

脳マラリアの新たな診断と治療のターゲットを発見

—嗅覚に重要な「嗅球」が原虫と免疫の主戦場？—

❖ 概要

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター(IFReC) マラリア免疫学研究室のジェヴァイア・チョバン(Cevayir Coban) 准教授らの研究グループは、脳マラリアの新たな診断と治療のターゲットを発見しました。

世界の多くの地域でいまだに多数の患者と死者をだしているマラリア感染において、昏睡、高熱、痙攣などを起こすもっとも重症な病態のひとつが脳マラリアです。この病態に対する早期診断、治療法ともにいいものがなく最も死亡率の高い危険な病態といわれています。

今回の研究において、

1. 世界最高精度(11.7 テスラ、大阪大学)の MRI を用いることでマラリア感染時に脳の臭いを感じ取る重要な部位「嗅球」にて早期に変化が起ることを世界に先駆けて発見しました。
2. 脳の嗅球の微細構造を2光子顕微鏡(医薬基盤研究所)を用いて生きたまま観察し、嗅球でのマラリア原虫と免疫細胞の相互作用や毛細血管が出血する瞬間の動画を撮影することに成功しました。
3. 1., 2. の結果と詳細な免疫学的な解析により、マラリア原虫が「嗅球」の毛細血管にとどまり(引っかかり)、局所で過剰な免疫反応が起きることによって、微小な出血から血液脳関門の破壊、そして続いて起こる全身の高熱が脳マラリアの病態の引き金になっていることを見出しました。
4. さらに嗅球の重要な機能である「臭い」の異常が脳マラリアの早期診断の鍵になる可能性があり、また、嗅球に集まる免疫細胞を抑える薬を用いることで脳マラリアによる死亡率を下げることを示すデータも示されました。

今回の成果は脳マラリアを悪くする免疫細胞の嗅球への移動を抑制する治療、予防法が開発可能であることを示唆する重要な知見だと考えられます。今後の脳マラリアの脳科学的、免疫学的な理解が深まるとともに、新たな診断と治療のターゲットが開発されることが期待されます。

●掲載誌: *Cell Host & Microbe* (日本時間 2014年5月15日 午前4時 オンライン掲載)

URL: <http://www.cell.com/cell-host-microbe/>

●論文タイトル: “Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria”

(嗅球は脳マラリアにおける時空間的な病態形成に重要な役割を担う)

❖ はじめに

世界の熱帯、亜熱帯地域にみられるマラリア感染症(4 ページ参照)のうち、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*)感染後におこる脳マラリア(Cerebral Malaria)は、マラリアの最も致命的な合併症であり、血液脳関門(BBB)の破壊、脳の免疫異常に起因して生じると考えられています。しかしながら、脳マラリアの症状が起こる前の最初の現象はわかっておらず、あるとすればそれが脳のどこの部位で、どのような変化が生じるかについて時空間的な作用機序は不明のままです。脳マラリアは、高い死亡率または長期の身体障害を伴うことが知られていますが、その発症は突然の痙攣や意識障害、ときには昏睡状態のような臨床症状によって特徴づけられます。脳マラリアの神経症状は特定の脳の病変を示唆するものは少なく、多くは非特異的な症状を呈するため、その早期診断は容易ではありません。従って、脳マラリアの早期の迅速かつ「安価な」診断が必要とされています。

❖ 今回の成果

今回の研究では、強力かつ最新のイメージング技術である、超高磁場 11.7 テスラ MRI および多光子(Multi-Photon, 2 光子とも)顕微鏡法の組み合わせを用いて、脳マラリアにおける脳の組織内で起こるマラリア原虫と免疫細胞の攻防を可視化することを試みました。

まず、マウスマラリアのモデルを用いて検証しました。すなわちマウスに脳マラリアを引き起こすことで知られるマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) 株の感染赤血球を移入します。するとマウスは移入後 6-7 日目に突然脳マラリアの典型的な神経症状を呈し、24 時間以内に死亡します。このマウスの感染後の脳全体を MRI にて撮影しその変化を解析したところ、嗅覚をつかさどるといわれる「嗅球」に、今まで観察されなかった微細な点状の変化が 5-6 日目に出てくるようになりました(図 1A)。これは今回 11.7 テスラという非常に高精度の最新の MRI を用いて観察して初めて見えた微細な変化であり、通常の MRI(医療で用いられるのは 3-7 テスラ)では観察されなかったものでした。

「嗅球」とは、鼻の穴(鼻腔)の奥の粘膜の真上に存在する小さな脳の一部で、独特な放射状および接線方向に密な微小毛細管構造から構成されます。そこで我々は医薬基盤研究所に設置されている、世界でも数少ない感染動物の臓器を生きたまま観察できる 2 光子顕微鏡をもちいてマラリア原虫や免疫細胞の観察を行いました(図 1B)。オンラインの論文では動画を示していますが、通常麻酔科で開頭手術を行わずに生きたまま脳を観察できる方法を用いたところ(Thinned Skull 法)、嗅球の詳細な解剖的な血管の配置やマラリア原虫、免疫細胞を観察することが可能になりました。解析の結果、嗅球の微細な血管をマラリア原虫が走り回り、いくつかのマラリア原虫は血管にとどまるような動画が観察されました。同じ部位で免疫細胞、特に T 細胞の存在も確認され、同時に血管が破れて出血する瞬間を撮影することに成功しました。この発見は、脳マラリアには特異的な部位が特に気質的な変化を起こすとは考えられていなかった現在の考え方を覆すものであり、画期的と考えられます。

本研究では、この発見をさらに展開させました。まず、嗅球において機能的に障害を受ける状態を定量的に計測する簡便な嗅覚診断法(buried food test)を用いてマウスの嗅覚が低下するか計測したところ、今までは脳マラリアの兆候がまったく見られない感染赤血球移入後 3-4 日目にて明らかな嗅覚異常が確認されました。これは嗅覚の簡単なテスト(臭いの消失、異常な臭いの感覚)をすることによって脳マラリアをかなり早期に診断することができる可能性を示す、非常に興味深い実験結果です。

ヒトのマラリア感染はその高熱が周期的に見られることで有名ですが、マラリアのマウスモデルでは(特に脳マラリアでは)死亡寸前に熱が低下することは知られていたものの、(その前に存在すると思われる)高熱がきちんと経時的に計測されたことはありませんでした。今回の研究では脳マラリアの病理で最も重要なこの高熱とその脳血液関門(Blood Brain Barrier:BBB)の関連を示すことができた点でも画期的です。すなわち、今回の研究で初めて開発、使用された医薬基盤研究所のマウス専用の体温及び行動の持続的計測器(特願 2011-102045)を用いて脳マラリアの際に起こる体温の変化を詳細に解析し、脳マラリアに特異的に起こる周期的な高熱を記

録することに成功しました。脳マラリアを起こさない遺伝子欠損マウスや別のマラリア原虫を使用すると高熱が起きないことから、マウスマラリアでは脳マラリアに特異的に死亡 24–48 時間前に持続的な高熱に見舞われ、行動が抑制されることが判明しました。このことから、高熱という病理現象が血液脳関門を破壊する重要な因子になっていることが示唆されました。

最後に、嗅球の血管内を循環するマラリア原虫が、おそらく嗅球の毛細血管周囲の星状細胞(アストロサイト)によって検知され、細胞を呼び寄せる因子の一種、CCL21 というケモカインを産生し、CCL21 の受容体である CCR7 を介してその病態を制御し、さらには、その非典型的な受容体である CXCR3 を介して CD11c 陽性の抗原特異的な CD8 陽性T細胞を嗅球に呼び寄せていることが示唆されました。とくに CCL21 や CXCR3 をブロックするような抗体を使って脳マラリアのマウスの病態を追って計測したところ、有意に病態が遅延することが判明しました。このことはこのような脳マラリアを悪くする免疫細胞の嗅球への移動を抑制する治療、予防法が開発可能であることを示唆する、重要な知見だと考えられます。

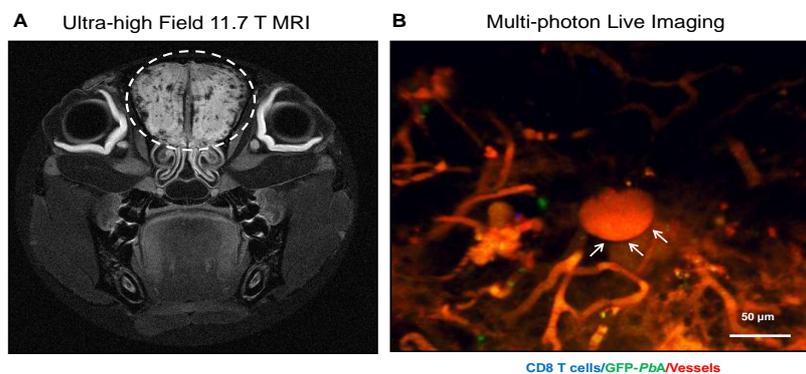


図 1A マウスの頭部の MRI 画像: 11.7 テスラ(通常の病院などで使われている MRI 磁場は 3 テスラ程度)の超高解像度の MRI を用いて嗅球(点線円内)の病変を画像化することに成功。 **図 1B** 多光子顕微鏡を用いて、マウスの嗅球における毛細血管(赤)とその中を通るマラリア原虫(緑)と CD8 陽性 T 細胞(青)の動きを 4 次元(3 次元画像を時間軸を追って記録)動画(論文中動画参照)を撮影した。中央に丸く見える赤い領域(白矢印)は血管が破れ出血した瞬間を捉えたもの。

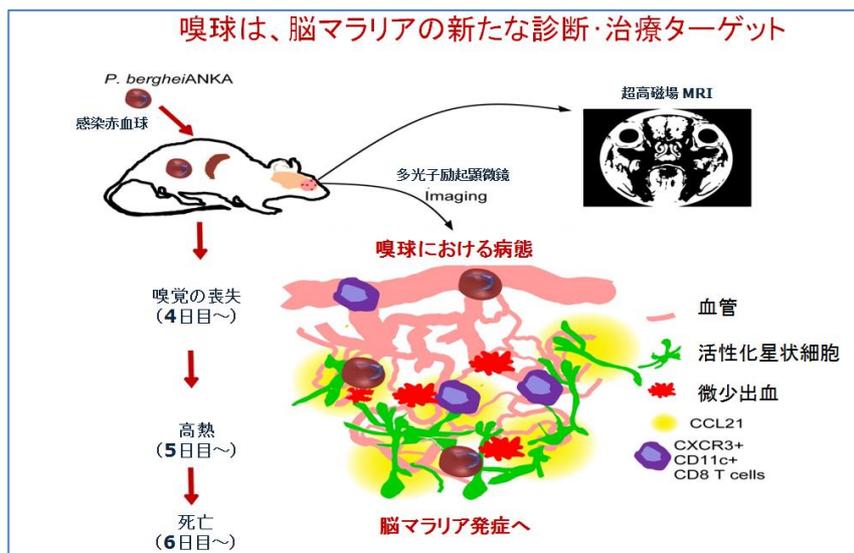


図 2 本論文のまとめ: 脳マラリアのマウスモデルにおいてその病態の新たなキーワード、嗅球が生まれた。それは高解像度の MRI と 2 光子顕微鏡による解析がなしたものであり、その嗅覚の単純なテストや CCL21 や CXCR3 といった免疫細胞の移動に必須な因子が予防や治療のターゲットになりうることを示された。

●マラリア感染症とは？

マラリアはハマダラカによって媒介されるマラリア原虫を病原体とする。蚊の唾液腺から侵入したマラリア原虫(スポロゾイト)がヒト肝臓細胞で増殖して数千のメロゾイトとなり、メロゾイトはさらに赤血球で対数的増殖を行う。発熱、貧血、脾腫などのマラリア症状はこの赤血球期の原虫増殖によってもたらされる。その後おこる昏睡、痙攣などの神経症状をともなう脳マラリア(上記)は数ある症状のなかでもっとも重症で致死性が高い。

ヒトに寄生するマラリア原虫は4種類あるが、なかでも脳マラリアを起こし致死性の高い熱帯熱マラリア原虫はアフリカのサブサハラ地域を中心に、年間に 100-300 万人の犠牲者を出す。さらに、流行地域においては医療費、労働力をも奪われ、マラリアによる経済的損失は年間に1兆5000億円と推定されている。一方、わが国でも海外渡航者や来日外国人によって国内に持ち込まれる輸入マラリアが年間に約100例程度あり、熱帯熱マラリアによる死亡例が散発している。近年、薬剤耐性マラリア原虫が蔓延し、また地球温暖化による流行地域の拡大の懸念から、抜本的な対策として効果的な診断方法、診断薬はもちろん、予防が可能なマラリアワクチンや新規の抗マラリア薬の開発が切望されている。

●追記

今回の成果は同じく大阪大学 免疫学フロンティア研究センター生体機能イメージング研究室の吉岡芳親教授、森勇樹助教、医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト石井健プロジェクトリーダー、青枝大貴主任研究員、そして独協医科大学、生理学研究所、三重大学、岩手医科大学、大阪府立成人病センターの研究者との共同研究の結果得られたものです。