

令和 6 年 6 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09052

研究課題名(和文)肺炎球菌感染初期時の急性増悪を回避する自然抗体IgMへのIL13の役割解明

研究課題名(英文) A role of IL-13 for natural antibody IgM to avoid acute exacerbation at initial phase of infection of Streptococcus pneumoniae.

研究代表者

鈴木 剛 (suzuki, tsuyoshi)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：50747227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗炎症サイトカインであるIL-13の働き、特に感染症初期にどのように働くかを研究した。感染初期には自然免疫が中心となって微生物からの侵襲に対応している。その中でガンマグロブリンの一つであるIgMに着目した。IL-13遺伝子欠損マウスを用いて研究を行った。結果としてIL-13遺伝子欠損マウスは感染成立前でIgMの産生量が低下しておりまた抗原(細菌)への親和性が低下している可能性が判明した。これらによりIL-13は感染早期に自然免疫応答を調整し、急性増悪を回避していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症は微生物と宿主(人間)との関わりで発症する。宿主が感染症に備える場合、多種多様な抗原(微生物、ウイルス)に対応するため、また迅速に対応するために感染初期に対応する自然免疫と、抗原に特異的で強い作用を持った適応免疫がある。適応免疫が発動するまでには一定の時間が必要であり、この間は自然免疫で対応する必要がある。自然免疫には免疫細胞による微生物の捕獲(貪食)や補体などいくつかの対応があるが、ガンマグロブリンIgMによる応答も抗原への初期応答に重要である。今回の研究ではIL-13はIgMの産生、及びその質の産生に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied the function of IL-13, an anti-inflammatory cytokine, especially how it works in the early stages of infection. In the early stages of infection, innate immunity plays a central role in responding to invasion from microorganisms. We focused on IgM, one of the gammaglobulins, and used IL-13 gene-deficient mice for our study. The IL-13 gene-deficient mice produced lower levels of IgM before infection was established. The IgM may have a reduced affinity for the antigen (bacteria). These findings suggest that IL-13 modulates the innate immune response in the early stages of infection to avoid acute exacerbation.

研究分野：自然免疫

キーワード：IL-13 自然免疫 ガンマグロブリン IgM

番号：21601

種目：基盤研究(C)

期間：2021-2023

番号：21K09052

課題名：(和文)肺炎球菌感染初期の急性増悪を回避する自然抗体 IgM への IL-13 の役割解明

課題名：(英文) A role of IL-13 for natural antibody IgM to avoid acute exacerbation at initial phase of infection

Streptococcus pneumoniae

研究代表者：鈴木 剛 (Suzuki Tsuyoshi)

所属：岡山県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：50747227

決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,100,000 円

研究成果の概要(和文): 抗炎症サイトカインである IL-13 の働き、特に感染症初期にどのように働くかを研究した。感染初期には自然免疫が中心となって微生物からの侵襲に対応している。その中でガンマグロブリンの一つである IgM に着目した。IL-13 遺伝子欠損マウスを用いて研究を行った。結果として IL-13 遺伝子欠損マウスは感染成立前で IgM の産生量が低下しておりまた抗原(細菌)への親和性が低下している可能性が判明した。これらにより IL-13 は感染早期に自然免疫応答を調整し、急性増悪を回避していると考えられた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症は微生物と宿主(人間)との関わりで発症する。宿主が感染症に備える場合、多種多様な抗原(微生物、ウイルス)に応答するため、また迅速に対応するために感染初期に応答する自然免疫と、抗原に特異的で強い作用を持った適応免疫がある。適応免疫が発動するまでには一定の時間が必要であり、この間は自然免疫で対応する必要がある。自然免疫には免疫細胞による微生物の捕獲(貪食)や補体などいくつかの対応があるが、ガンマグロブリン IgM による応答も抗原への初期応答に重要である。今回の研究では IL-13 は IgM の産生、及びその質の産生に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): We studied the function of IL-13, an anti-inflammatory cytokine, especially how it works in the early stages of infection. In the early stages of infection, innate immunity plays a central role in responding to invasion from microorganisms. We focused on IgM, one of the gammaglobulins, and used IL-13 gene-deficient mice for our study. The IL-13 gene-deficient mice produced lower levels of IgM before infection was established. The IgM may have a reduced affinity for the antigen (bacteria). These findings suggest that IL-13 modulates the innate immune response in the early stages of infection to avoid acute exacerbation.

研究分野：自然免疫

キーワード：IL-13、自然免疫、ガンマグロブリン、IgM

## 1. 研究開始当初の背景

敗血症は医療の発展の中においても依然日本人死亡数の上位を占めている。健常者が重篤な敗血症や髄膜炎に罹患する機序に未だ不明な点が多い。特に市中で罹患頻度が高い肺炎球菌の初感染時短時間に悪化する病態の解明が望まれる。強力な抗炎症性サイトカインである IL-13 はアレルギー、特に喘息治療において既に治療薬として用いられるなど研究が進んでいたが、感染症時に抗炎症性サイトカインである IL-13 がどのように機能しているかは不明な点が多かった。IL-13 は敗血症初期に臓器に対して保護的であるのか、または非保護的となるのかは明らかではないが、生存期間の短縮からは保護的に働くと考えられた。敗血症時に IL-13 はどのように働くのか検討することは敗血症の病態を理解する上で重要と考えられた。

## 2. 研究の目的

敗血症の早期には自然抗体である液性因子が重要と考えられる。未刺激の IL-13<sup>-/-</sup>マウスの血清 IgM を測定すると野生型(balb/c)に比べ際立って低値であった。また IL-13<sup>-/-</sup>マウスの肝臓では感染後 2.5 時間での TNF と CXCL2 の mRNA が野生型の上昇に比べて有意に低率であった。低下した血清 IgM のアフィニティと補体活性化能等を更に評価し、予後悪化の要因を詳細に特定することが本研究の主眼である。また自然抗体産生細胞である B1a 細胞の機能に IL-13 がどのようにかわるのか自然免疫応答の中で血流感染発症初期の液性免疫の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

### In vivo

A: IL-13<sup>-/-</sup>マウスを用いた血流感染モデル、及び臓器別応答の解析

B: 莢膜抗原特異的 IgM 定量、遊離ホスホリルコリン阻害実験による avidity index 描出と補体活性化能測定の解析

C: B1a 細胞の IL-13 投与に対する応答様式の解析

C: B1a 細胞の IL-13 投与に対する応答様式の解析

Vivo で採取した血液（血清、血漿）は ELISA 法により IL-6, IL-1 等を測定する。

また臓器は PBS- で懸濁し、遠心分離後に上清は血液同様 ELISA 法で測定する。また臓器から cDNA を合成し、炎症に関連する IL-6, IL-1、また C タイプレクチンでありパターン認識レセプターである Mincle, dectin-2 等を RT-PCR 法を用いて測定する。

### In Vitro

野生型(balb/c)、及び IL-13<sup>-/-</sup>マウスの骨髄細胞を採取し GM-CSF(20ng/ml)を用いて 8 日間の共培養し骨髄由来樹状細胞(BMDC)に分化させる。Vivo で BMDC と目的微生物と接触させ、一定時間後の応答を確認する。

### <計画通りにならない場合>

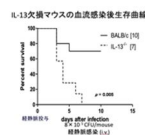
研究目的内で述べたとおり、A.B.C.の計画の中で、IgM の量が低値である結果のみの観察に留まり、予想した T 細胞機能抑制や B1a 細胞の関与が観察されない可能性がある。このような場合は、申請者が既に蓄積した結果の中から感染後早期の TNF 及び CXCL2 産生性、炎症応答の調節作用を補足的な研究結果として加え、本申請内容の範囲として avidity や補体活性化能、B1a 細胞機能への IL-13 の寄与が限局していると結論し論旨として報告する。

## 4. 研究成果

まず本研究において 2022 年 3 月に発生した福島県沖地震の影響で施設損傷の関連から約 10 ヶ月の研究の遅れが生じた。これにより当初計画した研究計画の遂行には至らなかった（尚、現在は環境が回復し研究は再開・継続されている）。

- 1) in vivo IL-13<sup>-/-</sup>マウスと野生型(balb/c)の比較として肺炎球菌 S.pneumoniae の血流感染モデルで IL-13<sup>-/-</sup>マウスで生存に優位差が認められた(図 1)。生存に差が生じ始めたのはモデル作成から 4 日目頃からであり、感染初期の応答として自然免疫の期間に生じていると考えられた。この点から IL-13 は感染

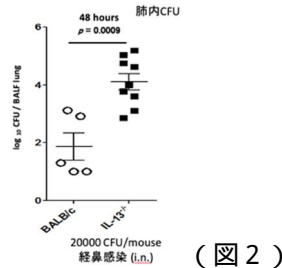
初期に保護的に働いていると考えられる。



(図 1)

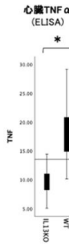
分担研究者である山本が行った実験では IL-13<sup>-/-</sup>マウスにおいて野生型(balb/c)との比較において肺炎球菌 S.pneumoniae の経鼻感染(肺炎)モデルでは処置 48 時間後の肺の BALF において IL-13<sup>-/-</sup>マウス群で肺炎球菌 CFU に差が発生した(図 2)。これは IL-13<sup>-/-</sup>マウスでは微生物の駆除を十分にできなかったためと考えられた。従って IL-13 は感染初期の応答に関与していることが示唆された。これは BALF 以外にも IL-13<sup>-/-</sup>マウスと野生型の比較

において血液中の微生物 CFU でも同様の傾向が示された(非表示)。



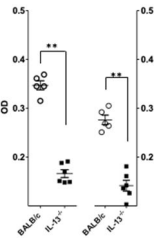
(図 2)

in vivo IL-13<sup>-/-</sup> マウスにおいて野生型 (balb/c) と感染 24 時間後の心臓懸濁液を用いて TNF- $\alpha$  を測定した。すると IL-13<sup>-/-</sup> マウスの血流感染モデルで TNF- $\alpha$  の低下を認めた (P<0.05) (図 3A)。



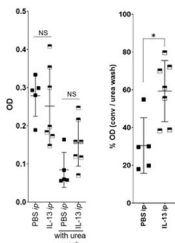
(図 3)

2) in vivo において IL-13<sup>-/-</sup> マウス及び野生型 (balb/c) の IgM のアフィニティー測定を試みた。両群において肺炎球菌の血流感染 48 時間後の血清を用い ELISA 法を用いて定量測定した。肺炎球菌に対する IgM は IL-13<sup>-/-</sup> マウスで低値 (P<0.01) であった (図 4A)



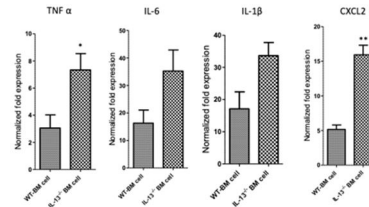
(図 4A)

血流感染の 7 日前から PBS-または rIL-13 を連日腹腔投与を行い、その後血流感染を行った系では両群で IgM の産生量に差は生じなかったものの rIL-13 投与群では産生された IgM の親和性 affinity の増強が認められた (図 4B)。



(図 4B)

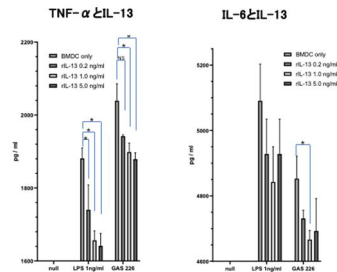
3) in vitro では IL-13<sup>-/-</sup> マウス及び野生型 (balb/c) の BMDC を用いて肺炎球菌との接触後の応答を観察した。接触後 BMDC の mRNA を抽出し proinflammatory mediator である TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、CXCL2 を RT-PCR 法を用いて定量測定した。接触後 24 時間時点で IL-13<sup>-/-</sup> マウス由来の BMDC では前述の proinflammatory mediator の上昇を認めた。(図 5)



Incubated for 24 hours, all parameters are compared to resting BMDC

(図 5)

4) 野生型マウス (balb/c) を用いて BMDC と Lipopolysaccharide (LPS) または微生物 (A 群溶連菌: GAS) との接触実験では rIL-13 の濃度を変化させ 24 時間の共培養を行った。その際 rIL-13 を加え (rIL-13 濃度は 0.2ng/mL, 1.0ng/mL, 5.0ng/mL) 検討を行った。その後共培養した上清を用いて TNF- $\alpha$ 、及び IL-6 を測定した。結果は rIL-13 の濃度に反比例し TNF- $\alpha$ 、及び IL-6 の低下を認めた (P<0.05) (図 6)。IL-13 の抗炎症作用を確認するとともに前述 2) を補強することとなった。



(図 6)

IL-13 は Th2 サイトカインの一つであり免疫応答の調整や強力な抗炎症作用を持つ<sup>1)</sup>とされる。Matsukawa ら<sup>2)</sup>によると、マウス腹膜炎モデルに抗 IL-13 抗体を投与すると生存率が 53% から 14% に低下しており、IL-13 の臓器保護への関与が示唆されていた。本研究においても血流感染モデルにおいて IL-13<sup>-/-</sup> マウスの生存率低下が示され同様の結果であると考えられた。本研究では IL-13<sup>-/-</sup> マウスにおいて感染初期 24 時間という早期の応答として心臓内の TNF- $\alpha$  の現象が認められた。敗血症において TNF- $\alpha$  は炎症を惹起する一方で細胞免疫を活性化することが知られている<sup>3)4)</sup>。敗血症時に TNF- $\alpha$  がもたらす影響は必要な炎症の惹起や細菌貪食を活性化が考えられているが、未だ不明な点が多いが、この応答が過剰であることはサイトカインストームに繋がりむしろ有害と考えられる一方で、必要な免疫応答として一定程度は生存に必要であり調整が必要であると考えられる。IL-13 はこの調整を担っている可能性が示唆された。また IgM の発現量、及びその親和性にも関与している可能性も示唆された。IgM は自然免疫の中で重要な役目を果たしており B1a 細胞がその発現に関与している<sup>5)</sup>と考えられている。これまで IgM の親和性について報告はないが、本研究から IL-13 が IgM 産生量、及びその親和性に関与している可能性が示唆された。本研究では IgM を産生している B1 細胞と IL-13 の関わりを現時点では明らかにできていない。この点を今後の研究で継続し明らかにしたい。

[ 参考文献 ]

- 1) Nature.1993;18;362(6417):248:50
- 2) J Immunol.2000;164(5):2738-2744
- 3) In Vivo.2023;27(6)669-684
- 4) BMC infect Dis.2020;20:221.
- 5) J Immunol.2003;170(9);4556-4571

5. 主な論文発表等

【雑誌論文】

(現時点では発表に至っていない。遅延に伴った研究をさらに進め論文発表を行う)

【学会発表】

計 2 件 (うち国際学会 1 件)

1. 発表者名 Tsuyoshi Suzuki、Natsuo Yamamoto、Hideki Yamamoto、Ken Iseki
2. 発表表題 Mincle rapidly involved in organ immune reaction induced by critical polymicrobial septic peritonitis via an immune cascade by IL-13
3. 学会名 Awaji International Forum on Infection and Immunity
4. 発表年 2023

- 1 発表者名 鈴木剛、山本英輝、金光敬二、山本夏男
- 2 発表表題 腹膜炎急性期の自然免疫応答が臓器障害に及ぼす際の IL-13 と C タイプレクチンの役割
- 3 学会名 日本感染症学会東日本地方学術集会
- 4 発表年 2023

- 1 発表者名 鈴木剛、山本夏男、山本英輝、原靖果、仲村究、金光敬二
- 2 発表表題 腹膜炎急性期の自然免疫応答で生じる心筋障害と抗炎症性サイトカイン IL-13 の関与
- 3 学会名 日本感染症学会学術集会
- 4 発表年 2024

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)               | 所属研究機関<br>部局・職<br>(機関番号)         | 備考 |
|-------|---|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 山本夏男<br>(Natsuo Yamamoto)<br>(50466562) | 福島県立医科大学<br>医学部・博士研究員<br>(21601) |    |
| 研究分担者 | 伊関憲<br>(Ken Iseki)<br>(70332921)        | 福島県立医科大学<br>医学部・教授<br>(21601)    |    |

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Tsuyoshi Suzuki、Natsuo Yamamoto、Hideki Yamamoto、Ken Iseki  |
| 2. 発表標題<br>Mincle rapidly involved in organ immune reaction induced by critical polymicrobial septic peritonitis via an immune cascade by IL-13 |
| 3. 学会等名<br>Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>鈴木剛、山本英輝、金光敬二、山本夏男                        |
| 2. 発表標題<br>腹膜炎急性期の自然免疫応答が臓器障害に及ぼす際のIL-13とCタイプレクチンの役割 |
| 3. 学会等名<br>本感染症学会東日本地方学術集会                           |
| 4. 発表年<br>2023年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>鈴木剛、山本夏男、山本英輝、原靖果、仲村究、金光敬二               |
| 2. 発表標題<br>腹膜炎急性期の自然免疫応答で生じる心筋障害と抗炎症性サイトカインIL-13の関与 |
| 3. 学会等名<br>日本感染症学会学術集会                              |
| 4. 発表年<br>2024年                                     |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 山本 夏男<br><br>(Yamamoto Natsuo)<br><br>(50466562) | 福島県立医科大学・医学部・博士研究員<br><br><br><br>(21601) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                 | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 伊関 憲<br><br>(Iseki Ken)<br><br>(70332921) | 福島県立医科大学・医学部・教授<br><br><br><br>(21601) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |