

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15269

研究課題名(和文) 免疫記憶による自然免疫の腸管粘膜における制御 - 寄生虫感染系を用いた解析 -

研究課題名(英文) Innate immune defense of intestinal mucosa regulated by memory T cells in a gastrointestinal nematode infection model

研究代表者

石渡 賢治 (ISHIWATA, KENJI)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00241307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は免疫記憶を司るリンパ球が長期間にわたり腸管粘膜の防御の第一線を担う自然免疫系を制御している可能性からその機序を解明し、ウイルスや細菌などによる粘膜感染症への応用を図るものとして遂行された。具体的に感染幼虫が腸管粘膜に侵入するマウスの寄生線虫(Hp)の再感染に対してその侵入を阻止する機序の解析を行った。その結果、Hpは初めにたどり着いた粘膜に侵入するものの、小腸上部1/6に侵入し直して組織内で発育すること、ゆえに再侵入阻止は初めの侵入によって1～2日で誘導されることが示唆された。この成果は、Hpのこれまでの生活史を改めるものであり、免疫記憶による粘膜侵入阻止が応用可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Our preliminary results suggested that memory T cells maintain long-term innate immune defense on intestinal mucosa against reinfection of infective larvae of mice gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, which penetrate mucosal tissue. Detailed examination revealed that the larvae penetrated mucosal tissue where they reached and re-penetrated upper part 1/6 of the small intestine 1-2 days later. Results suggest that the transient penetration seems to evoke acquired immune response to block larval re-penetration. Our findings point out two significant information, 1) prevision of the known life cycle of *H. polygyrus*, and 2) a new protective mechanism exist as penetration blockade of the larvae against the reinfection as well as adult worm expulsion from the lumen. This protective pathway would be applicable to the vaccine strategies for intestinal infections caused by virus or bacteria.

研究分野：寄生虫感染免疫

キーワード：粘膜免疫 再感染防御 寄生虫感染 免疫記憶 粘膜バリアー 消化管寄生線虫 *Heligmosomoides*

1. 研究開始当初の背景

マウスの消化管寄生虫感染系モデルの一つである、*Heligmosomoides polygyrus* (以下 Hp) 感染は、初感染 Hp は持続感染するものの、駆虫後に再感染をさせると再感染 Hp は感染後 2 週で小腸から排除されることから、防御免疫応答の解析にしばしば用いられている。Hp の感染は、感染幼虫が経口的に侵入することで成立する。実験的に経口投与された感染幼虫は小腸粘膜組織へ侵入し、筋層で发育した後、感染 8 日頃に腸管腔に戻り成虫となり、絨毛間に寄生する。再感染における小腸からの排除は、異所性に発現したムチンが Hp の活性を低下させることでなされるとする報告があるが、その詳細は未だ明らかにされていない (Hasnain et al. 2013)。我々は、再感染において小腸腔に戻る Hp 数が初感染のそれよりも少ないことに気づき、再感染防御には小腸粘膜組織への侵入を阻止するもう一つの防御が存在することを予想した。一般に、再感染に対する免疫応答は感染因子が体内へ侵入してから誘導される。しかしながら、我々の予想した防御は感染幼虫が侵入するのを防ぐものであり、すなわち何時再侵入するかわからない状態でありながら、特異的抗原によって誘導された免疫記憶が長期間にわたって抗原非特異的に自然免疫による粘膜バリアシステムを維持していることを示唆するものである。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究は Hp の初感染によって誘導された特異的免疫記憶が長期間にわたって粘膜からの Hp の再侵入を阻止する機序を明らかにすることを目的とした。どのような感染因子が侵入するのかわからないにも関わらず、その侵入を阻止するという事は、抗原の特異性に依存しない粘膜バリアシステムであることが想定される。そうであるならば、他の粘膜侵入性病原体の感染も防ぐ可能性があり、この機序解明の応用範囲がウイルスや細菌などの感染症に広がる。

3. 研究の方法

BALB/c および C57BL/6 マウス (7-9 週齢、雄雌) は日本エスエルシー株式会社より購入した。IL-4 受容体 α 鎖ノックアウト (KO) マウスは本学総合医科学研究センター 分子免疫学分野 齋藤三郎教授、 μ MT マウスおよび Fc ϵ RI α KO マウスは東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野 烏山一教授、Wsh マウスは東京大学医科学研究所 システム疾患モデル研究センター システムズバイオロジー研究分野 中江進准教授、MasTRECK マウスは東京理科大学 生命医科学研究所 分子病態学研究部門および理化学研究所 生命医科学研究センター サイトカイン制御

研究チーム 久保允人教授より、それぞれ分与いただいた。

Heligmosomoides polygyrus は、JF Urban, Jr. 博士 (USDA Beltsville, MD, USA) より分与され継代しているものを用い、感染幼虫 200 匹を経口投与した。

4. 研究成果

(1) 再感染 Hp の粘膜組織侵入に対する阻止の確認

これまで知られていた、再感染 Hp の腸管腔からの早期排除という再感染防御に加えて、感染幼虫による小腸粘膜組織への侵入そのものを防御するという再感染防御が存在することを以下のように示した。

小腸筋層で发育した Hp は感染後 8 日頃に小腸腔に戻る。感染後 9 日の小腸腔の Hp を初感染と再感染 (初感染後 2 週に駆虫薬処理してその 4 週後に感染) で比較すると、再感染で有意に少なかった (図 1-1)。筋層で发育中の Hp を 6 日で比較する

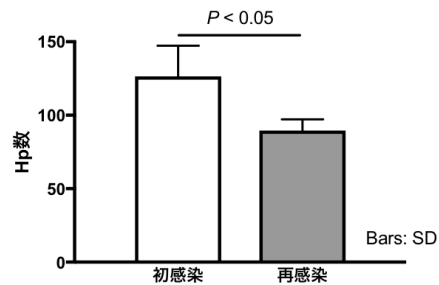


図 1-1 感染後 9 日の小腸管腔内 Hp 数

と、やはり再感染 Hp 数は有意に少なかった (図 1-2)。この時に小腸を 6 等分して各分画に分けて調べると、初感染 Hp は小

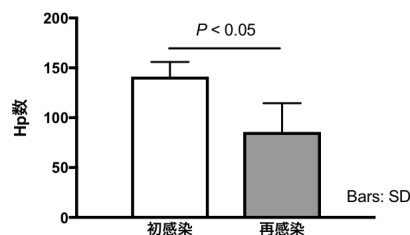


図 1-2 感染後 6 日の小腸筋層中の Hp 数

腸上部 1/6 に最も多く認め、再感染 Hp との差はこの分画に起因していた (図 1-3)。

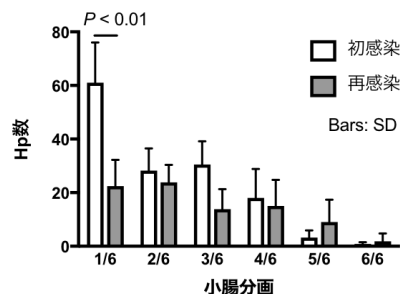


図 1-3 感染後 6 日の各小腸分画における筋層中の Hp 数

初感染を駆虫薬で終息させた後、4 週と 8 週に再感染をさせたところ、6 日の筋層内 Hp 数は 8 週でより少なかった (図 1-4)。

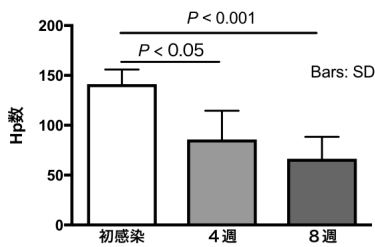


図1-4 感染後6日の小腸筋層中のHp数

これらのことから、1) 感染幼虫は小腸上部 1/6 を好んで侵入・発育すること、2) 再感染 Hp の感染防御は小腸上部 1/6 で侵入阻止という形でも発現していること、3) 侵入阻止は感染終息後長期間にわたって維持されていることが示唆された。

(2) 粘膜組織侵入阻止の Th2 免疫細胞依存性

免疫記憶は CD4 陽性 T 細胞に依存する。マウス CD4 に対する中和抗体処理によって、再感染 Hp の侵入阻止が解除された(図 2-1)。Interleukin(IL)-4 のシグナルは、

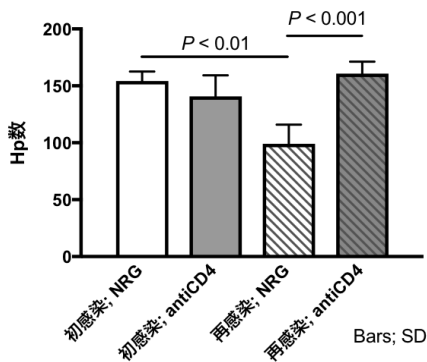


図2-1 感染後6日の小腸筋層中のHp

消化管寄生線虫の小腸からの排除に必須な Th2 免疫応答の発現に不可欠である (Finkelman & Urban, 2001)。IL-4 受容体を構成する α 鎖を遺伝的に欠失したマウスは Th2 免疫応答を発現しない。このマウスでは有意な再侵入の阻止を認めなかった (図 2-2)。再感染時の小腸腔からの Hp 成虫の排除は特異抗体に依存すると報告されている (McCoy et al. 2008) が、B 細胞を欠損することで抗体産生不全である μ MT

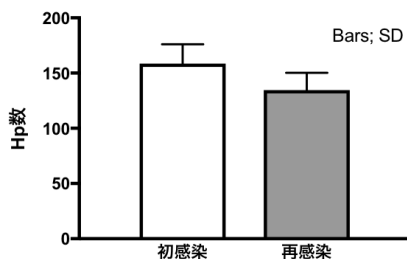


図2-2 感染後6日の小腸筋層中のHp数

マウスでは有意に再侵入を阻止した (図 2-3)。

以上のことから、再感染 Hp の小腸粘膜侵入阻止は Th2 免疫応答に依存している

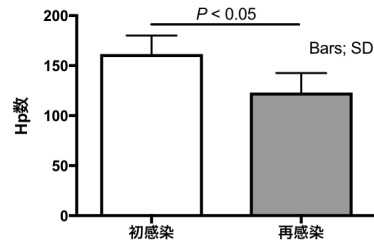


図2-3 感染後6日の小腸筋層中のHp数

ことが示唆された。

(3) 粘膜組織侵入阻止への M2 マクロファージおよびマスト細胞の関与

再感染直前の小腸上部 1/6 における RNA-seq の結果は、arginase-1 と mast cell protease の関与を示唆するものであった。小腸筋層で発育する Hp 周囲には細胞浸潤が起こり、後に結節としてしばらく残存する。結節内には M2 マクロファージおよびマスト細胞を認める。しかしながら、arginase-1 の阻害薬処置、マスト細胞を欠損した Wsh マウスあるいはジフテリア毒素によってマスト細胞のみ消失する MasTRECK マウスにおいて、いずれも Hp の再侵入阻止の解除は認めなかった。

(4) 感染早期の Hp 動態

経口投与された Hp の一部は一旦胃粘膜に侵入するという報告がある (Liu 1965; Sukhdeo et al. 1984)。Lewis & Bryant 1976 は、感染後 4 日以降の Hp の小腸組織内分布を丹念に調べ、早い段階で Hp が小腸上部に集まっていくことを報告している。彼らが用いた実体顕微鏡による観察では感染後 4 日以前の Hp の確認は困難である。そこで人工胃液で組織から分離した Hp を顕微鏡下で全て数える方法によって感染早期の Hp 動態を調べた。

Hp は、辿り着いた粘膜に一旦侵入するものの、小腸粘膜とくに上部 1/6 を好んで再侵入することが明らかとなった (図 4-1)。経口投与した際の液量が少ない場合は、

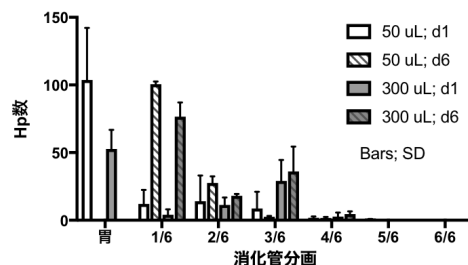


図4-1 投与液量の違いによるHpの分布動態

胃により多くの Hp が侵入するが、感染後 6 日には小腸上部 1/6 からの回収が最も多い。さらに胃から小腸上部 1/6 への移動は感染後 30 時間にはすでに始まり、同 48 時間には胃から Hp はほとんど回収されなかった。また、この小腸上部 1/6 への移動は、

組織内を移行するのではなく、一旦管腔に出てから再侵入することが強く示唆された。

過去に胃粘膜に侵入した Hp の報告がなされていたものの、組織学的な観察で定量性に欠くところから、これまで Hp の感染は幼虫が小腸粘膜に侵入してその部位の筋層で発育し、再び管腔に戻るといった認識であった。今回の結果は Hp の生活史を改め、さらに感染に対する宿主免疫応答を解析する上で重要な新知見である。

(5) 再感染 Hp の粘膜組織侵入に対する阻止の時期と部位

Hp の早期感染動態を明らかにした上で改めて再感染に対する阻止の時期と部位を調べた。

感染後 1 日の Hp の胃および小腸内分布および回収率は、初感染と再感染とでほとんど同一であった (図 5-1)。感染後 2 日

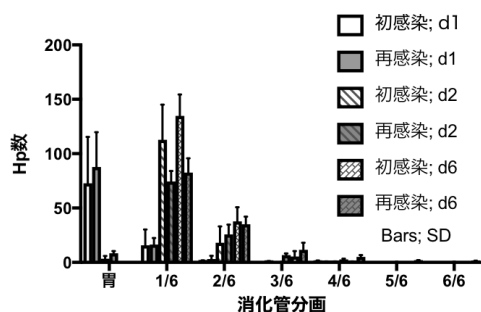


図 5-1 初感染および再感染後の Hp の分布動態

には両感染ともに胃からの Hp 回収はほとんどなく、小腸上部 1/6 から最も多く回収された。同 1/6 からの回収数は再感染で初感染よりも少なくなっていた。これは感染後 6 日に有意な差として現れた。

(6) 総括

本研究成果は以下の 3 点に要約される。

1) Hp の再感染防御には、これまで知られていた管腔からの成虫の排除の他にも一つ、感染幼虫による粘膜侵入に対する阻止が存在する。

2) 粘膜の再侵入阻止という再感染防御は、感染幼虫が一旦粘膜に侵入することで誘導され、Hp が小腸上部 1/6 に再侵入する際に発現すると予想される。これは、胃での免疫応答が小腸で発現することを示唆するものである。

3) 新たに見出された侵入阻止は、Th2 免疫応答に依存し、B 細胞や抗体、M2 マクロファージおよびマスト細胞に依存しないことが示唆された。

研究開始当初の予定から異なった結果となったが、それはこれまでの Hp の感染動態の認識に誤りがあったからである。今回見出した粘膜侵入に対する阻止は、IgE 高親和性受容体の一部である FcεRIα 鎖のノックアウトマウスで認めないという興味深い結果を得ており、その機序解明に向けて

引き続き解析中である。免疫記憶による自然免疫の抗原非特異的な粘膜バリアーの形成と維持は、1~2 日で発現される抗原特異的な粘膜バリアーの存在へと姿を変えたが、この防御機序の応用は依然として多方面に有用であると考えられる。

< 引用文献 >

Hasnain SZ et al, 2013. J Biochem Cell Biol, 45: 364-74

Finkelman FD & Urban, Jr JF, 2001. J Allergy Clin Immunol, 107: 772-80

McCoy et al, 2008. Cell Host & Microbe, 4: 362-73

Liu SK, 1965. Exp Parasitol, 16: 123-35

Sukhdeo MVK et al, 1984. J Helminthol, 58: 19-23

Lewis JW & Bryant V, 1976. J Helminthol, 50: 163-71

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Chinuki Y, Ishiwata K, Yamaji K, Takahashi H, Morita E. *Haemaphysalis longicornis* tick bites are a possible cause of red meat allergy in Japan. Allergy 査読有, 2016; 71: 421-5

Kiniwa T, Enomoto Y, Terazawa N, Omi A, Miyata N, Ishiwata K, Miyajima A. NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics. Proc Natl Acad Sci USA 査読有, 2016; 113: 10139-44

Osada Y, Fujiyama T, Kamimura N, Kaji T, Nakae S, Sudo K, Ishiwata K, Kanazawa T. Dual genetic absence of STAT6 and IL-10 does not abrogate anti-hyperglycemic effects of *Schistosoma mansoni* in streptozocin-treated diabetic mice. Exp Parasitol 査読有, 2017; 177: 1-12

Shimokawa C, Kanaya T, Hachisukka M, Ishiwata K, Hisaeda H, Kurashima Y, Kiyono H, Yoshimoto T, Kaisho T, Ohno H. Mast cells are crucial for induction of group 2 innate lymphoid cells and clearance of helminth infections. Immunity 査読有, 2017; 46: 863-74

Tsubokawa D, Ishiwata K, Goso Y, Nakamura T, Hatta T, Ishihara K, Kanuka H, Tsuji N. Interleukin-13/interleukin-4 receptor pathway is crucial for production of Sd^a-sialomucin in mouse small

intestinal mucosa by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Parasitol Int.* 査読有, 2017; 66: 731-34
Ohta T, Yoshikawa S, Tabakawa Y, Yamaji K, Ishiwata K, Shitara H, Taya C, Oh-hora M, Kawano Y, Miyake K, Yamanishi Y, Yonekawa H, Watanabe N, Kanuka H, Karasuyama H. Skin CD4+ memory T cells play an essential role in acquired anti-tick immunity through interleukin-3-mediated basophil recruitment to tick-feeding sites. *Front Immunol.* 査読有, 2017; 8: 1348
Kametani Y, Yamada Y, Takabayashi S, Kato H, Ishiwata K, Watanabe N, Sasaki E, Habu S. The response of common marmoset immunity against cedar pollen extract. *Biosci Trends* 査読有, 2018; 12: 94-101

〔学会発表〕(計7件)

石渡賢治、慢性性感染する消化管寄生虫に対する急性感染免疫応答の影響 第85回日本寄生虫学会大会 宮崎 2016
Ishiwata K, Effects of the host immune response against precedent infection on the establishment of successively infected gastrointestinal nematode. 16th International Congress of Immunology. Melbourne. 2016 Aug.
石渡賢治、消化管寄生線虫の再感染防御における腸管粘膜バリアー 第86回日本寄生虫学会大会 札幌 2017
石渡賢治、*Heligmosomoides polygyrus* の再感染防御における腸管粘膜バリアー 第11回蠕虫研究会 長崎 2017
石渡賢治、T cell-dependent long-lasting blockade of mucosal penetration by infective larvae of a murine gastrointestinal nematode 第46回日本免疫学会学術集会 仙台 2017
石渡賢治、Another protective immune response against *Heligmosomoides polygyrus* reinfection revealed by reviewing of the infection dynamics 第11回寄生虫感染免疫研究会 東京都 2018
石渡賢治、A new immune-mediated protective mechanism against reinfection of *Heligmosomoides polygyrus* clarified by re-examining its infection mode 第87回日本寄生虫学会大会 東京都 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://jikei-tropmed.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石渡 賢治 (ISHIWATA Kenji)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00241307

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

該当者なし