vitro*培養系での血球分化能の評価をおこなったところ、TCR- δ KOマウスでも外部刺激による血球コロニー形成能は維持されていることが確認された。さらに、致死量放射線照射した野生型マウスをレシピエントとし、野生型マウスとTCR- δ KOマウスのドナー造血細胞を移植する事によって造血再構築能の比較をしたところ、TCR- δ KOマウスの方が造血能を維持していることが示された。これらの結果は、TCR- δ KOマウスではマラリア原虫感染による造血亢進が低下することで、造血能が保持された造血細胞が比較的多く残っていることを示唆している。

今回の一連の研究によって、 $\gamma\delta$ T細胞とマラリア原虫感染後の造血亢進には関連性があることが示唆された (図2参照)。さらに、マイクロアレイ解析により、その現象に働く候補分子の手がかりを得た。今後は、この情報を元に関連分子の特定を進める予定である。

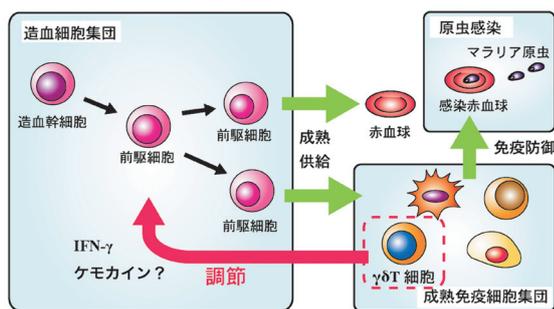


図2 マラリア原虫感染後の造血と $\gamma\delta$ T細胞の関連性

List of publications

1. 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*, 81(10): 3865-3871, 2013.
2. Inoue S-I, Niikura M, Mineo S, Kobayashi F: Roles of IFN- γ and $\gamma\delta$ T cells in protective immunity against blood-stage malaria. *Front Immunol*, 4(258): 1-9, 2013.
3. 井上信一 (総説): マラリア原虫感染防御における $\gamma\delta$ (ガンマデルタ) T細胞の役割. 杏林医学会雑誌44(4), s47-s48, 2013.
4. Inoue S-I, Niikura M, Inoue M, Mineo S, Kawakami Y, Uchida A, Ohnishi H, Kamiya S, Watanabe T, Kobayashi F: The protective effect of CD40 ligand-CD40 signalling is limited during the early phase of *Plasmodium* infection. *FEBS Lett*, 588(13): 2147-2153, 2014.

講演記録

- (1) 井上信一, 新倉 保, 井上愛美, 峯尾松一郎, 小林富美恵: マラリア原虫感染防御に働く脾臓 $\gamma\delta$ T細胞のレパトア解析. 第24回日本生体防御学会学術総会, 熊本, 平成25年7月10-12日.
- (2) 井上信一 (平成25年度生体防御学会奨励賞受賞講演): マラリア原虫感染防御における $\gamma\delta$ T細胞の役割の解明. 第24回日本生体防御学会学術総会, 熊本, 平成25年7月10-12日.
- (3) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Megumi Inoue, Shoichiro Mineo, Fumie Kobayashi: VS1+ cells are the major subset of $\gamma\delta$ T cells for protection against *Plasmodium berghei* XAT. Forum Cheju 16, Seoul, August 30th-September 1st, 2013.
- (4) Mamoru Niikura, Shin-Ichi Inoue, Shoichiro Mineo, Megumi Inoue, Fumie Kobayashi: Roles of NT1 and PNP in the blood stages of *Plasmodium berghei* ANKA. Forum Cheju 16, Seoul, August 30th-September 1st, 2013.
- (5) 井上信一, 新倉 保, 井上愛美, 峯尾松一郎, 小林富美恵: *Plasmodium berghei* XAT感染における $\gamma\delta$ T細胞サブセットの機能解析. 第11回分子寄生虫・マラリア研究

フォーラム, 長崎, 平成25年10月2-3日.

- (6) 峯尾松一郎, 新倉 保, 井上信一, 井上愛美, 黒田雅彦¹, 小林富美恵 (¹東京医科大学・分子病理学講座): 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, 長崎, 平成25年10月4-5日.
- (7) 石井 明, 柴田 清, 岩永史朗, 油田正夫, 新倉 保, 小林富美恵: ネズミマラリア原虫2種混合感染での感染動態. 第73回日本寄生虫学会東日本支部大会, 東京, 平成25年10月12日.
- (8) 井上信一, 新倉 保, 大西宏明, 渡邊 卓, 小林富美恵, (平成25年度杏林大学医学部共同研究プロジェクト中間報告): マラリア防御免疫における $\gamma\delta$ T細胞の役割. 第42回杏林医学会総会, 東京, 平成25年11月16日.
- (9) 井上信一, 新倉 保, 井上愛美, 峯尾松一郎, 小林富美恵: マラリア原虫感染に対する宿主防御免疫を促進する $\gamma\delta$ T細胞サブセットの機能解析. Characterization of $\gamma\delta$ T-cell subsets during *Plasmodium berghei* XAT infection. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 平成25年12月3-6日.
- (10) 井上信一, 新倉 保, 井上愛美, 峯尾松一郎, 川上 泰, 内田明彦, 小林富美恵: マラリア防御免疫に必要なCD40シグナルを介した樹状細胞の活性化は原虫感染初期で重要である. 第83回日本寄生虫学会大会, 愛媛, 平成26年3月27-28日.
- (11) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Megumi Inoue, Fumie Kobayashi: Protective effect of agonistic anti-CD40 monoclonal antibody is limited in the early phase of *Plasmodium berghei* XAT infection. 第42回日本免疫学会学術集会, 幕張, 平成25年12月11-13日.
- (12) Shin-Ichi Inoue, Mamoru Niikura, Megumi Inoue, Shoichiro Mineo, Fumie Kobayashi: The protective effect of CD40 ligand-CD40 signaling is limited during the early phase of *Plasmodium* infection. 第7回寄生虫感染免疫研究会, 高山, 平成26年3月11-13日.
- (13) 田邊将信¹, 嘉陽啓之², 朝日博子³, 木村徳宏⁴, 下田耕治⁵, 小林富美恵, 岩田 敏¹, 深尾太郎¹ (¹慶應大・医・感染症, ²Max-Planck-Institute of Immunobiol. & Epigene., ³感染研, 寄生動物, ⁴山口大・医・病理, ⁵慶應大・医・動物実験センター): microRNA欠損マウスを用いた実験的脳マラリアの病原機構解析. 第83回日本寄生虫学会大会, 愛媛, 平成26年3月27-28日.
- (14) 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. Studies on pathogenesis in immunized pregnant mice challenged with lethal malaria parasites. 第83回日本寄生虫学会大会, 愛媛, 平成26年3月27-28日.
- (15) 石井 明, 柴田 清, 岩永史朗, 油田正夫, 新倉 保, 小林富美恵: ネズミマラリア原虫2種混合感染での感染動態. 第83回日本寄生虫学会大会, 愛媛, 平成26年3月27-28日.