

地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」

研究協力者 報告書

マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析

研究協力者 群馬大学・医学系研究科・国際寄生虫病学分野 久枝 一

**研究要旨**

我々はこれまでに赤血球型マラリア原虫の防御に CD8T 細胞が貢献していることを明らかにしてきたが、MHC class I 分子を持たない赤血球に感染するマラリア原虫に対してどのように防御能を発揮するのかは不明であった。本研究ではマウスマラリアモデルを用いて、マラリア原虫が MHC class I 分子を発現する赤芽球に感染すること、さらには CD8T 細胞が感染赤芽球を認識して活性化されることを明らかにした。

**A. 研究目的**

マラリアは今なお世界中で猛威をふるう感染症であり、ワクチンの開発が望まれて久しい。そのためには、防御免疫を理解することは必要不可欠であるが、マラリア原虫の巧みな免疫回避機構により十分ではない。我々はこれまでに赤血球型マラリア原虫の防御に CD8T 細胞が貢献していることを明らかにしてきたが、MHC class I 分子を持たない赤血球に感染するマラリア原虫に対してどのように防御能を発揮するのかは不明であった。本研究ではマウスマラリアモデルを用いて MHC class I を持つ赤芽球が CD8T 細胞の標的となるかを明らかにすることを目的とする。

**B. 研究方法**

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17XNL 株に GFP 遺伝子を組み込み、組換え GFP-Py を作製した。また、さらに卵白アルブミン OVA を加えた GFP-OVA-Py も作製した。

マウスに GFP-Py を感染させ、脾臓あるいは骨髓細胞中の赤芽球を、赤血球系のマーカーであるグリコフォリン A、核 DNA を染色し蛍光顕微鏡、フローサイトメーターで観察した。

CD8 T細胞の応答は、OVA を認識する CD8 T細胞のみをもつ OT-I マウスの CD8 T細胞を用いて解析した。

本研究には遺伝子組換え実験、動物実験が含まれるが、いずれも所属機関での承認を受けており、実験指針にそって行われた。

**C. 結果**

1. マラリア原虫の赤芽球への感染の検証

GFP-Py を感染させたマウスの細胞を蛍光顕微鏡での観察を行った。末梢血中の GFP 陽性の感染赤血球には DAPI に染まるのは小さな原虫の核のみであった（図 1 上段）。一方、溶血した脾臓細胞中には、原虫の核以外の核酸を持った細胞に GFP のシグナルが認められた（図 1 下段）。これはグリコフォリン A を認識する TER119 陽性であり、赤芽球であることが確認された。

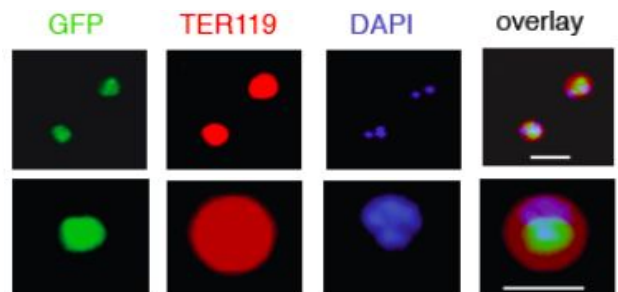


図 1 マラリア原虫感染赤芽球  
GFP-Py感染マウスより  
上段 末梢血中の感染赤血球  
下段 脾臓中の溶血抵抗性感染赤芽球

## 2. CD8T 細胞による感染赤芽球の認識

マラリア原虫の赤芽球感染は証明できたが、CD8T 細胞が認識するかどうかを検討した。まずは、赤芽球が MHC class I を発現するかどうかをフローサイトメーターで確認した。非感染マウスの脾臓での溶血抵抗性 TER119 陽性赤芽球は、通常の脾細胞に比べると発現量は低いものの、MHC class I 分子を発現していた。

次いで、赤芽球が CD8 に認識されるかどうかを OT-I CD8T 細胞を用いて検討した。非感染マウスの赤芽球を精製し OVA の CD8T 細胞エピトープをパルスし、OT-I CD8T 細胞と共培養し OT-I CD8T 細胞による IFN- $\gamma$  産生、赤芽球に対する細胞傷害活性で評価した。OVA エピトープ存在下で、OT-I CD8T 細胞は IFN- $\gamma$  を産生し、赤芽球に対して細胞死を誘導した。いずれも、エピトープをパルスした脾臓細胞を用いた時よりも応答は弱かった。これは、MHC class I の発現に相関していると思われる。いずれにしても、赤芽球が CD8 T 細胞に認識されることは明らかとなつて。

さらに、感染赤芽球が認識されるかどうかを検討するために GFP-OVA-Py を感染させたマウスの感染赤芽球を OT-I CD8T 細胞と共培養した。GFP-Py 感染マウスの感染赤芽球は OT-I CD8T 細胞を活性化することはなかったが、GFP-OVA-Py 感染マウスの感染赤芽球は OT-I CD8T 細胞からの IFN- $\gamma$  を誘導した。このことは、感染赤芽球が抗原特異的に CD8 T 細胞に認識されることを明確にするものである。

## D. 考察

マウスマラリアにおいて初めて赤芽球感染を示した。赤芽球感染の割合は低く、好適な宿主細胞ではなく、偶発的に侵入しそこでは発育できないと想定された。本研究では、感染赤芽球内でもマラリア原虫は分裂し、次の感染を起こすことも証明しており、原虫にとっても何らかの意味合いがあることが推察された。

感染赤芽球が CD8T 細胞に認識され、CD8T 細胞を活性化しうることも明らかとなった。赤芽球も通常の細胞と同様に、MHC class I に抗原を提示に関わるマシーナリーを持っていることが知られており、抗原提示できるのであろう。我々が見いだした、赤内マラリアに対する CD8T 細胞の防御メカニズムの一翼を担って

いると考えられる。しかしながら、感染赤芽球に対する細胞傷害活性が生体内でどれほどの防御効果を占めるのかについては今後の検討の課題である。

## E. 結論

マウスマラリアモデルにおいて、マラリア原虫が赤芽球に感染すること、さらには CD8 T 細胞が感染赤芽球を認識することを世界に先駆けて明らかにした。この結果は、CD8T 細胞を標的とした新たなワクチン戦略の可能性を示すものと期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

今井孝, 石田英和, 鈴江一友, 平井誠, 谷口委代, 岡田紘子, 鈴木智久, 岩永史郎, 久枝 一 マラリア原虫は赤芽球に感染し CD8T 細胞を活性化する. 第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 23 日

平井誠, 本間一, 中村昇太, 後藤直久, 美田敏宏, 鈴江一友, 今井孝, 松岡裕之, 安永照雄, 古澤満, 堀井俊宏, 久枝 一, 田邊和裕 超加速変異型ネズミマラリア原虫の創出とその順遺伝学への応用第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 23 日

鈴江一友, 叢 岳, 平井誠, 今井孝, 谷口委代, 岡田紘子, 小安重夫, 鈴木守, 久枝 一 マラリア感染時における他感染症に対する防御能への影響. 第 81 回日本寄生虫学会大会、兵庫医科大学、兵庫、平成 24 年 3 月 24 日

Kazutomo Suzue, Yue Cong, Makoto Hirai, Takashi Imai, Tomoyo Taniguchi, Hiroko Okada, Chikako Shimokawa, Shigeo Koyasu, Mamoru Suzuki, Hajime Hisaeda. Attenuation of protective immunity against bystander infectious agents upon malaria. 第 41 回日本免疫学会総会、神戸国際会議場、兵庫、平成 24 年 12 月 5 日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし