

## 112. $\gamma\delta$ T 細胞によるマラリア免疫記憶の制御

井上 信一

Key words : マラリア, 免疫記憶,  $\gamma\delta$  T 細胞

杏林大学 医学部 感染症学講座  
寄生虫学部門

### 緒言

マラリアは、全世界で年間約2億人の罹患者と100万人近い死亡者を出し、エイズや結核と並び世界三大感染症の一つとされている。マラリア根絶のためにワクチンの開発が待望されているものの、現在のところ開発成功に至っていない。この現状を打破するためには、マラリア原虫が感染した際の防御免疫機構を詳細に解明することが重要となる。これまでに、マラリア患者の末梢血や脾臓で $\gamma\delta$  T細胞が増加しているとの報告があったことから、 $\gamma\delta$  T細胞とマラリアの関連性が示唆されてきた。マウスマラリアモデル実験系において、感染の慢性期に $\gamma\delta$  T細胞数が急増することから、 $\gamma\delta$  T細胞数は感染の慢性期においてヘルパー T細胞の活性化をサポートしていると推測されていた。しかし最近、我々は、 $\gamma\delta$  T細胞は樹状細胞が活性化する感染初期において感染防御に重要な役割を担っていて、感染の慢性期における $\gamma\delta$  T細胞の急増は感染防御自体には必須でないことを見出した。さらに、 $\gamma\delta$  T細胞は感染早期にCD40 ligand (CD40L) を発現して樹状細胞を活性化させ、マラリアに対する防御免疫機能を亢進させていることを明らかにした<sup>1,3)</sup>。しかし、感染の慢性期に $\gamma\delta$  T細胞が急増することの意義は依然として謎である。一方、CD40LはB細胞をヘルプする際にも必須の補助刺激分子である。すなわち、 $\gamma\delta$  T細胞はB細胞に対する刺激、さらには記憶B細胞の分化や維持に関与している可能性が考えられる。本研究は、自然免疫リンパ球の一つである $\gamma\delta$  T細胞が、マラリア原虫に対する免疫記憶細胞の分化や維持にどのような影響を及ぼしているかについてマウスマラリア原虫感染モデルを用いて調べることにより、 $\gamma\delta$  T細胞による免疫記憶制御機構を解明することを最終目標として研究を進めた。

### 方法、結果および考察

強毒株マラリア原虫である *Plasmodium berghei* NK65 株の感染赤血球  $1 \times 10^4$  個を野生型 C57BL/6J マウス (WT マウス) の尾静脈に接種すると、高原虫血症を呈して死亡した (図 1; ○)。一方、弱毒株マラリア原虫の *P. berghei* XAT を WT マウスに感染させると、末梢血中の感染赤血球の割合が3回ほどの上昇下降を繰り返した後に自然治癒した<sup>1,3)</sup>。この *P. berghei* XAT 感染耐過マウスに強毒株マラリア原虫の *P. berghei* NK65 株を感染させると、マウスは死亡することなく原虫を排除できることから、マラリア原虫に対する免疫記憶が形成されていることが示された (図 1; ●)。我々は、このマラリア原虫感染の免疫記憶実験系を用いることで、 $\gamma\delta$  T細胞と免疫記憶の関連性の手がかりを探った。まず、*P. berghei* XAT 株を WT マウスに感染させて120日後、GL-3モノクローナル抗体を腹腔内投与することにより $\gamma\delta$  T細胞を除去した。また、コントロールとして非特異的IgGを腹腔内投与したマウスも用意した。そして、抗体投与の60日後に、各群のマウスに強毒株 *P. berghei* NK65 を感染させて経時的に末梢血中の感染赤血球の割合を算定して比較することで、マラリア免疫記憶における $\gamma\delta$  T細胞の影響を調べた。その結果、一過性の $\gamma\delta$  T細胞欠損を引き起こしたマウスは *P. berghei* NK65 感染により死亡することはないものの、コントロールよりも原虫の排除効率が悪く、免疫記憶機能が低下していることが分かった (図 1; ▲△)。

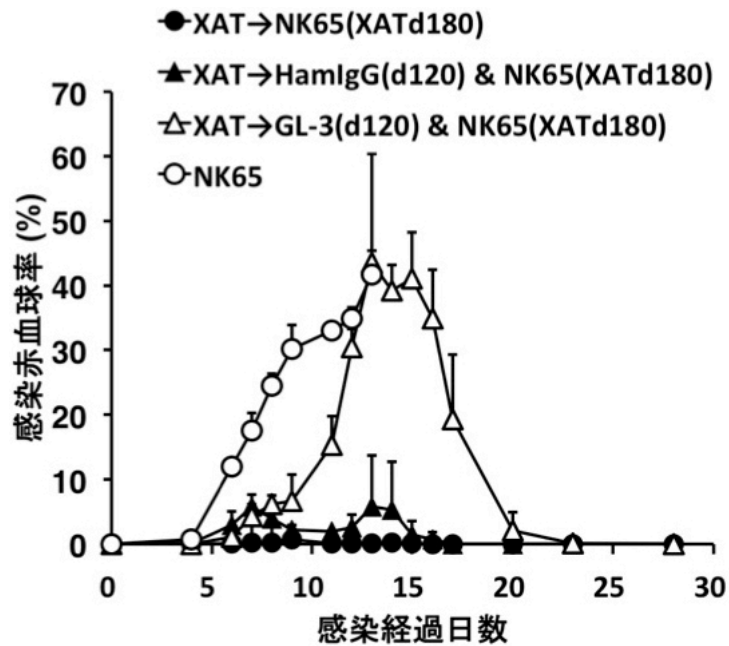


図1.  $\gamma\delta$  T細胞除去によるマラリア免疫記憶能の低下.

●: WTマウスに弱毒株 *P. berghei* XAT を感染させて180日経過後, 強毒株 *P. berghei* NK65 を感染させた時の末梢血における感染赤血球率の推移. ▲: WTマウスに弱毒株 *P. berghei* XAT を感染させて120日経過後, 非特異的 IgG を腹腔内投与した. その後, 感染180日目に強毒株 *P. berghei* NK65 を感染させた時の末梢血における感染赤血球率の推移. △: WTマウスに弱毒株 *P. berghei* XAT を感染させて120日経過後, GL3抗体を腹腔内投与することで  $\gamma\delta$  T細胞を除去したをした. その後, 感染180日目に強毒株 *P. berghei* NK65 を感染させた時の末梢血における感染赤血球率の推移. ○: WTマウスに強毒株 *P. berghei* NK65 を感染させた時の末梢血における感染赤血球率の推移.

成熟B細胞欠損マウス (*Ighm* KOマウス) に弱毒株 *P. berghei* XAT を感染させると, 高原虫血症を呈して死亡した (図2A, B). したがって, マラリア原虫排除には液性免疫が重要であることが示唆された. さらに, 以前の報告から,  $\gamma\delta$  T細胞欠損マウス (TCR- $\delta$  KOマウス) においても弱毒株 *P. berghei* XAT を排除できないことがわかっている<sup>1,3)</sup>. そこで, 野生型マウスと TCR- $\delta$  KOマウスに弱毒株 *P. berghei* XAT を感染させて, 脾臓と骨髄中のマラリア原虫特異的 IgG 産生細胞数を ELISpot 解析により測定, 比較した. すると, 感染14日目においては TCR- $\delta$  KOマウスも WTマウスと同程度の原虫特異的 IgG 産生細胞数の上昇がみられた. しかし, 感染21日目以降では  $\gamma\delta$  T細胞欠損マウスにおいてマラリア原虫特異的 IgG 産生細胞数の有意な低下がみられた (図3). これらの結果より, 原虫特異的 IgG 産生能をもつ形質細胞の分化段階に  $\gamma\delta$  T細胞は影響せず, 原虫特異的 IgG 産生細胞の維持段階に重要であることが示唆された.

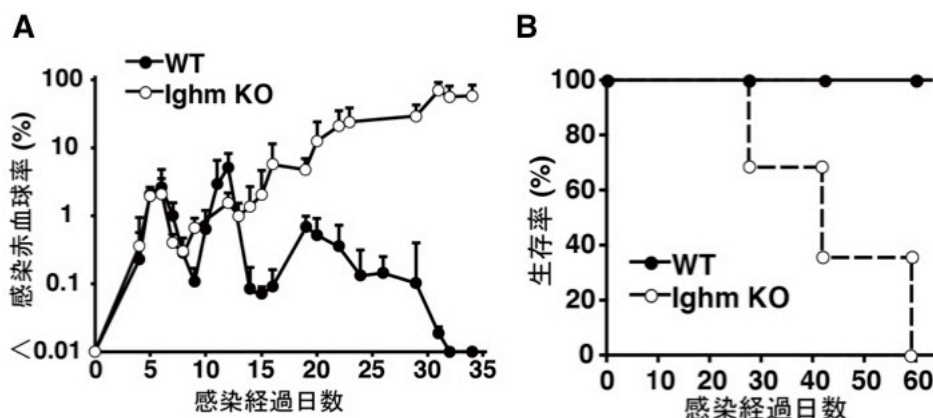


図2. マラリア免疫防御において液性免疫は重要である.

A) WT マウスと *Ighm* KO マウスに弱毒株 *P. berghei* XAT を感染して, 経時的に末梢血中の感染赤血球率を測定した. B) WT マウスと *Ighm* KO マウスに弱毒株 *P. berghei* XAT を感染して, 各マウスの死亡日数から生存曲線を作成した.

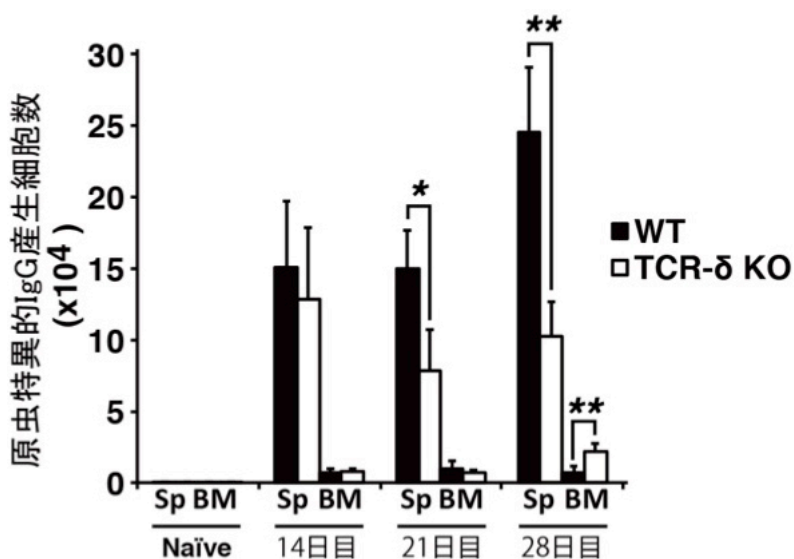


図3. ELISpot アッセイによる原虫特異的 IgG 産生細胞数の測定.

WT マウスと TCR- $\delta$  KO マウスに *P. berghei* XAT を感染させた後, ELISpot アッセイにて脾臓中 (Sp) または骨髄中 (BM) における原虫特異的 IgG 産生細胞数を測定した. 非感染時 (Naive) と *P. berghei* XAT 感染 14 日目, 21 日目, 28 日目に各マウスの解析を行った. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (t 検定).

$\gamma\delta$  T 細胞においてマラリア免疫記憶の制御に関連する遺伝子を探索するため, Naive マウスと *P. berghei* 株感染 90 日目のマウスより  $\gamma\delta$  T 細胞を採取して, マイクロアレイ解析を行った. 現在, データ解析を行い, 関連遺伝子の特定を進めている. *P. berghei* XAT 株感染 90 日目になると, CD40L や BAFF などの B 細胞刺激因子の発現上昇はみられなかったため, その他の因子が間接的に関与していることが想定された. 現在, いくつかの候補因子を選定し, その解析を進めている.

本研究によって,  $\gamma\delta$  T 細胞にはマラリア免疫記憶を促進する能力があることが明らかとなった.  $\gamma\delta$  T 細胞には弱毒株 *P. berghei* XAT 感染防御における原虫特異的 IgG 産生細胞の維持に重要であることが示唆されたが, その作用機序として, 直接的もしくは間接的な免疫記憶細胞の維持機構が存在すると考えられた.  $\gamma\delta$  T 細胞のマイクロアレイ

イ解析を行った結果から、いくつかの候補因子を選定したので、今後はこれら候補因子のマラリア免疫記憶への影響を調べて、 $\gamma\delta$  T細胞によるマラリア免疫記憶制御の全体像をとらえたい。

## 文 献

- 1) Inoue, S.-I., Niikura, M., Takeo, S., Mineo, S., Kawakami, Y., Uchida, A., Kamiya, S. & Kobayashi, F. : Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing  $\gamma\delta$  T cells is responsible for protective immunity to *Plasmodium* parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **109** : 12129-12134, 2012.
- 2) Inoue, S.-I., Niikura, M., Mineo, S. & Kobayashi, F. : Roles of IFN- $\gamma$  and  $\gamma\delta$  T cells in protective immunity against blood-stage malaria. *Front. Immunol.*, **4** : 258, 2013.
- 3) 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** : 2147-2153, 2014.