

106. リーシュマニア原虫病原性発現機構の解明

前川 洋一

Key words : リーシュマニア症, 免疫記憶,
CD4 陽性 T 細胞, Notch シグナル

岐阜大学 大学院医学系研究科
寄生虫学・感染学分野

緒 言

リーシュマニア症はリーシュマニア原虫の感染を原因とする人獣共通感染症である。リーシュマニア症はサシチュウバエによって媒介されるためその生息域である熱帯、亜熱帯地域を中心としておよそ 90 カ国 1,200 万人がリーシュマニア症に感染しており、現在も毎年 200 万人の新たな感染者が出現していると推計されている。今後温暖化の影響によりその感染域の拡大が懸念されており、リーシュマニア症は緊急に対策を要する 6 つの感染症の 1 つとされている。リーシュマニア症は感染する原虫の亜種によって症状に大きく差があり、ヒトでは内臓型、皮膚型および粘膜皮膚型に分類される。特に内臓型は発熱、肝脾腫や貧血といった症状を呈し放置すれば死に至る重篤な感染症である。従来、本感染症の治療には 5 価アンチモンを含む薬剤を用いた化学療法が行われてきた。作用機序は不明であるものの効果を発揮してきた療法であるが近年耐性原虫が出現しており、新規治療法の開発が急務となっている。また、リーシュマニア症の制圧においてワクチンの開発は必須であるが未だに確立されていない。リーシュマニア症ワクチンの確立にはワクチン開発の基盤となる免疫記憶現象を深く理解する必要がある。そこで本研究では、リーシュマニア感染症における宿主免疫応答について特に免疫記憶現象に焦点を当てて解析を行った。

方法および結果

1. CD4 陽性 T 細胞特異的 Notch シグナル欠損マウスではリーシュマニア再感染に対して抵抗性を発揮できない

本研究ではリーシュマニア症ワクチン開発に必要な免疫記憶現象の基礎的理解を深め、新たなワクチン制御標的を見出すことを目的としている。我々は従来リーシュマニア症の病態解明のため、マウス実験的リーシュマニア症を用いて Th1/Th2 分化制御機構について研究を行ってきた^{1,2)}。一連の研究を通してリーシュマニア感染に対する抵抗性を発揮する上で Notch シグナルが CD4 陽性 T 細胞の機能発現や機能系譜決定に深く関与していることを見出し報告してきた。我々は感染抵抗性メモリー CD4 陽性 T 細胞の生物現象に Notch シグナルが関与しているのではないかとの着想を得、その検証を行った (図 1)。転写制御因子 Rbpj が欠損すると標準的 Notch シグナルが機能しなくなることが明らかであるため、CD4 陽性 T 細胞特異的に Rbpj 遺伝子を欠損するマウス (RFF4) を作出した。さらにマウスリーシュマニア症における CD4 陽性 T 細胞特異的 Notch シグナルの役割を検証する目的で BALB/c 背景となるマウスを作出した (B-RFF および B-RFF4)。皮膚型リーシュマニア症のマウスモデルである *Leishmania major* (*L. major*) 感染実験では C57BL/6 マウスは感染抵抗性を、BALB/c マウスは感染抵抗性を示し感染局所の腫脹が継時的に増大する。一方、BALB/c マウスに感染と同時に抗 IL-4 抗体を投与すると感染抵抗性となる。B-RFF および B-RFF4 マウスに抗 IL-4 抗体を作用させるといずれの群も感染抵抗性を示した。初感染収束 1 ヶ月後に、再度 *L. major* を感染させると野生型である B-RFF^{all-4} は依然抵抗性を示した。一方、B-RFF4^{all-4} は初感染では抵抗性を獲得していたにもかかわらず、再感染では感受性となった。このことから、リーシュマニア感染抵抗性を維持する免疫記憶、即ち感染抵抗性メモリー CD4 陽性 T 細胞が Notch シグナル不全によって障害を受けていることが示唆された。

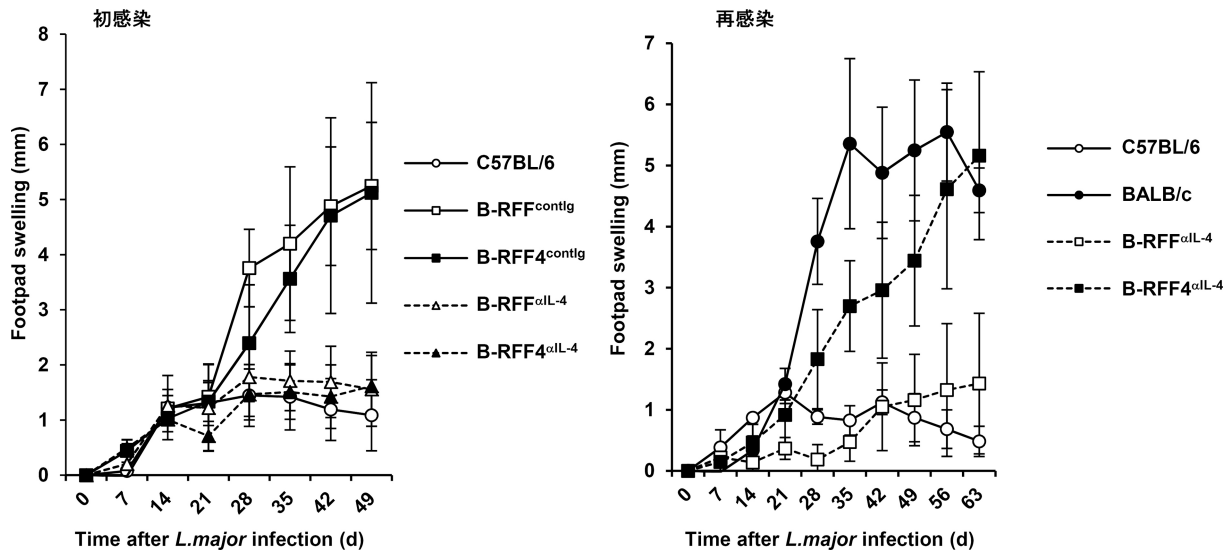


図1. CD4 陽性 T 細胞特異的 Notch シグナル欠損マウスにおけるリーシュマニア初感染および再感染時の感染動態。

C57BL/6 マウスは皮膚型リーシュマニア症原虫 *Leishmania major* 感染に対し抵抗性である（感染局所の腫脹が一過性）。BALB/c 背景マウスは感染感受性である（B-RFF^{contlg} および B-RFF4^{contlg}, 感染局所の腫脹が継続的に増大）。感染時に抗 IL-4 抗体を投与すると BALB/c 背景マウスが抵抗性となる（B-RFF^{αIL-4} および B-RFF4^{αIL-4}）。初感染時に抗 IL-4 抗体投与により抵抗性を獲得したマウスは再感染に対しても抵抗性である（再感染 B-RFF^{αIL-4}）。一方、一旦抵抗性を獲得した B-RFF4^{αIL-4} マウスでは再感染に対して感受性を示した。

2. Notch シグナル欠損メモリー CD4 陽性 T 細胞は生体内で長期生存ができない

そこで我々は CD4 陽性 T 細胞の Notch シグナルが細胞の生存に関与するかを直接的に解析した（図2）。抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の生体内での動態を解析するために、卵白アルブミン (OVA) 抗原特異的 T 細胞抗原レセプターを遺伝子導入されたマウス (OT-II) 由来の CD4 T 細胞を用いた。野生型と RFF4 背景の OT-II CD4 陽性 T 細胞をレシピエントマウスに同数移入した後に OVA を免疫した。OVA 免疫後、野生型と RFF4 背景の OT-II CD4 陽性 T 細胞数を継続的に解析してその比率を算出した。RFF4 背景の OT-II CD4 陽性 T 細胞は免疫後早期には野生型と同様の細胞数であったが、継続的に野生型と比較し顕著な細胞数減少が認められた。また、Ly6C 発現を指標にメモリー CD4 陽性 T 細胞を解析したところ、RFF4 マウス群では野生型マウス群に対して著明に減少していた。これらのことからメモリー CD4 陽性 T 細胞での Notch シグナルは細胞の長期生存に必須であることが明らかとなった。Notch シグナルを担う Notch 受容体には Notch1~4 の 4 種類あるが、メモリー CD4 陽性 T 細胞の長期生存には Notch1 と Notch2 の 2 種類の受容体が必要であることも明らかになった。

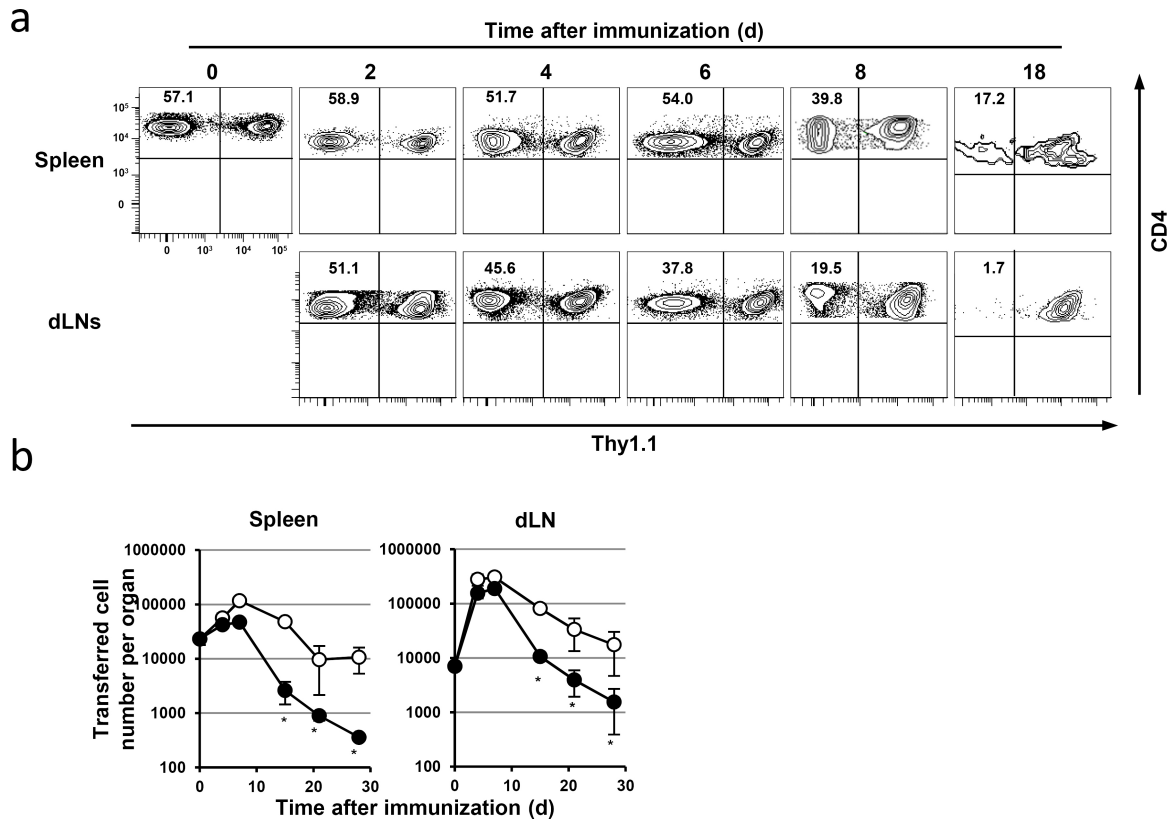


図2. Notch シグナル欠損 CD4 陽性 T 細胞の抗原刺激後の生体内動態。

卵白アルブミン (OVA) 由来ペプチド特異的 OT-II T 細胞抗原レセプターを持つ野生型および RFF4 (図 1 参照) CD4 陽性 T 細胞をレシピエントマウスに同数移入し OVA を免疫した。その後の移入 T 細胞の動態をフローサイトメーターにて解析 (a) し、脾臓中の移入細胞数の推移として表示 (b)。a) Thy1.1 陽性細胞が野生型由来、Thy1.1 陰性が RFF4 由来移入細胞。b) 白：WT, 黒：RFF4。* $p < 0.05$ (t-test)。

3. Notch シグナル欠損メモリー CD4 陽性 T 細胞ではグルコース取り込みに障害がある

Notch シグナルは T 細胞発生時期にグルコース取り込みに関与していることが明らかとなっている。そこで我々は活性化後の CD4 陽性 T 細胞内へのグルコース取り込みについて検討した (図 3)。RFF4 由来 CD4 陽性 T 細胞は抗原刺激後早期には野生型と同等のグルコース取り込み能を示したが、細胞減少が顕著となる免疫 16 日後には有意にグルコース取り込みが低下した。グルコース取り込み不全が細胞著減の原因か否かを検証するため、グルコース取り込み不全を迂回させる目的でグルコース代謝産物であるピルビン酸を作用させることで細胞の減少を補正できるか否かについて検討した。OT-II CD4 陽性 T 細胞移入実験において免疫 8 日目から 1 週間ピルビン酸をマウスに投与したところ、RFF4 由来 CD4 陽性 T 細胞の減少の回復が認められた。

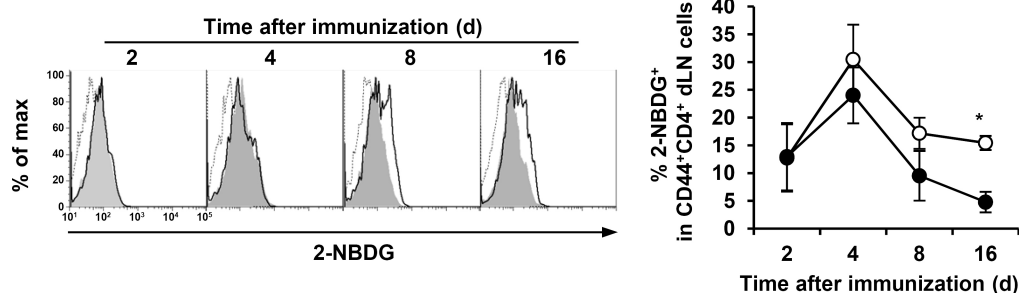


図3. 活性化 CD4 陽性 T 細胞のグルコース取り込みの推移.

野生型および RFF4 由来 OT-II CD4 陽性 T 細胞 (図2 参照) をレシピエントマウスに移入し OVA を免疫した. 免疫 2, 4, 8, 16 日後の活性化 CD4 陽性 T 細胞のグルコース取り込みをグルコースアナログである 2-NBDG の取り込みにて評価した. 左図) 点線: 対照抗体染色, 実線: WT, 影付: RFF4. 右図) 白: WT, 黒: RFF4. * $p < 0.05$ (t-test).

4. Notch シグナル欠損の活性化 CD4 陽性 T 細胞ではインスリン刺激による AKT リン酸化が不十分であるため Glut1 の細胞表面への発現上昇が起こらない

我々はメモリー CD4 陽性 T 細胞について解糖系を中心としたエネルギー代謝を検討した. 野生型と RFF4 の両群でメモリー CD4 陽性 T 細胞の基礎的な解糖系には有意な差は認められなかった. 一方, インスリンによるグルコース取り込み促進に伴う解糖系の亢進が RFF4 由来 CD4 陽性 T 細胞では全く観察されなかった. このことから, RFF4 由来 CD4 陽性 T 細胞では誘導性グルコース取り込みに障害があることが予想された. グルコース取り込みに関与するトランスポーターである Glut の発現を検討したところ, 野生型ではインスリン刺激に対して Glut1 発現が上昇したが RFF4 では観察されなかった. そこでインスリン受容体下流のシグナル経路を解析したところ, RFF4 由来 CD4 陽性 T 細胞では AKT のリン酸化が十分に惹起されていないことがわかった. また, 活性化型 AKT を RFF4 由来 CD4 陽性 T 細胞に導入すると細胞の減少を抑制した. このことから, Notch シグナル欠損メモリー CD4 陽性 T 細胞での細胞著減の原因として不十分な AKT 活性化に伴うグルコース取り込み不全によるエネルギー不足が考えられた.

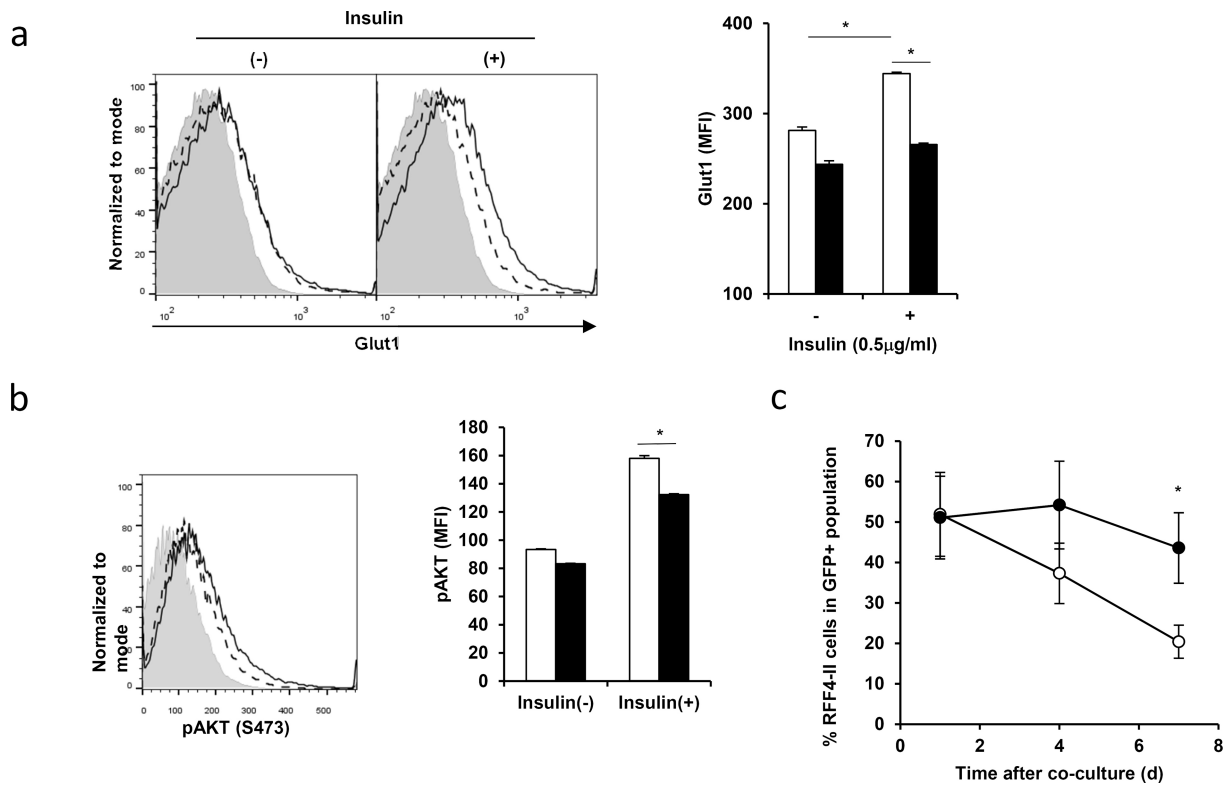


図4. 活性化CD4陽性T細胞における誘導性Glut1発現とAKTリン酸化.

抗原により活性化されたCD4陽性T細胞をインスリンにて刺激した際のグルコーストランスポーターGlut1発現の変化(a)と、AKTのリン酸化(b). 左図) 影付: 対照抗体染色, 実線: WT, 点線: RFF4. 右図) 白カラム: WT, 黒カラム: RFF4. c) 活性化型AKTによるNotchシグナル欠損CD4陽性T細胞減少の回復. 白: 対照ウイルス感染群, 黒: 活性化型AKT発現ウイルス感染群. * $p < 0.05$ (t-test).

考 察

我々は本研究によってリーシュマニア症ワクチン開発の基礎となるメモリーCD4陽性T細胞の長期生存にNotchシグナルが重要であること、NotchシグナルはAKT活性化を担保することでグルコース取り込みを調節しメモリーCD4陽性T細胞のエネルギー代謝を制御していることを明らかにすることができた。メモリーCD8陽性T細胞の生存には脂肪酸代謝によるエネルギー供給が深く関与している。さらにメモリーCD8陽性T細胞の生存に必要な脂肪酸は細胞外から取り込むのではなく、細胞外グルコースから一旦脂肪酸を合成したあと脂肪酸酸化と酸化的リン酸化を行っているとの報告がある。今回の我々の知見と合わせると、メモリーT細胞の維持にはグルコース代謝が必要であり、その制御をNotchシグナルが担っていると考えられる。NotchシグナルがどのようにAKTリン酸化を担保しているのかについては依然不明であり、今後の検討が必要である。

メモリーCD4陽性T細胞は度重なる感染による脅威を防ぐ上で欠くことができない細胞である。リーシュマニア症ワクチンの開発にはメモリーCD4陽性T細胞の増殖や生存を適切に調節する方法の確立が必要である。我々の知見はNotchシグナルやグルコース代謝の調節がワクチン効果の長期維持を可能にする新たな方策となることを示している。今後は本研究を通して得られた知見に基づき、重篤な内蔵型リーシュマニア症における免疫記憶現象について解析を進めていく予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、岐阜大学大学院医学系研究科寄生虫学・感染学分野の呉志良, Piyarat Srinontongである。また本研究は徳島大学大学院医歯薬学部生体防御医薬分野の安友康二博士に協力していただいた。この場をお借りして深く御礼いたします。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Maekawa, Y., Himeno, K., Ishikawa, H., Hisaeda, H., Sakai, T., Dainichi, T., Asao, T., Good, R. A. & Katunuma, N. : Switch of CD4⁺ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.*, **161** : 2120-2127, 1998.
- 2) Maekawa, Y., Tsukumo, S., Chiba, S., Hirai, H., Hayashi, Y., Okada, H., Kishihara, K. & Yasutomo, K. : Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4⁺ T cells. *Immunity*, **19** : 549-559, 2003.
- 3) Maekawa, Y., Ishifune, C., Tsukumo, S., Hozumi, K., Yagita, H. & Yasutomo, K. : Notch controls the survival of memory CD4⁺ T cells by regulating glucose uptake. *Nat. Med.*, **21** : 55-61, 2015.