

平成21年 6月 2日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590427  
 研究課題名（和文）寄生虫由来免疫抑制因子の機能解析と関節リウマチモデルへの医学応用研究  
 研究課題名（英文）Functional analysis of an immunosuppressive factor secreted from a parasite and its application to rheumatoid arthritis model

研究代表者  
 福本 宗嗣 (FUKUMOTO SOJI)  
 鳥取大学・医学部・教授  
 研究者番号：60111126

研究成果の概要：マンソン裂頭条虫擬充尾虫（幼虫）由来の免疫抑制因子(ES90)のN末端と内部のアミノ酸配列に基づいてRT-PCR法でcDNAが増幅でき、クローニングの基礎試料が得られた。また、同じ幼虫由来の130 kDaの免疫抑制因子(ES130)を精製した。ES130は活性化マクロファージが産生する3つのケモカイン(RANTES, MIP-2, IP-10)の遺伝子発現を抑制し、炎症や免疫応答の抑制への関与が推察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：寄生虫、マンソン裂頭条虫、免疫抑制因子、マクロファージ、遺伝子発現抑制、ケモカイン

## 1. 研究開始当初の背景

マンソン裂頭条虫の擬充尾虫（幼虫）は、ヒトやマウスに感染するとその頭部のみが腸壁を穿通して、腹腔内に侵入する。この時、腸内細菌等が虫体表面に付着し、細菌由来の lipopolysaccharide (LPS) で腹腔マクロファージなどが活性化すると考えられるが、虫体周囲の炎症反応は弱く、幼虫は長期間いろいろの組織で寄生を続けることが可能である。我々は、これまでにこの幼虫の分泌物質

(ES) 中の免疫抑制因子について、下記のような特性を明らかにしてきた。

(1) LPS 活性化マウスマクロファージの TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2, 一酸化窒素合成酵素 (NOS) などの遺伝子発現を抑制し、その抑制の機序については、転写因子の NF- $\kappa$ B の核移行の抑制ではなく、MAP kinase の ERK および p38 MAPK のリン酸化阻害によることを見出した。

(2) LPS 活性化樹状細胞の IL-12 産生を抑制し、樹状細胞と共培養した CD4<sup>+</sup>T 細胞の IFN- $\gamma$  産生 (Th1 反応) を抑制することが明らかになった。また、LPS 非存在下では IL-4 の産生 (Th2 反応) を誘導しないが、LPS 存在下で IL-4 を誘導した。

(3) 幼虫の分泌物質 (ES) 中の免疫抑制因子を MonoQ カラムによるイオン交換クロマトグラフィと 2 種類のレクチンカラムを用いることによって 90 kDa の免疫抑制因子 (ES90) を精製し、この糖タンパクの N 末端と内部のアミノ酸配列の一部を決定した。そして、ES90 はマクロファージ細胞株 RAW264.7 の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現を抑制した。

(4) 骨髄細胞から RANKL の刺激で破骨細胞が誘導される。RANKL 刺激によるシグナル伝達経路はマクロファージ系細胞における LPS のシグナル伝達経路ときわめて類似している。ES はマクロファージの MAPK 経路を抑制する作用が確認されているが、MAPK 経路は破骨細胞形成にも重要である。仮説通り、ES および精製した ES90 は破骨細胞の形成をほぼ完全に阻害した。また、破骨細胞に特異的な酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) などの遺伝子発現も抑制した。

(5) 活性化 T 細胞を遊走させる IP-10 ケモカインは LPS 刺激したマクロファージでは TLR4 を介して、MyD88 非依存性経路で IFN- $\beta$  の産生を介して発現する。免疫抑制因子は LPS 刺激による IFN- $\beta$  の遺伝子発現を抑制し IP-10 の遺伝子発現も抑制した。また、IFN- $\gamma$  刺激による IP-10 の遺伝子発現も抑制され、luciferase assay の結果から、転写調節領域の ISRE の関与が推察された。

## 2. 研究の目的

マンソン裂頭条虫の幼虫由来の免疫抑制因子 (ES90) の N 末端と内部アミノ酸配列に基づく degenerate primer を作成し RT-PCR を行い、この免疫抑制因子の cDNA 断片 (probe) を作製する。そして、この probe を用いてマンソン裂頭条虫プレロセルコイド (幼虫) の cDNA ライブラリをスクリーニングし、この免疫抑制因子をクローニングする。また、ヒトにおけるホモログの有無を検索

する。

免疫抑制因子 (ES90) の組換えタンパク質を作製・精製し、LPS 活性化マクロファージの NO 産生や TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  などの遺伝子発現の抑制作用について検討する。

遺伝子発現量の変化をマイクロアレイで評価する。組み換えタンパクの破骨細胞形成阻害作用、関節リウマチモデル (CIA) への影響について検討する。

また、マンソン裂頭条虫の幼虫由来の免疫抑制因子を再精製し、マクロファージのケモカインの遺伝子発現やケモカイン産生に及ぼす影響について検討する。

## 3. 研究の方法

マンソン裂頭条虫擬充尾虫 (幼虫) が分泌する免疫抑制因子の今までの精製実験によって、精製のための条件設定が確立し、90 kDa の免疫抑制因子 (ES90) については、N 末端と内部のアミノ酸配列を決定している。そして、このアミノ酸配列から推定される塩基配列を基に PCR primer を作成し、この幼虫の RNA を RT-PCR で増幅し、cDNA バンドの検出を試みる。

遺伝子組み換えタンパクが作成できれば、*in vitro* で骨髄細胞からの破骨細胞形成に及ぼす影響やコラーゲンタイプ II の投与による関節リウマチモデルに対する効果を検討する。

マンソン裂頭条虫擬充尾虫 (幼虫) が分泌する免疫抑制因子をマクロファージに添加し、RANTES (CCL5)、MIP-2 (CXCL2)、IP-10 (CXCL10) の遺伝子発現およびケモカイン産生に及ぼす影響について検討する。

## 4. 研究成果

(1) マンソン裂頭条虫の幼虫由来の免疫抑制因子 (ES90) の N 末端と内部アミノ酸配列に基づいて種々の degenerate primer を作成し RT-PCR を行った。当初は、17 mer の primer で行ったが、明瞭な cDNA バンドが得られなかった。最近、1 アミノ酸に 4 種類の塩基が該当する個所に、イノシンを挿入し組合せを減少させ、プライマーの塩基数を sense primer 29 mer, antisense primer 23 mer と長くすることによって cDNA バンドがえられた。今後、これの塩基配列の情報をもとに

5´ RACE 法及び 3´ RACE 法によって全長の cDNA をクローニングし、全長または一部を大腸菌またはコムギ胚芽無細胞系を用いて、遺伝子組み換えタンパクを作成し、その免疫抑制活性を検討する予定である。

(2)免疫抑制因子 ES130 の精製とマクロファージのケモカイン遺伝子の発現抑制作用

①免疫抑制因子 ES130 の精製 (図 1)

寄生虫の分泌物 (ES) をイオン交換クロマトグラフィー (0.1 から 0.5 M NaCl で溶出) で分画した後、各分画試料の nitrite 産生抑制活性を検討したところ、0.3 M NaCl が最も nitrite 産生を抑制した。

図 1 の lane1 はマーカーを、lane 2 は未精製分泌物 (crude ES) を、lane 3 はイオン交換クロマトグラフィーの 0.3 M NaCl 分画、lane 4 はレクチンカラム RCA120 および WGA で溶出、精製したものである。それぞれを SDS-PAGE で電気泳動し、ポリアクリルアミドゲルを ruby 染色した。Crude ES をイオン交換クロマトグラフィーと 2 種類のレクチンカラムで溶出し、130 kDa のバンドを得ることができた (ES130)。

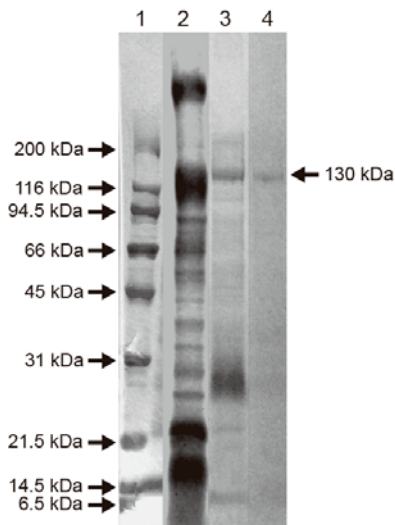


図 1. マンソン裂頭条虫擬充尾虫由来の免疫抑制因子 (ES130). SDS-PAGE.

②LPS 刺激 3 時間後のケモカイン遺伝子発現の抑制

crude ES と ES130 を添加した腹腔マクロファージを LPS で刺激して 3 時間後のケモカイン遺伝子の発現を検討した (図 2A, B)。RANTES は crude ES でも ES130 でも濃度に依存して遺伝子の発現が抑制された。ES130 を 50 ng/mL 添加したときの抑制率は 55%であった。

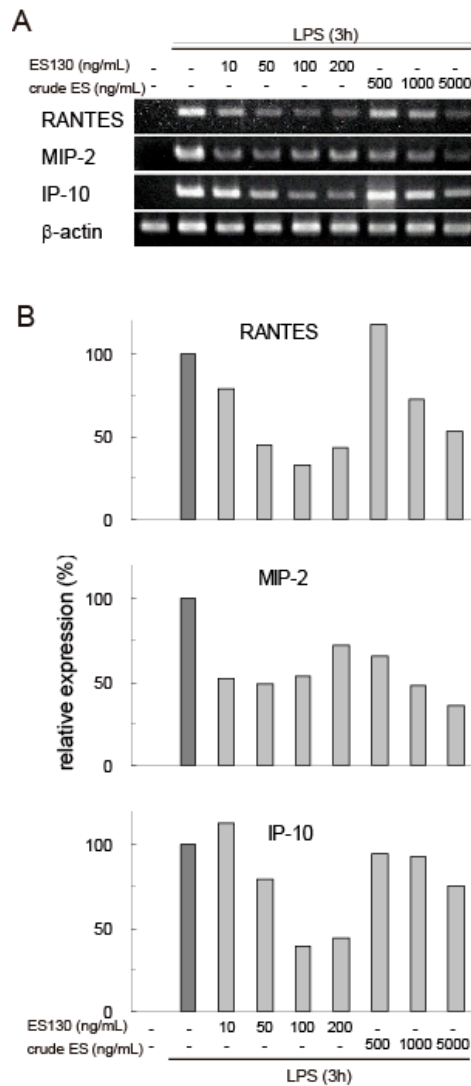


図 2. 免疫抑制因子 ES130 による LPS 活性化マウス腹腔マクロファージのケモカイン遺伝子の発現抑制 (A) semi-quantitative RT-PCR (B) ES130 を添加しないコントロールに対する相対的な発現レベル (%)

しかし、それ以上の濃度ではほとんど抑制率は変わらなかった。crude ES は 500 ng/mL では抑制されないが、1000 ng/mL では抑制率 27%であり、5000 ng/mL 添加では 47%の抑制率であった。

ES130 の 10 ng/mL 添加での MIP-2 の遺伝子発現は 52%の抑制率で、それ以上の濃度でもほぼ同様の抑制率であった。crude ES 添加では濃度依存に抑制された。

IP-10 は ES130 の濃度依存に抑制された。ES130 の 100 ng/mL 濃度の添加で 61%抑制された。

③ LPS 刺激 8 時間後および 24 時間後のケモカイン遺伝子発現の抑制 (図 3)

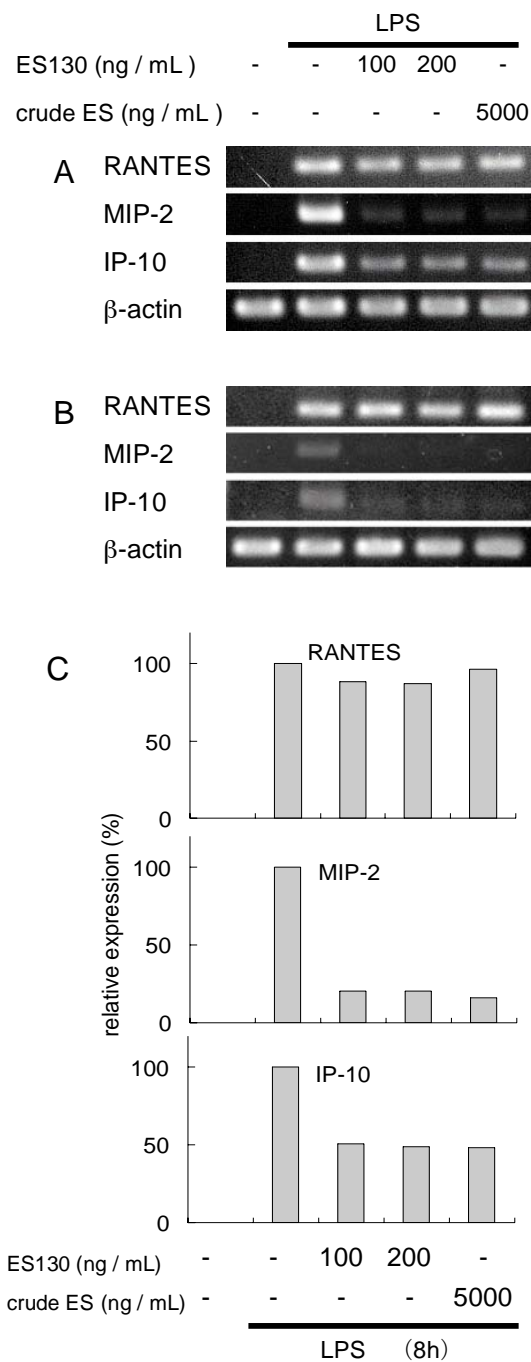


図 3. LPS 活性化腹腔マクロファージのケモカイン遺伝子発現に対する crude ES および ES130 の抑制効果. LPS 刺激 8 時間後(A)および 24 時間後(B)のケモカイン遺伝子発現の抑制. (C) . LPS 刺激 8 時間後の ES 非添加群 (コントロール) に対する相対的発現率 (抑制効果)

RANTES の遺伝子発現は LPS 刺激 8 時間後, 24 時間後ともにほとんど抑制しなかった。

MIP-2 は 8 時間後には ES130 の 100 ng/mL または crude ES によって約 80%抑制された。IP-10 は ES130 と crude ES のいずれの添加でも約 50%の抑制が認められた。24 時間後には MIP-2 と IP-10 のいずれも LPS 刺激による遺伝子発現が低かったが, ES130 および crude ES によって発現抑制が認められた。

④ 免疫抑制因子 ES130 によるマクロファージのケモカイン産生抑制 (図 4)

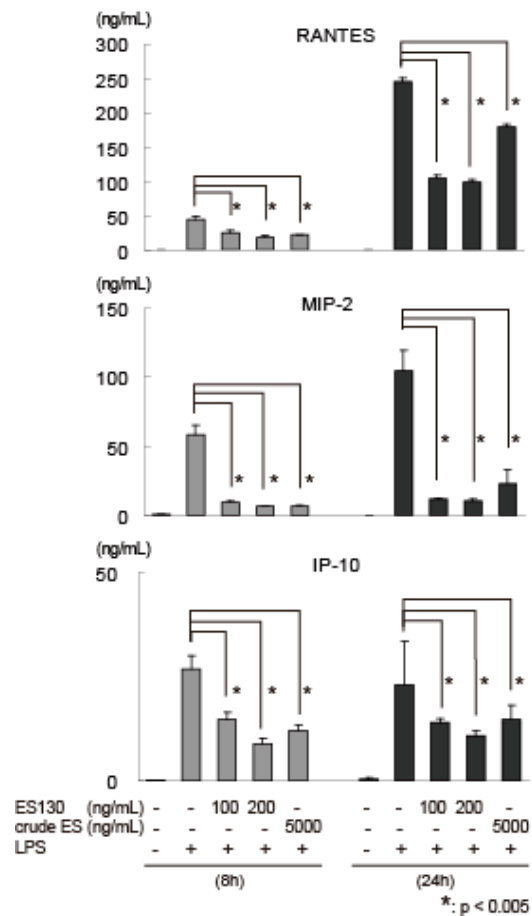


図 4. 免疫抑制因子 ES130 および crude ES による LPS 活性化マクロファージのケモカイン産生抑制 (LPS 刺激 8 時間後と 24 時間後の培養液中のケモカインを ELISA で測定)

LPS 刺激したマクロファージでの RANTES の遺伝子発現は, 8 時間後, 24 時間後ではほとんど抑制されないが, ELISA で測定したマクロファージ培養液中の RANTES の濃度は LPS 刺激 8 時間後と 24 時間後のそれぞれのコントロールと比較して有意に抑制されていた。

MIP-2 は, 8 時間後, コントロールと比較

して ES130 100 ng/mL 添加では 83%抑制された。24 時間後もコントロールと比較して ES130 では 90%, crude ES では 78%の抑制が認められた。

LPS 刺激したマクロファージ培養液中の IP-10 濃度は、8 時間後ではコントロールと比較して ES 200 ng/mL 添加群では 67%抑制していた。8 時間後、24 時間後とも濃度はほとんど変化せず、8 時間から 24 時間の間には IP-10 はほとんど産生の増加はなかった。

⑤ まとめ：免疫抑制因子 ES130 は、100 ng/mL の濃度で RANTES、MIP-2、IP-10 の 3 ケモカインの産生を異なる機序で抑制した。これらの結果から、マンソン裂頭条虫擬充尾虫の感染局所では、好酸球、好中球、単球、ヘルパー T 細胞 (1 型) などの遊走が阻害され、炎症や免疫応答が抑制されていることが示唆された。

## 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 1 件)

①Haruyo Matsuura, Asumi Tomioku, Satoko Kono, Sayuri Tademoto and Soji Fukumoto,  
Suppression of chemokine gene expression and production in LPS-stimulated macrophages by a 130 kDa glycoprotein from plerocercoids of *Spirometra erinaceieuropaei*  
Yonago Acta medica, 巻 52, p37-46, 2009、  
査読有

[学会発表] (計 1 件)

①松浦治代、富奥あすみ、廣野聡子、蓼本早百合、福本宗嗣：マンソン裂頭条虫擬充尾虫分泌因子によるマクロファージのケモカイン遺伝子発現の抑制、第 63 回日本寄生虫学会西日本支部大会、2007 年 10 月 7 日、高知県医師会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福本 宗嗣 (FUKUMOTO SOJI)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：60111126

### (2) 研究分担者

入子 英幸 (IRIKO HIDEYUKI)  
鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：60346674

(3) 連携研究者  
なし