

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07529

研究課題名(和文) 寄生蠕虫によるTh17型免疫疾患抑制機構の普遍性と特殊性の解析

研究課題名(英文) Universality and peculiarity of underlying mechanisms of parasitic helminth-induced suppression of Th17-mediated immune diseases

研究代表者

長田 良雄 (Osada, Yoshio)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：80282515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では関節リウマチのモデルであるコラーゲン関節炎(CIA)の抑制効果のあるマンスン住血吸虫(Sm)、旋毛虫(Ts)、ネズミマラリア原虫P.yoelii17XNL(Py)の抑制機序の比較検討を行った。SmとTsはいずれもCIAにおいて抗型コラーゲン(C)IgG抗体の産生を抑制したが、Tsと異なりSmは他の機序が関節炎抑制により重要であることが示唆された。Tsに比べSmはより強く好酸球増多を誘導しかつIL-5KOマウスでCIA抑制効果が減弱したことから、好酸球が抑制に関与している可能性が示された。Pyは原虫血症依存的にCIAを抑制し、炎症性サイトカイン産生も抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌や寄生虫など感染性微生物への適度な暴露がアレルギー疾患や自己免疫疾患などを予防しているという仮説(衛生仮説または旧友仮説)が知られている。本研究では種々の寄生虫を用いて実験的にそのメカニズムを解明しようとしたもので、寄生虫ごとにメカニズムが全く異なる場合が多いことを明らかにした。本成果は、寄生虫を利用した難治性免疫疾患治療法開発に向けての基礎的知見の蓄積に貢献するものであると考えている。

研究成果の概要(英文)：Herein, we performed comparative studies of anti-arthritic mechanisms of *Schistosoma mansoni*(Sm), *Trichinella spiralis*(Ts) and *Plasmodium yoelii* 17XNL(Py) in a rheumatoid arthritis model: collagen-induced arthritis(CIA). (1) Both Sm and Ts impaired anti-type collagen (C) IgG production, but unlike Ts, Sm seemed to protect mice from CIA by other mechanisms than the impairment of antibody production. (2) Remarkable eosinophilia by Sm infection in wild-type mice and loss of eosinophilia accompanied by weakened anti-arthritic effects of Sm in IL-5KO mice suggest that eosinophils may be involved in the anti-arthritic effects of Sm. (3) Py prevented CIA with reduced production of pro-inflammatory cytokines in a parasitemia-dependent manner.

研究分野：寄生虫学

キーワード：寄生虫 免疫修飾 住血吸虫 旋毛虫 マラリア原虫 Th17 Th2 関節炎

1. 研究開始当初の背景

近年、先進諸国において特定のアレルギー疾患あるいは自己免疫疾患の増加が報告されている。その原因の一つの有力な仮説が「衛生仮説」である。これは「衛生状態の向上に伴う細菌/寄生虫感染症の減少によってヒト本来の免疫システムが変調し免疫疾患が増加する」という説である。細菌に比べ寄生虫はより複雑な体制をもち多様な免疫回避・免疫修飾機構をもつので、衛生仮説の面から極めて興味深い対象である。実際に寄生虫感染によってアレルギー疾患や自己免疫疾患の発症が抑制されるという実験的研究が数多く報告されている。我々も過去の研究において、マンスン住血吸虫 (Sm) 感染によりコラーゲン関節炎 (CIA) や IL-1 受容体アンタゴニスト K0 マウスの自然発症関節炎が抑制されること (参考文献 1,3,5) Sm や腸管寄生線虫の一種 (*H. polygyrus*) の感染により薬剤誘発性の 1 型糖尿病 (T1D) が抑制されること (参考文献 2,4) などを明らかにしてきた。

蠕虫感染に特徴的な免疫学的変化は Th2 細胞、M2 マクロファージの誘導とそれに基づく IL-4/IL-5 の産生である。また寄生虫全般に関していえば Tr1, Treg, Breg などその他の免疫調節性細胞の誘導や IL-10, TGF- β の産生などが挙げられる。これら多様な免疫修飾の中でどの変化が疾患抑制に本質的に重要であるかは、抗体による中和実験や K0 マウスを使った実験により数多くの研究報告がなされてきたが、その多くは単一の寄生虫を用いた報告であり、そこで解明された疾患抑制機構の寄生虫間での普遍性と特殊性は必ずしも明確ではない。

2. 研究の目的

本研究では、複数の寄生蠕虫 (肝蛭・マンスン住血吸虫・旋毛虫など) による Th17 型免疫疾患 (CIA) 抑制機構の比較を行い、さらに原虫感染についても同様の機構も検討することにより、寄生虫間における抑制機構の共通点と相違点を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 肝蛭による CIA 抑制作用の検討

肝蛭はマウスにおいては体内移行の途中で宿主の臓器に大きな傷害を与えて死亡させてしまう。そのため感染時期を遅めに設定し、「体内移行期の幼虫が宿主を死なせる前に CIA を抑制するか否か」について検討した。ウシ型コラーゲン (C) 200 μ g を完全フロイントアジュバント (CFA) とのエマルジョンとして雄性 DBA/1 マウスの尾根部近くの皮内に免疫した。免疫後 1~3 週に日本産肝蛭メタセルカリア 5~10 隻を経口感染させ、関節炎症状について感染群と非感染群を比較した。

(2) マンスン住血吸虫 (Sm) や旋毛虫 (Ts) による CIA 抑制作用における液性免疫抑制の関与の検討

以前の研究により、Sm・Ts とともに野生型 (WT) マウスでは CIA を抑制すること、また Sm は Th2 応答に障害のある STAT6KO マウスでは CIA を悪化させる (参考文献 1) が Ts は同 KO マウスにおいても CIA を抑制することがわかっている。このことから両者は全く異なる関節炎抑制機構を持っていることが推察された。その機序を解明する研究の一環として、両者の「抗体産生抑制作用」が「関節炎抑制現象」に対してどの程度寄与しているか、相関分析により検討した。CIA を誘発する 3 週前に Sm セルカリア 60 隻を経口感染 (Sm 群) あるいは 2 週前に Ts 筋肉幼虫 200 隻を経口感染 (Ts 群) した。本実験においては関節炎強度を連続変数としなければならないため、関節炎による四肢の厚みの変化 (thickness、単位 mm) を指標として用いた。4 週後から週 1 回尾静脈よりヘパリン採血し、血漿中の抗 C 抗体 (IgG/IgG1/IgG2a/IgG2b) を ELISA で測定した。その際、過去に採取した C 免疫血清を標準 (1.0 U/mL) として希釈系列の標準曲線を作りサンプルの抗体価を U/mL に換算することにより、実際に含まれる抗体量との線形性を確保した。Pearson の相関係数を用いて各個体の関節炎強度と抗体価の相関を感染群ごとに評価した。

(3) Sm や Ts による CIA 抑制作用における好酸球の関与の検討

一般的に蠕虫感染では Th2 が優位になり好酸球増多が誘導される。好酸球には免疫調節作用があり関節炎に対する抑制効果も知られている。寄生虫による CIA 抑制作用に好酸球が関与している可能性を調べるため IL-5KO マウスを用いて、また好酸球の誘導に 2 型自然リンパ球 (ILC-2) が関与している可能性を検証するため IL-33KO マウスを用いて Sm, Ts の CIA 抑制効果を検討した。CIA 誘発 8 週目にマウスを安楽死させ、抗 CD3 刺激下にて脾細胞の培養を行い、上清中のサイトカインを ELISA で測定した。脾臓の好酸球数は Flow cytometry で解析した。

(4) 非致死性ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17X による CIA 抑制作用の検討

蠕虫感染・原虫感染に共通して誘導される免疫抑制因子 (Treg や IL-10) は関節炎に対する抑制効果を持つことが知られているので、原虫感染も CIA を抑制する可能性がある。当初計画には原虫は含まれていなかったが、研究目的にかなうと判断し非致死性のマラリア感染がマウス CIA を抑制する可能性について検証した。CIA 誘発 1 週後または 4 週後に *Plasmodium yoelii* 17X (以下、Py) 感染マウス赤血球 1×10^5 個を腹腔内投与し、関節炎の進行を非感染群と比較した。CIA 誘発 8 週目にマウスを安楽死させ、抗 CD3 刺激下にて脾細胞の培養を行い、上清中のサイトカインを ELISA で測定した。また血清中の抗 C 抗体を ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1) 肝蛭による CIA 抑制作用の検討

予備検討においては肝蛭の CIA 抑制作用が観察されたが、その後条件を少しずつ変えながら実験を繰

り返しても再現性をもって関節炎を抑制できる条件が確立できなかったため、本実験は中断とした。

(2) マンソン住血吸虫 (Sm) や旋毛虫 (Ts) による CIA 抑制作用における液性免疫抑制の関与の検討

Sm・Ts 共に CIA による四肢の腫脹を有意に抑制した。Sm 群では観察期間 (免疫後 10 週) ずっと抑制効果がみられたが、Ts 群では抑制効果が次第に減弱し 8 週以降は非感染群と関節炎強度に差がなくなった (図 1)。一方、Sm、Ts 両群とも抗 C 抗体産生抑制作用は免疫後 10 週まで持続した (図 2)。

図 1

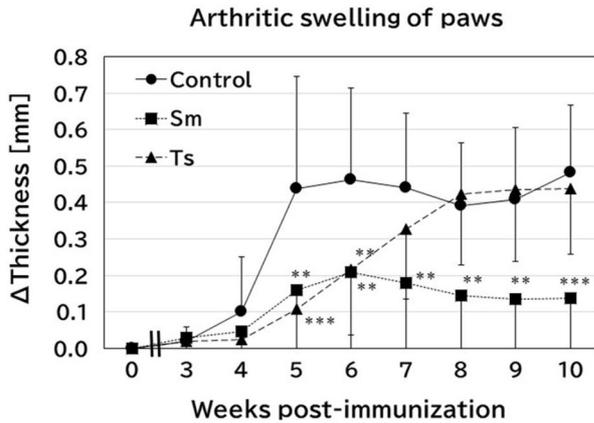
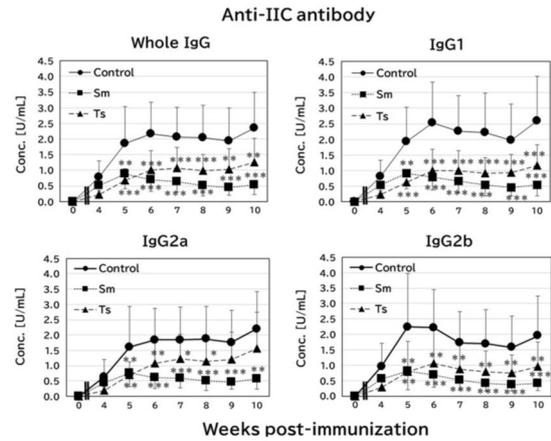


図 2



仮にある寄生虫が主に「抗体産生抑制」によって関節炎症状 (四肢腫脹) を抑制しているとする、その寄生虫の感染マウスでは四肢腫脹における抗体の寄与は少なくなり、両者の間の相関係数は低下するはずである。この前提を踏まえて関節炎強度と抗体価の相関をみてみると、Sm 群では非感染 (Control) 群より高くなる傾向、Ts 群では非感染群より低くなる傾向を示している (図 3) ので、Sm 群では抗体の寄与率は非感染群に比して相対的に大きくなり、Ts 群では相対的に小さくなっていることになる。

図 3

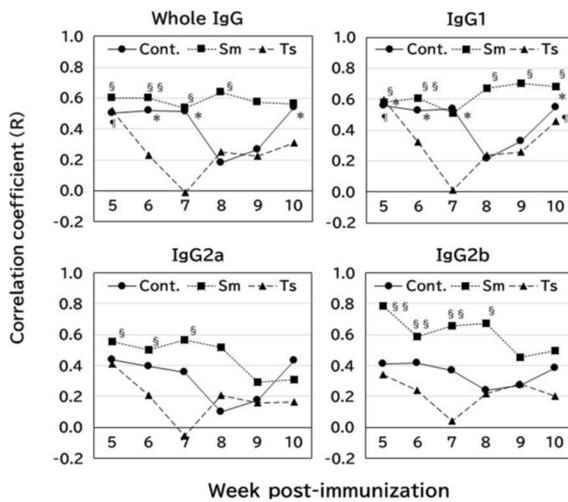


図 4

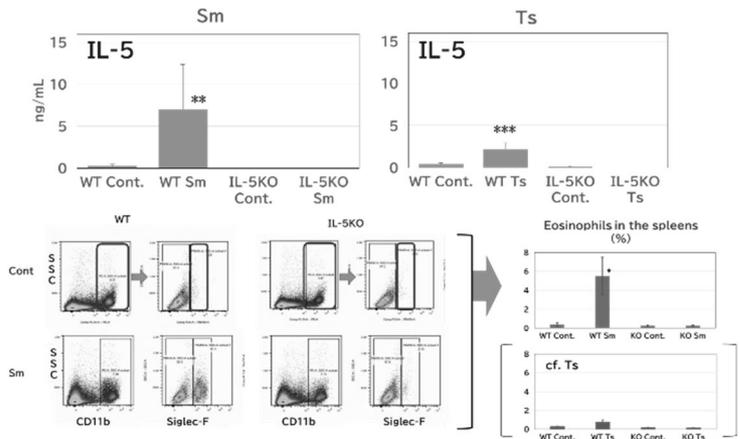
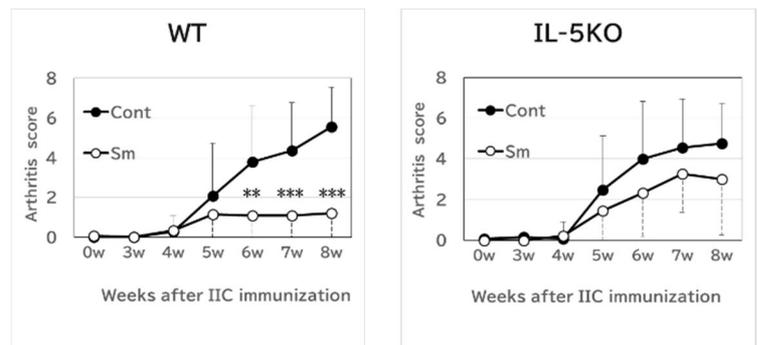


図 5

これ以前の研究により Sm は IL-17 などの炎症性サイトカインの産生を抑制すること (参考文献 1, 3, 5) Ts は炎症性サイトカイン産生抑制をあまり起こさないことがわかっている。この事実を相関係数の変化と考えあわせると、Sm は主に IgG 以外の関節炎促進因子 (炎症性サイトカインなど) を抑制することによって、また Ts は主に IgG 産生を抑制することによって CIA 症状 (四肢腫脹) を抑制しているのではないかと考えられた。



(3) Sm や Ts による CIA 抑制作用における好酸球の関与の検討

Sm 感染 WT マウスの脾臓では、Ts 感染 WT マウスに比して顕著な IL-5 産生と好酸球増多が観察された

(図4) これに対し IL-5KO マウスでは Sm による好酸球増多は観察されず、CIA 抑制作用は WT マウスの場合に比べ減弱していた(図5)。このことから Sm の関節炎抑制作用における好酸球の関与の可能性が推察された。IL-33KO マウスでは好酸球増多と関節炎抑制のどちらも WT マウスと同等であり、Sm 感染による好酸球増多に ILC-2 は必須ではないと考えられた(図は省略)。

(4) 非致死性ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* 17X による CIA 抑制作用の検討

C 免疫 4 週後の Py 感染により CIA 症状は有意に抑制されたが、免疫 1 週後の感染では抑制されなかった(図は省略)。後者の場合は発症時期に既に原虫血症(parasitemia)がほぼ消失していたことから、Py による CIA 抑制のためには関節炎発症時期における血中の原虫の存在が必要である可能性が示唆された。また Py 感染により T 細胞刺激下の IL-17/TNF- α /IFN- γ の産生が低下・IL-10 産生が亢進しており、血清抗 C 抗体価も低下していた(図は省略)。これらの事実から、マラリア原虫感染によっても炎症性サイトカインや抗 C 抗体の産生が抑制され CIA の症状が抑制されることが判った。

(まとめ)

本研究では、寄生虫間における Th17 型免疫疾患抑制機構の共通点と相違点を明らかにすることを目指した。検討した寄生虫において観察された共通点としては、液性免疫(抗 C 抗体産生)の抑制が挙げられる。しかしながらこの作用が関節炎抑制に寄与している程度は、Sm では小さく Ts では大きいことが示唆された。

抑制機構の相違点としては、Sm では(Ts とは異なり)関節炎抑制機構への好酸球の関与の可能性が考えられた。しかしながら IL-5KO マウスでは STAT6KO マウスの様に Sm 感染により CIA が増悪する(参考文献1)までには至らなかったため、IL-4/IL-13 を介した関節炎抑制機構は好酸球だけでは説明できず、他の機序も関与していると考えられる。

またマラリア原虫を用いた実験から、原虫感染も CIA を抑制することが分かった。T 細胞刺激時における炎症性サイトカイン(IL-17, TNF- α)産生抑制、抗炎症性サイトカイン(IL-10)産生亢進も蠕虫(Sm)と同じように観察されたので、多くの原虫も自己免疫性関節炎抑制作用を持っている可能性があり、今後の検討の余地がある。しかしながら、このような IL-10 産生亢進が CIA の抑制に必須か否かについてはまだ不明であり、今後の詳しい検討が必要である。

参考文献

1. Osada Y, Horie Y, Nakae S, Sudo K, Kanazawa T. STAT6 and IL-10 are required for the anti-arthritic effects of *Schistosoma mansoni* via different mechanisms. Clin Exp Immunol. 2019 Jan;195(1):109-120. doi: 10.1111/cei.13214.
2. 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 streptozotocin-treated diabetic mice. Exp Parasitol. 2017 Jun;177:1-12. doi: 10.1016/j.exppara.2017.03.008.
3. Osada Y, Yamada S, Nakae S, Sudo K, Kanazawa T. Reciprocal effects of *Schistosoma mansoni* infection on spontaneous autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. Parasitol Int. 2015 Feb;64(1):13-7. doi: 10.1016/j.parint.2014.09.001.
4. Osada Y, Yamada S, Nabeshima A, Yamagishi Y, Ishiwata K, Nakae S, Sudo K, Kanazawa T. *Heligmosomoides polygyrus* infection reduces severity of type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin in mice via STAT6- and IL-10-independent mechanisms. Exp Parasitol. 2013 Oct;135(2):388-96. doi: 10.1016/j.exppara.2013.08.003.
5. Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. Int J Parasitol. 2009 Mar;39(4):457-64. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.007.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osada Yoshio, Shimizu Shoichi, Morita Kentaro, Gaballah Eman M., Wu Zhiliang, Maekawa Yoichi	4. 巻 261
2. 論文標題 Helminth-induced impairment of humoral immunity differently contribute to their anti-arthritic effects in mice: Comparison of Schistosoma mansoni and Trichinella spiralis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Parasitology	6. 最初と最後の頁 108752 ~ 108752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exppara.2024.108752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gaballah Eman M., Morita Kentaro, Shimizu Shoichi, Elhenawy Abeer A., Nabih Nairmen, Elsayew Aliaa M., Abdel Mageed Salama A., Osada Yoshio	4. 巻 44
2. 論文標題 Non lethal rodent malarial infection prevents collagen induced arthritis in mice via anti arthritic immunomodulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasite Immunology	6. 最初と最後の頁 e12901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pim.12901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Osada Yoshio, Morita Kentaro, Tahara Sayaka, Ishihara Tsubasa, Wu Zhiliang, Nagano Isao, Maekawa Yoichi, Nakae Susumu, Sudo Katsuko, Kanazawa Tamotsu	4. 巻 42
2. 論文標題 Th2 signals are not essential for the anti arthritic effects of Trichinella spiralis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasite Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pim.12677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長田良雄、森田健太郎、清水少一
2. 発表標題 マンソン住血吸虫による関節炎抑制における好酸球の役割
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yoshio Osada, Kentaro Morita, Shoichi Shimizu
2. 発表標題 Schistosoma mansoni alleviates collagen-induced arthritis in an IL-5 dependent manner
3. 学会等名 第52回日本免疫学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長田良雄、岡田峻、森田健太郎、清水少一
2. 発表標題 住血吸虫の抗関節炎効果における好酸球やILC2の役割
3. 学会等名 第93回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森田健太郎、清水少一、長田良雄
2. 発表標題 Mesocostoides vogaeの関節炎抑制作用はSTAT6に依存しない
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 近藤皓文、進純子、清水少一、森田健太郎、長田良雄
2. 発表標題 卵白アルブミン誘発気道炎症に対するネズミマラリア原虫感染の影響
3. 学会等名 第74回日本寄生虫学会南日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田良雄、清水少一、森田健太郎
2. 発表標題 寄生蠕虫による液性免疫抑制と抗関節炎効果の関連
3. 学会等名 第74回日本寄生虫学会南日本支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長田良雄、清水少一、森田健太郎
2. 発表標題 寄生蠕虫による液性免疫抑制は抗関節炎効果に寄与しているか？
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長田良雄、清水少一、森田健太郎
2. 発表標題 Does the parasitic helminth-induced impairment of humoral immunity contribute to their anti-arthritic effects?
3. 学会等名 第15回寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森田健太郎、清水少一、長田良雄
2. 発表標題 ネズミ中殖糸虫 <i>Mesocestoides vogael</i> はマウスコラーゲン関節炎を抑制する
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会 / 第32回日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gaballah Eman、森田健太郎、清水少一、長田良雄
2. 発表標題 マラリア感染はマウスコラーゲン関節炎を抑制する
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会/第32回日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長田良雄、渡邊慧、関まどか、金澤保
2. 発表標題 肝蛭のマウスコラーゲン関節炎に対する影響
3. 学会等名 第89回 日本寄生虫学会大会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
エジプト	Mansoura University	Damietta University	