

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月20日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590470

研究課題名（和文）

寄生虫感染におけるマスト細胞と好塩基球による免疫調節と防御発現

研究課題名（英文）

Immune regulation and protection by mast cells and basophils in parasite infection

研究代表者

渡邊 直熙 (WATANABE NAOHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：00057019

研究成果の概要（和文）：

本研究はマスト細胞と好塩基球が寄生虫感染の病態発現と防御に関与することをヒトとマウスで明らかにした。マスト細胞はマラリア原虫感染でTNFおよびVEGFを介して防御を担い、デングウイルス感染では病態の重症化の要因となる。好塩基球はフタトゲチマダニの再感染でIgE抗体とともに防御を主導する。

研究成果の概要（英文）：

This study demonstrates that mast cells and basophils play major roles in protection and pathogenesis of parasite infections in humans and mice. Mast cells participate in the protection to Plasmodium through TNF and VEGF, and are pathogenic factor in severe Dengue virus infection. Basophils are essential for IgE mediated-acquired immunity to ticks.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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、マスト細胞、好塩基球、感染防御、マラリア、ダニ、デングウイルス、VEGF, IgE,

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞と好塩基球はアレルギー発現細胞とされている。一方、これらの細胞は表面受容体やサイトカイン産生などから免疫誘導や防御への関与も考えられる。消化管寄生虫やダニなどの外部寄生虫の感染では著しい Th2 免疫応答が誘導され、IgE 抗体の産生をみる。またマラリア原虫感染では TNF が防御を担うとされてきたが、マスト細胞は TNF のおもな産生細胞でもある。好塩基球に関しては、特異抗体や欠損動物の開発の遅れが実験研究の発展を妨げてきた。

2. 研究の目的

本研究は、マスト細胞と好塩基球が、IgE 受容体をもち多量のサイトカインを産生することを根拠に、寄生虫感染における防御と免疫調節を担う細胞であるという仮説をたて、①血管内でのマラリア原虫とデングウイルス寄生、②皮膚でのダニ寄生、③消化管での線虫寄生の各感染系において防御発現および自然免疫と獲得免疫の誘導への関与を解析し、これらの細胞の機能について新たな概念を樹立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)マスト細胞：マスト細胞欠損マウスと正常マウスの防御能の比較

マスト細胞欠損マウスに正常または各種欠損マウスの培養マスト細胞を移入して防御能を比較

マスト細胞由来サイトカインおよびその受容体に対する抗体投与で機能を阻害し防御能を比較

(2)好塩基球：好塩基球の同定または除去するモノクローナル抗体を作成し、感染マウスでの動態や防御を検討

好塩基球欠損マウスはジフテリア毒素受容体のシグナルを介して MCP-8 または IL-4 プロモーター領域の発現を阻害することで作成

(3)マラリア原虫感染：ヒトの三日熱マラリアと熱帯熱マラリア患者の血清中の VEGF 関連分子の定量

ネズミマラリア原虫赤内型虫体感染マウスの血中虫体数の経時変化による防御能の判定

感染マウスにおける VEGF 関連分子と TNF の関与を検討

(4)デングウイルス感染：ベトナムのデングウイルス感染小児の血清について、重症度とマスト細胞活性化の関係を VEGF 関連分子とマスト細胞特異酵素の定量で検討

(5)ダニ感染：フタトゲチマダニをマウスの皮膚に感染させ、二次感染後の虫体数から防御能を判定

ダニの感染によりアトピー性皮膚炎が惹起される NC/Nga マウスの臨床スコアから重症度を判定

(6)旋毛虫感染：旋毛虫の筋肉内幼虫をマウスに経口感染させ血中 IgE を定量

4. 研究成果

(1)マラリアとマスト細胞

①ヒトのマラリア

三日熱マラリアおよび熱帯熱マラリアの患者血清では VEGF と sVEGFR-2 の値が上昇するが、sVEGFR-1 の値は健常人と同等であった。ヒトマスト細胞株を熱帯熱マラリア原虫抗原で刺激すると VEGF の放出がみられ、TLR を介する VEGF 放出が示唆された。

②ネズミマラリア原虫感染マウス

感染マウス血中 VEGF 値は感染経過と感染虫体数の増加に比例して増加した。

感染マウスに VEGF を投与すると濃度に依存して防御がみられた。

感染マウスに抗 VEGF を投与すると防御能が低下した。

マスト細胞欠損マウスでは感染による VEGF 産生が低く防御能も低い。しかしマスト細胞欠損マウスに培養した正常マスト細胞を移入すると感染による VEGF 産生と防御の回復がみられた。

VEGF 受容体である VEGFR-1 の欠損マウスでは正常マウスと同等の防御をみるが、VEGFR-2 の阻害は防御能の低下をきたした。

マラリア原虫感染でマスト細胞由来の TNF も防御に関与する報告を以前にしたことから、TNF と VEGF の関係を検討した。TNF 欠損マウスでは感染による VEGF 値は低く防御も弱い。すなわち TNF は VEGF の上流にあって両者は単独または協同で防御にかかわる。

以上のことから、ヒトとマウスのマラリア原虫感染でマスト細胞は TNF と VEGF を介して防御を発現することが示された。VEGF は血管内皮細胞に発現する VEGFR-2 に作用する。マスト細胞の本来の機能は感染防御であることが示唆され、これによる新たな予防や治療が期待される。

(2)デングウイルス感染とマスト細胞

デングウイルス感染は近年東南アジアで流行の拡大が注目されている。デングウイルスによる疾患はその重症度からデング熱 (DF)、デング出血熱 (DHF)、そしてデングショック症候群 (DSS) に分類される。とりわけ後二者には血管透過性亢進という共通点がある。この点に着目して病態の重症化とマスト細胞の関係を検討した。

マスト細胞特異酵素トリプターゼとキマーゼの血清値は、DF では健常児と同等だが、DHF と DSS では有意な増加をみた。

血中 VEGF 値は DHF で有意に増加し、DSS でさ

らに増加をみた。

トリプターゼ、キマーゼ、VEGFの値はDHFとDSSで病態の回復に伴って正常化した。ヒトマスト細胞株を抗体存在下にデングウイルスで刺激するとVEGFの産生がみられた。マスト細胞の増殖や活性化に関与があるIL-9やIL-17もDHFとDSSで有意に高値を示した。

以上のことから、デングウイルス感染による病態の重症化にマスト細胞の関与が強く示唆された。デングウイルス感染については、動物実験系が確立されていないことから対策が遅れている。本研究の成果は病態発現の理解と治療に新たな視点を提供した。

(3)NC/Ngaマウスのアトピー性皮膚炎とマスト細胞

NC/NgaマウスはSPF環境下では正常だが、ダニやシラミの感染で高IgE血症を伴うアトピー性皮膚炎を発症する。皮膚炎の発症が始まる時期のNC/Ngaマウスに我々が開発したキマーゼ阻害剤を投与すると、発症が顕著に抑制された。

以上のことから、マスト細胞特異酵素キマーゼが外部寄生虫感染で誘導されるアトピー性皮膚炎の発症に関与することが示された。

(4)好塩基球の同定と除去

好塩基球特異的モノクローナル抗体を作成した。寄生虫感染マウスの骨髄細胞をラットに免疫しハイブリドーマを選別した。この抗体のマウスへの投与は好塩基球を特異的に除去した。

ジフテリア毒素受容体からのシグナルに連動して好塩基球の分化を阻止する遺伝子改変マウスを作成した。分化を阻止する分子はMMCP-8またはIL-4プロモーター領域の一部である。いずれもジフテリア毒素を投与することで随意に好塩基球欠損マウスを得ることができた。

この方法は好塩基球特異的でマスト細胞、リンパ球、他の白血球、マクロファージに変化はなかった。

ジフテリア毒素処理後の好塩基球の動態から、その寿命は約3日であることがわかった。

(5)旋毛虫感染と好塩基球

旋毛虫の一次・二次感染後いずれの時期にジフテリア毒素処理により好塩基球を除去してもIgE産生に影響はなかった。

(6)ダニ感染と好塩基球

フタトゲチマダニ感染マウスの局所の好塩基球とマスト細胞の浸潤は一次感染ではみられないが、二次感染で認められた。

二次感染時の好塩基球の集積はマスト細胞に依存する。

モノクローナル抗体またはジフテリア毒素処理による好塩基球の除去はダニの一次感染には影響ないが、二次感染に対する防御能を低下させた。

感染マウスの好塩基球の正常マウスへの移入は防御を賦与できた。

ダニの二次感染防御は好塩基球がIgE抗体を介して主導し、マスト細胞がIgE抗体非依存性に関与する。

以上のことから、好塩基球の除去方法の確立はこの分野の研究を発展させる基盤となった。ダニの感染防御機構の解明は好塩基球の新たな生物活性を明らかにするとともに、ダニ媒介性感染症の対策にも貢献する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

①Furuta T, Watanabe N(15番目)他13名 Association of mast cell-derived VEGF and proteases in Dengue shock syndrome, PLoS Negl/Trop Dis 査読有 6, 2012:e1505.

②Sawaguchi M, Ishiwata K(7番目), Watanabe N(10番目), Karasuyama H(11番目)他10名 Role of mast cell and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness, J Immunol 査読有 188, 2012, 1809-18.

③Ishiwata K, Watanabe N 他7名 Costimulator B7-DC attenuates strong Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis*, J Immunol 査読有 184, 2010, 2086-94.

④Wada T, Ishiwata K, Watanabe N(14番目), Karasuyama H(15番目)他11名 Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks, J Clin Invest 査読有 120, 2010, 2867-75.

⑤Furuta T, Kimura M, Watanabe N, Elevated levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 in human malaria, Am J Trop Med Hyg 査読有 82, 2010, 136-9.

〔学会発表〕(計20件)

①渡辺直熙、古田隆久 ネズミマラリアにおけるマスト細胞由来TNFとVEGFによる防御発現 第40回日本免疫学会学術総会 2011年11月27日 幕張

②渡辺直熙、古田隆久 他 デングウイルス感染症とマスト細胞活性化 第61回日本アレルギー学会秋季学術大会 2011年11月11日 東京

③渡辺直熙 寄生虫感染とIgE 第80回日本寄生虫学会大会 2011年7月18日 東京

④渡辺直熙、古田隆久 他 デングウイルス感染による病態の重症化におけるマスト細胞の関与 第22回日本生体防御学会学術総会 2011年6月29日 那覇

⑤ Watanabe N et al. Mast cell-derived cytokines in protection to Plasmodium infection 第 12 回国際寄生虫学会議 メルボルン 2010 年 8 月 17 日

⑥ 渡辺直熙 他 デングウイルス感染症におけるマスト細胞の関与 第 21 回日本生体防御学会学術総会 2010 年 7 月 23 日 仙台

⑦ 渡辺直熙 他 マスト細胞上のDectin-1を介したマラリア原虫の感染防御 第 79 回日本寄生虫学会大会 2010 年 5 月 21 日 旭川

⑧ 渡辺直熙 他 デング熱におけるマスト細胞の関与 第 50 回日本熱帯医学会大会 2009 年 10 月 23 日 宜野湾

⑨ 渡辺直熙 他 寄生虫感染防御におけるMD-1 の関与 第 20 回日本生体防御学会学術総会 2009 年 7 月 26 日 東京

⑩ 渡辺直熙 他 VEGFと血管内皮細胞上VEGFR-2によるマラリア原虫防御機構 第 74 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2009 年 6 月 26 日 京都

⑪ 渡辺直熙 他 消化管寄生虫感染防御におけるMD-1 の関与 第 78 回日本寄生虫学会大会 2009 年 3 月 27 日 東京

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 直熙 (WATANABE NAOHIRO)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：00057019

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

烏山 一 (KARASUYAMA HAJIME)
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60195013

古田 隆久 (FURUTA TAKAHISA)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：30143514