

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21534

研究課題名(和文)皮膚マダニ感染における2型自然リンパ球のエピジェネティックメモリー

研究課題名(英文)Epigenetic memory of ILC2 in skin tick infection.

研究代表者

小林 哲郎(KOBAYASHI, TETSURO)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：60624236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は皮膚マダニ寄生における宿主免疫反応、特に2型免疫による反応の形成、免疫記憶の成立機構を理解することでアレルギーの病態機構解明に向けた新しい道筋を作ることが目的とした。マダニの2次寄生時には好塩基球、好酸球および好中球の顕著な浸潤を認め、リンパ球欠損マウス、自然リンパ球欠損マウスのいずれでも免疫細胞浸潤がほとんど起こらず、免疫記憶の成立は獲得免疫系のリンパ球に依存することがわかった。db1GATAマウスおよび1133-/-マウスではマダニの2次寄生時に好中球の増加を認め、好酸球の欠損によってなんらかの抑制機構が失われ、好中球が増加した可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マダニ抵抗性の免疫記憶の成立には獲得免疫が必須であることがわかり、自然免疫系のエピジェネティックな変化を基盤とした訓練免疫の関与を示す系の確立には至らなかった。自然免疫の記憶の成立機構の解明には新たなモデルの検討が必要であると考えられる。一方でマダニ寄生モデルは好塩基球や好酸球などの2型免疫細胞の顕著な浸潤を起こすことから皮膚における2型免疫反応の動態を解析する有用なモデルの一つとして新たな知見を得られる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to understand the host immune response to cutaneous tick parasitism, particularly the formation of the response by type 2 immunity and the mechanism of establishment of immune memory, and to create a new pathway toward understanding the pathomechanism of allergy. The results showed that the establishment of immune memory is dependent on lymphocytes of the acquired immune system. Eosinophil-deficient mice showed an increase in neutrophils at the time of secondary tick parasitism, suggesting that the loss of eosinophils may have resulted in the loss of some inhibitory mechanism and an increase in neutrophils.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫記憶 マダニ 自然リンパ球

## 1. 研究開始当初の背景

皮膚外部寄生虫感染とアトピー性皮膚炎はともに 2 型免疫反応を主体とし、寄生虫感染の減少に伴いアレルギー患者が急増したという通説があることからわかるように、その臨床的、免疫学的類似点が古くから知られている。寛解と増悪を繰り返すアトピー性皮膚炎は再燃化が治療上の大きな問題であり、その機序は免疫細胞による記憶が関わることが示唆されているものの未だ全容は明らかではない。アトピー性皮膚炎の病態は T 細胞による抗原特異的な免疫反応を中心に研究されてきたが、自然リンパ球は、組織由来の因子によって抗原非特異的に活性化し IL-5 や IL-13 などの 2 型サイトカインを多量に産生することで寄生虫感染防御やアレルギーの病態に深く関わる。

近年、自然免疫細胞においてもエピジェネティックなリプログラミングを介して長期にわたる遺伝子発現の変化が起き、感染症の抵抗性に関わることが報告され、これが自然免疫系の“記憶”機能ではないかと考えられ始めている。自然リンパ球の本来の生理的な役割が寄生虫感染防御であることをふまえ、自然リンパ球の免疫記憶は寄生虫の再感染に対して抵抗性を高めるための機構であると考えた。そして、寄生虫感染がほぼ撲滅された先進国では、この寄生虫感染防御のために進化したエピジェネティックメモリーが負の方向に働き、アトピー性皮膚炎の再燃化メカニズムとして働いているのではないかという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究は皮膚マダニ寄生における宿主免疫反応、特に 2 型免疫による反応の形成、免疫記憶の成立機構を理解することでアレルギーの病態機構解明に向けた新しい道筋を作る。

具体的に以下の事項に取り組んだ。

- (1) フタトゲチマダニ皮膚寄生モデルの確立
- (2) マダニ寄生によって誘導される免疫反応の解明
- (3) 免疫記憶形成に関わる責任細胞の同定

## 3. 研究の方法

- (1) フタトゲチマダニ皮膚寄生モデルの確立

既報を参考にし、寄生させる幼ダニの逃避を防止するためにプラスチックのチューブをマウスの側腹部に設置し、フタトゲチマダニの幼ダニ 50 匹を寄生させた。二次寄生させる場合は、2 週間後に反対側の腹部に寄生を行った。寄生から数日後にチューブ内の飽血したマダニを回収し重量を測定する。さらに皮膚を組織学解析と細胞分離によるフローサイトメトリーの解析に用いた。

- (2) マダニ寄生によって誘導される免疫反応の解明

マダニ寄生によって 2 型免疫反応が誘導されることが知られている。そこで特に 2 型免疫反応に関わる免疫細胞を中心に解析を行った。寄生部位の皮膚を HE 染色および凍結切片による免疫染色によって組織学的に解析する。さらに Liberase 処理によって細胞を分離しフローサイトメトリーによる免疫細胞の詳細な解析を行う。

- (3) 免疫記憶形成に関わる責任細胞の同定

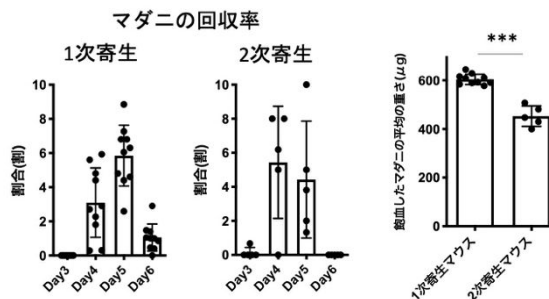
フタトゲチマダニの寄生モデルでは二次寄生の際に顕著な炎症反応が起こり、宿主のマダニ抵抗性が誘導されることが知られている。そこでこの免疫記憶の形成に関わる責任細胞およびメカニズムの解明を目的に各種ノックアウトマウスにマダニを寄生させ炎症反応およびマダニ抵抗性の評価を行った。

## 4. 研究成果

- (1) フタトゲチマダニ皮膚寄生モデルの確立

1 次寄生においてはほとんどのマダニは 24 時間以内に寄生し、飽血により 4 日目から脱落を開始し、脱落のピークは 5 日目だった。一方で 2 次寄生時のマダニ脱落のピークは 4 日目であり、これは宿主の免疫応答による抵抗性の獲得を示唆した(図 1)。これと一致し、脱落したマダニの重量を測定すると、一次寄生時のマダニ 1 匹あたりの重量は約 600 $\mu$ g だったのに対し、2 次寄生においては平均約 450 $\mu$ g であった(図 1)。これは宿主であるマウスがマダニに対する抵抗性を獲得したことでマダニの吸血が不完

図1 飽血したマダニの回収率と平均の重さ



全なうちに脱落したことを示唆する。

### (2) マダニ寄生によって誘導される免疫反応の解明

1次寄生および2次寄生における免疫応答をそれぞれ組織化およびフローサイトメトリーによって解析した。組織学的には1次寄生時には軽度な炎症性細胞の浸潤が真皮に認められ、2次寄生時には真皮全体が炎症性細胞で埋め尽くされるほどに顕著であった(図2)。特にマダニ寄生部位の直下に細胞の集積を認め、この一部はプロテアーゼであるMCP8を持つ好塩基球であった(図3)。また免疫染色による解析では真皮における顕著な好酸球の浸潤と寄生部位における好中球の集積を認めた。

フローサイトメトリーによる免疫細胞の解析では、組織学的解析と一致し、特に2次寄生時において顕著な免疫細胞の増加が認められた。リンパ球系においては $\alpha\beta$ T細胞および $\text{Lin}^- \text{Thy1.2}^+$ 自然リンパ球の増加、骨髄球系細胞では $\text{CD200R3}^+$ 好塩基球、 $\text{SiglecF}^+$ 好酸球、 $\text{Ly-6G}^+$ 好中球の浸潤を認めた。

図2 マダニ寄生部位のHE染色

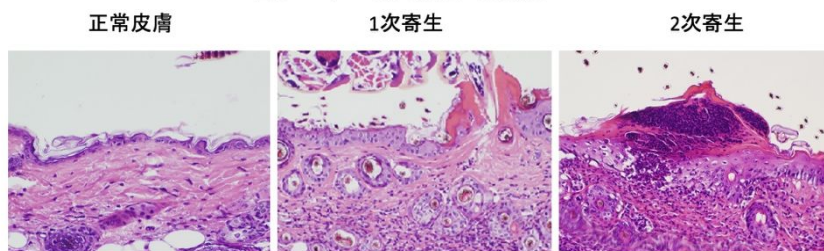
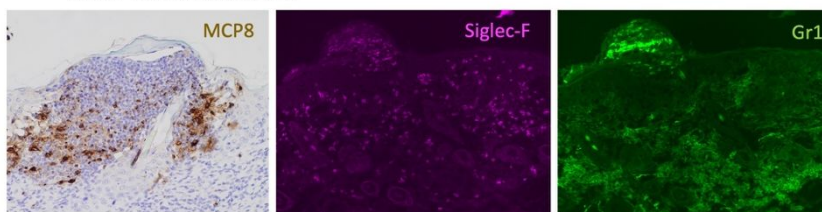


図3 マダニ2次寄生時の免疫染色。好塩基球 (MCP8)、好酸球 (Siglec-F)、好中球 (Gr1) の浸潤が見られる



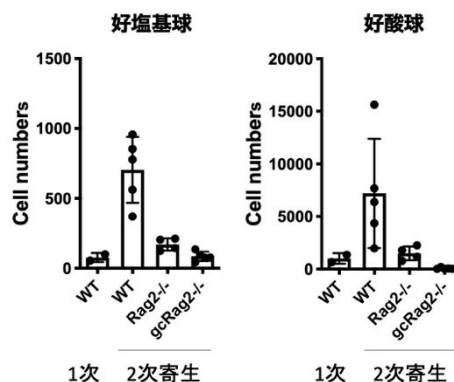
### (3) 免疫記憶形成に関わる責任細胞の同定

マダニ抵抗性の獲得には免疫記憶が関与しており、1次寄生の際に成立した記憶が2次寄生の際に働きマダニの排除につながっていると考えられる。記憶成立に関する獲得免疫系のリンパ球と自然免疫系のリンパ球のそれぞれの関与を調べるため、T・B細胞を欠損した $\text{Rag2}^{-/-}$ マウスとT・B細胞および自然免疫系の自然リンパ球も欠損した $\text{gc}^{-/-} \text{Rag2}^{-/-}$ マウスにそれぞれマダニ寄生を行った。すると $\text{Rag2}^{-/-}$ マウス、 $\text{gc}^{-/-} \text{Rag2}^{-/-}$ マウスいずれも2次寄生時の好塩基球、好酸球などの免疫細胞浸潤がほとんど起こらず、マダニ抵抗性の獲得も見られなかった(図4)。このことからマダニ寄生に対する免疫記憶の成立は獲得免疫系のリンパ球に依存的事であることがわかった。また2型自然リンパ球を欠損した $\text{Rora}^{\text{fllox/fllox}}$  Vav-iCreマウスにおいても同様に2次寄生に対する免疫反応が認められることから免疫記憶の成立に2型自然リンパ球が必須ではないことがわかった。

さらに免疫記憶の成立を担っている獲得免疫リンパ球の存在を確認するため、1次寄生を行ったマウスの皮膚所属リンパ節から細胞を分離し $\text{Rag2}^{-/-}$ マウスに移植した。このマウスに寄生を行うと2次寄生とほぼ同程度の免疫反応が起こった。一方でリンパ節の分離細胞からCD4陽性細胞を除去すると2次寄生と同程度の免疫反応は見られなくなった。一方CD8陽性T細胞を除去した場合は免疫反応が認められた。これらの結果より、マダニ寄生に対する免疫記憶の成立にはCD4陽性細胞が必須であることがわかった。

2次寄生において真皮に顕著な好酸球浸潤を認めたことからマダニ抵抗性への好酸球の関与を考えた。好酸球を欠損した $\text{dbIGATA}$ マウスにマダニの寄生を行ったところ野生型マウスと比較しマダニの抵抗性獲得に差は認められなかったことからマダニ排除には好酸球が積極的に関与していないことが示唆された。一方で $\text{dbIGATA}$ マウスではマダニの2次寄生時に好中球の増加を認め、好酸球の欠損によってなんらかの抑制機構が失われ、好中球が増加した可能性が考

図4  $\text{Rag2}^{-/-}$ マウスと $\text{gc}^{-/-} \text{Rag2}^{-/-}$ マウスにおけるマダニ2次寄生時の反応



えられた。また 2 型免疫反応の danger signal として知られている IL33 を欠損した  $IL33^{-/-}$  マウスでは好酸球の浸潤が低下するとともに好中球浸潤が増加した。この結果より、マダニ寄生による組織破壊が IL-33 の放出を促し、好酸球増加につながる可能性が示唆された。

#### 今後の課題

マダニ抵抗性の免疫記憶の成立には獲得免疫が必須であることがわかり、自然免疫系のエピジェネティックな変化を基盤とした訓練免疫の関与を示す系の確立には至らなかった。自然免疫の記憶の成立機構の解明には新たなモデルの検討が必要であると考えられる。一方でマダニ寄生モデルは好塩基球や好酸球などの 2 型免疫細胞の顕著な浸潤を起こすことから皮膚における 2 型免疫反応の動態を解析する有用なモデルの一つとして新たな知見を得られる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Tetsuro, Moro Kazuyo	4. 巻 13
2. 論文標題 Tissue-Specific Diversity of Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Skin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.885642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------