

# マラリアワクチン開発に向けた肝臓内免疫応答の解明

岐阜大学大学院医学系研究科寄生虫学・感染学分野

前川 洋一

## 1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

マラリアは世界三大感染症の一つであり、およそ 100 カ国の流行地で年間 2 億人以上の罹患者と 40~50 万人の死亡者がある原虫感染症である。一般に抗マラリア薬が奏功するが、薬剤耐性原虫の出現がマラリア制圧上の重要な問題である。従来、人類は効果的なワクチンを開発することで幾つかの感染症を制圧してきたが、マラリアに有効なワクチンは未だ実用化されていない。

通常マラリアに何度罹患しても肝臓ステージでの抵抗性は付与されない。一方、実験レベルでは弱毒化したスポロゾイト（マラリア原虫感染型であり最初の標的細胞である肝細胞に感染する）接種がマラリアを肝臓ステージで阻止する強いワクチン効果を発揮する。弱毒化スポロゾイトはワクチン候補資源として非常に有力であるが、弱毒化スポロゾイトの大量調整法は確立されていない。このような現状を鑑み、弱毒化スポロゾイト接種に匹敵する効果をもつワクチンを開発するためには自然感染と弱毒化スポロゾイト接種における肝臓での免疫応答の違いを解明する必要があると考えた。本研究の目的は、この違いを解明することによって弱毒化スポロゾイト接種によるワクチン効果付与の免疫学的な理論基盤を構築することである。免疫学的理論基盤を構築することにより、マラリアワクチン開発を新たなステージへと導くことができると考えている。

## 2. 方法

### 実験動物およびマラリア原虫

感染宿主として8週齢メスC57BL/6マウスを用いた。マラリア原虫は*Plasmodium yoelii*(*P.y*) 17XLおよびその弱毒変異株であるLISP2欠損原虫（LISP2-KO sporozoite:L2KOS）を用いた。

### 感染

感染プロトコールを

図1に示す。初回および2回目のマラリア

原虫接種時には1万

個のスポロゾイトを頸

静脈的にマウスに投

与した。その後、赤

血球ステージ感染を

治療するため、クロ

ロキ

ン

（40mg/kg/day）を

10日間腹腔内投与した。2回目の接種から1ヶ月後に1万個の野生型*P.y*スポロゾイトを静脈内にチャレンジした。

### 定量PCR

肝臓組織の一部からTrizolによりRNAを抽出した。逆転写を行ったのち表1に示すプライマーを用いて定量的PCRを行った。

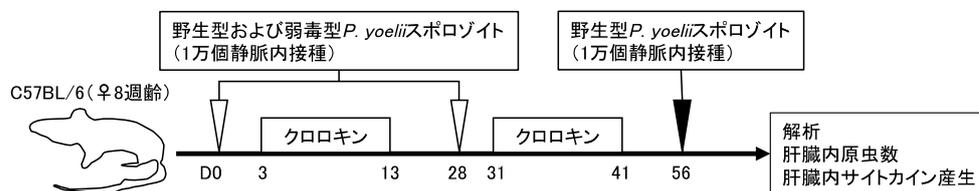


表1、プライマーリスト

遺伝子名	Forward	Reverse
<i>Ifna1</i>	acctgagagagaagaacacagc	cacattggcagaggaagacag
<i>Ifnb1</i>	gttacctgcottgccatcc	tgtctgctggtggagttcatc
<i>Gapdh</i>	ggcattgtggaaggctcat	gacacattggggttagaacac
<i>Py18SRNA</i>	gcgcaagcgagaaagttaaag	gcatcaccatccaagaaatcaa

## 3. 結果 研究成果

マラリアはマラリア原虫（*Plasmodium* 原虫）に感染しているアノフェレス蚊の吸血により媒介される感染症である。蚊の吸血によって体内に注入されたスポロゾイト型マラリア原虫（スポロゾイト）が即時に血流に乗り肝臓の実質細胞（肝細胞）に侵入・寄生することで感染が成立する。肝臓でスポロゾイトが発育した後、赤血球に感染するステージへと移行しマラリアを発症する。弱毒化スポロゾイト（放射線照射あるいは遺伝工学的）を接種するとその後の野生型スポロゾイトチャレンジに対して感染抵抗性が付与されることが実験的に確立されている。

私たちは弱毒化スポロゾイトとして三重大学で樹立した LISP2 欠損スポロゾイト（LISP2-KO sporozoite:L2KOS）を用いている。L2KOS は肝臓ステージでの発育が停止する遺伝子改変株である<sup>(1)</sup>。まず、C57BL/6 系統マウスに対して L2KOS 接種により肝臓ステージ抵抗性を付与することができるか否かに

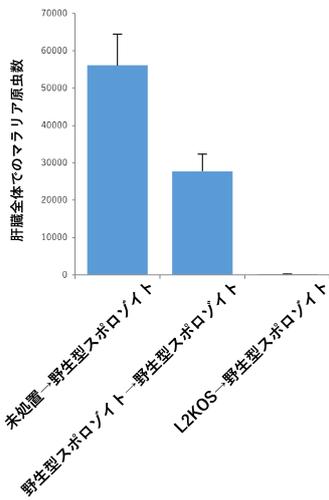


図2、L2KOS接種による肝臓ステージ抵抗性の検討

ついて検討した。L2KOSを1ヶ月の間隔をあけて二度接種し、その1ヶ月後に野生型スポロゾイトを経静脈的にチャレンジした際の肝臓での *Plasmodium* 原虫数を定量PCRにて測定した(図2)。L2KOS接種マウスでは野生型スポロゾイトチャレンジ後の肝臓ステージでの原虫数が検出限界以下まで低下しており、私たちの研究室でも弱毒化スポロゾイトによる感染抵抗性付与系を確立することができた。一方、人でのマラリアでは頻回感染によっても肝臓ステージでの抵抗性は付与できないとされているが、マウスの場合には二度野生型スポロゾイトを接種すると未処置対照群と比較して、チャレンジ後の肝臓ステージでの原虫数が低下していた。マウスモデル実験では同じ株を用いるため若干抵抗性免疫応答が惹起される可能性を考えている。

L2KOSによる肝臓ステージ抵抗性付与を確立できたので、次に野生型スポロゾイトとL2KOSの肝臓での宿主免疫応答の違いについて検討を行った。2014年にMotaらは、スポロゾイト型マラリア原虫に対して肝臓ではI型インターフェロン産生が誘導されスポロゾイト数が若干制御されると報告している<sup>2)</sup>。そこで、スポロゾイト接種2日後に肝臓でのI型インターフェロン(IFN- $\alpha$ 及び $\beta$ )発現を定量PCRにて測定した(図3)。報告通り、野生型スポロゾイト接種ではI型インターフェロン産生の上昇が確認された。しかし、L2KOS接種ではI型インターフェロン産生の誘導を確認することができなかった。野生型スポロゾイトは肝臓で増殖を繰り返し原虫数が増加するのに対し、L2KOSでは発育が停止するため原虫数はそれほど増加しないのではないかと考えられる。I型インターフェロン産生を誘導する上で肝臓での原虫数に閾値があるのではないかと想定し、スポロゾイト接種後の原虫数を解析した(図4)。野生型スポロゾイトは接種2日後をピークに肝臓での原虫数が増加し、3日目には赤血球感染型であるメロゾイトとなりほぼすべての原虫が肝臓外へと遊離したと考えられる。一方、L2KOS接種でも接種後2日目をピークとして原虫数が増加した。野生型スポロゾイトと比較すると原虫数は低値であるが、野生型とL2KOSでの原虫数の差の間にI型インターフェロン産生誘導の閾値があるとは想定し難い。また、L2KOS接種でも接種後3日目には肝臓での原虫数は野生型スポロゾイトの場合と同程度まで減少した。L2KOSはメロゾイトまで発育しないため原虫が肝臓外へと遊離したとは考え難いため、発育停止後速やかに原虫が死滅し肝細胞内あるいは貪食細胞によって処理されたと考えられた。

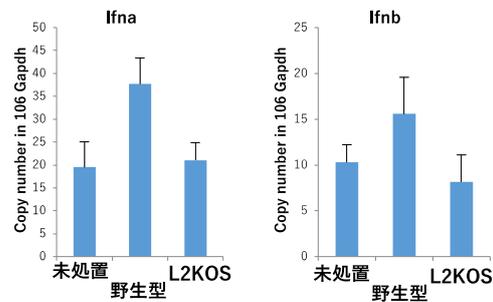


図3、スポロゾイト接種二日後の肝臓でのI型インターフェロン産生

#### 4. 考察 まとめ

本研究の計画段階では、弱毒化スポロゾイトは野生型スポロゾイトでは認められない宿主自然免疫応答を誘導するために、抵抗性を付与できると想定していた。しかし、これまでの結果から少なくともI型インターフェロン産生及びその下流の免疫応答については誘導していないのではないかと考えられ、当初の想定とは逆の結果となっている。そこで、弱毒化スポロゾイト接種ではI型インターフェロン産生誘導が惹起されないことが抵抗性付与と関連するか否かについて今後検討していく予定である。また、スポロゾイト接種後の肝臓での遺伝子発現変化について網羅的に解析することも計画している。さらに、野生型スポロゾイト接種では赤血球ステージが必ず出現するが、赤血球ステージが肝臓ステージでの抵抗性付与を抑制している可能性についても検証していきたいと考えている。

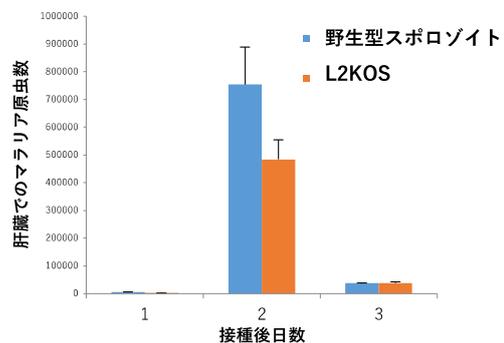


図4、スポロゾイト接種後の肝臓での原虫数の推移

#### 5. 発表論文、参考文献

##### 発表論文

- Asano T, Wu Z, Srinontong P, Ikeda I, Nagano I, Morita H, Maekawa Y. Non-encapsulated *Trichinella pseudospiralis* infection impairs follicular helper T cell differentiation with subclass-selective decreases in antibody responses. *Infect. Immun.* 2016;84:3550-3556.
- Furukawa T, Ishifune C, Tsukumo S, Hozumi K, Maekawa Y, Matsui N, Kaji R, Yasutomo K. Transmission of survival signals through Delta-like 1 on activated CD4<sup>+</sup> T cells. *Sci. Rep.* 2016;6:33692.

3. Wu Z, Nagano I, Takahashi Y, Maekawa Y. Practical methods for collecting *Trichinella* parasites and their excretory-secretory products. *Parasitol. Int.* 2016;65:591-595.
4. Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Boonjaraspinyo S, Srinontong P, Ratasuwan P, Narong K, Nielsen PS, Maekawa Y. Significance of S100P as a biomarker in diagnosis, prognosis and therapy of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Int. J. Cancer* 2016;138:396-408.

#### 参考文献

1. Orito Y, Ishino T, Iwanaga S, Kaneko I, Kato T, Menard R, Chinzei Y, Yuda M. Liver-specific protein 2: a Plasmodium protein exported to the hepatocyte cytoplasm and required for merozoite formation. *Mol Microbiol* 2013;87:66-79.
2. Liehl P, Zuzarte-Luis V, Chan J, Zillinger T, Baptista F, Carapau D, Konert M, Hanson KK, Carret C, Lassnig C, Muller M, Kalinke U, Saeed M, Chora AF, Golenbock DT, Strobl B, Prudencio M, Coelho LP, Kappe SH, Superti-Furga G, Pichlmair A, Vigario AM, Rice CM, Fitzgerald KA, Barchet W, Mota MM. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat Med* 2014;20:47-53.