

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 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590386

研究課題名（和文）住血吸虫による Th17 型炎症抑制機構の解析

研究課題名（英文）Study on schistosoma' s suppressive mechanisms against Th17-type inflammation

研究代表者

長田 良雄（OSADA YOSHIO）

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80282515

研究成果の概要（和文）：ストレプトゾトシン（STZ）誘発 1 型糖尿病と、IL-1 受容体アンタゴニスト欠損マウスの自然発症関節炎に対するマンソン住血吸虫の抑制効果について検討した。住血吸虫感染により STZ 誘発による血糖値上昇は有意に抑制された。感染マウスでは膵リンパ節における β 細胞傷害メディエーターの発現が抑制されており、この抑制効果には Th2 サイトカインは必須ではないことが示された。住血吸虫感染はまた、自然発症関節炎における後肢の腫張を抑制した。

研究成果の概要（英文）：We examined suppressive effects of *Schistosoma mansoni* infection on streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes and spontaneous arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. Schistosoma infection significantly suppressed hyperglycemia induced by STZ. In the infected mice, pancreatic lymph node expressions of β -cell toxic mediators were down-regulated in the infected mice. Th2 cytokines were dispensable for this anti-diabetic effect. Schistosoma infection also suppressed hind paw edema in the spontaneous arthritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
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：免疫修飾 感染症 炎症 寄生虫 自己免疫疾患 糖尿病 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

微生物への暴露や感染がアレルギー疾患を予防するという仮説（衛生仮説）が広く知られているが、衛生状態の改善が著しい先進諸国においてはアレルギー疾患のみならず一部の自己免疫疾患においても患者数の顕著

な増加がみられることから、広範な免疫異常疾患において衛生仮説が成り立っている可能性がある。近年の研究により、細菌のみならず、寄生蠕虫も衛生仮説との関わりが報告されている。寄生蠕虫の中でも住血吸虫については、多発性硬化症（MS）モデルである実

験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE)、1 型糖尿病、炎症性腸疾患 (IBD) など多くの実験的炎症を抑制したという報告がなされている。しかし、疾患抑制の機序については今なお論議があり、諸説のうち、蠕虫感染による Th2 応答の増強に伴い Th1 応答の抑制がかかるという「Th1/Th2 バランス説」については、①寄生蠕虫感染が自己免疫疾患モデルとアトピー疾患モデル両者を抑制すること、②Th1 依存性と考えられていた自己免疫疾患の多くが実は Th17 依存性であることなどから、大幅な見直しが必要となっている。このような背景のもと、申請者は平成 18 年度科学研究費補助金・基盤研究 (C) において「住血吸虫による炎症性疾患抑制効果の研究」を行った。その結果、マンソン住血吸虫 (Sm) 感染がコラーゲン関節炎 (CIA, Th17 依存性の自己免疫疾患モデル) を抑制すること、またその際、T 細胞からの IL-17 や TNF α の産生能が低下していることを確認した。よって少なくとも一部の疾患モデルにおいては、Sm が Th17 応答を抑制することにより抗炎症効果を発揮している可能性が高いと考えられた。IL-17 の関与が示唆されている疾患モデルに対する寄生蠕虫による抑制機序はあまり解明されておらず、本研究でその一端の解明を目指すこととした。

2. 研究の目的

(1) 疾患に対する抑制効果の確認

IL-17 の関与が示唆される炎症モデルに対する Sm 感染による抑制効果の有無を検討する。また、他の寄生蠕虫 (腸管寄生線虫) との抑制効果の比較を行い共通点と相違点を明らかにする。

(2) メディエーターの量的変化の解析

明らかな抑制効果のみられた実験系において、感染による炎症性および抗炎症性メディエーターの量的変化を明らかにする。

(3) Th2 サイトカインの関与の解析

寄生蠕虫の抗炎症効果が Th2 サイトカインを必要とするか否か、遺伝子欠損マウスを用いて検証する。

3. 研究の方法

発症において IL-17 が必要であると証明されている関節炎モデルとして IL-1 受容体アンタゴニスト欠損 (IL-1Ra KO) マウスの自然発症関節炎を、IL-17 の関与が示唆されている 1 型糖尿病モデルとして多回低用量 STZ 誘発糖尿病を用いた。前者では生後 5 週令のマウスに 100 隻のセルカリアを感染し、2 週毎に四肢の腫脹をスコアリングし、厚みを測定した。後者では 6 週令以降の C57BL/6 雄性マウスに 100 隻のセルカリアを感染し、6 週

後から 5 日連続で STZ を 50mg/kg 腹腔内投与し、「免疫関与型」の糖尿病を誘発した。血糖値測定および HE 染色組織における平均膵島面積の変化によって蠕虫の糖尿病抑制効果の評価した。Sm との比較のため、同じく多彩な免疫修飾作用がすでに報告されている毛様線虫 *H. polygyrus* (Hp) を用いて同様の検討を行った。Hp は 200 隻の感染幼虫を経口投与により感染し、1 週後に糖尿病を誘発した。いずれの場合も誘発開始 1 週後の膵リンパ節または膵実質から RNA を精製し、リアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現の定量を行った。抑制効果におけ IL-4, IL-13 および IL-10 の関与を明らかにするため、STAT6 KO マウスや IL-10 KO マウスを用いて上記と同様に糖尿病の誘発実験を行い、血糖値の変化を測定した。

4. 研究成果

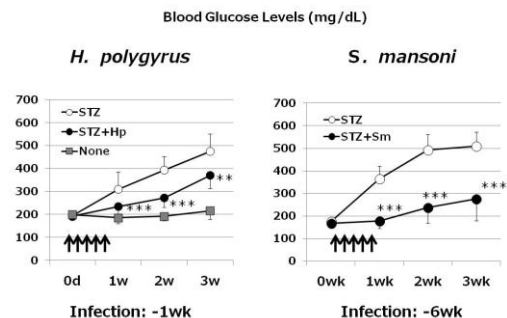
(1) 疾患に対する抑制効果の確認

① STZ 誘発糖尿病に対する効果

Sm および Hp とも、感染により多回低用量 STZ 投与マウスにおける血糖値上昇が有意に抑制された (図 1)。腸管内寄生の Hp に関しては虫体による糖の奪取や腸管からの吸収阻害が血糖値上昇を抑制している可能性も考えられたため、単回高用量 STZ 投与マウス (免疫機序の関与しないモデル) への影響をみるとともに、糖尿病を誘発していない感染マウスにおける経口グルコース負荷後の血糖値の動態を検討した。Hp は単回高用量 STZ 投与マウスの血糖値上昇は抑制せず、グルコース負荷後の血糖値にも影響を与えなかった (図示せず) ので、免疫修飾による高血糖抑制効果である可能性が高いと推察された。

図 1

Helminth infections suppress MLD-STZ-induced T1D



② IL-1Ra KO マウス関節炎に対する効果

Hp 感染は IL-1RaKO マウスの関節炎発症を抑制しなかった。Sm は感染初期 (~6 週) においては関節炎発症に影響を与えなかったが、8、10 週では雄性マウスの足肢の腫脹を

抑制した（雌では同様の効果は観察されなかった）。

以上の結果に基づき、顕著な抑制効果の観察された STZ 誘発糖尿病について（目的の（2）（3）に関する）以後の解析を行った。

（2）メディエーターの量的変化の解析

Sm 感染マウスの膵リンパ節における関連遺伝子の発現について解析した。STZ 初回投与1週後に膵リンパ節サンプルを採取しリアルタイム PCR を行った。STZ 投与マウスの膵リンパ節では、無処置マウスに比べ IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 などの発現上昇が観察された。これに対しさらに Sm を感染させたマウスにおいては、IL-1 β 、TNF- α 、FasL および iNOS の発現が抑制された（図 2）。膵実質においても同様の傾向が観察された（図示せず）。また感染マウス膵リンパ節では、IL-4 や Arg-1 の顕著な発現上昇が確認された（図 3）。しかし、IL-10 の発現上昇は観察されず、TGF- β や Foxp3 に関してはむしろ感染マウスにおいて発現量が低下していた。このことから Treg の関与の可能性は低いことが推察されたので、CD4+CD25+ Foxp3+ Treg を抑制する抗 CD25 抗体（PC61）を投与して Sm の血糖値上昇抑制作用に対する影響を確認した。その結果、PC61 投与による抑制作用の減弱はみられなかった。これらの結果から Sm による 1 型糖尿病抑制作用には Treg ではなく M2 マクロファージが関与している可能性が高いと推測された。

図 2

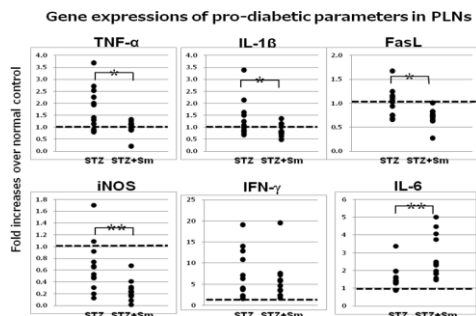
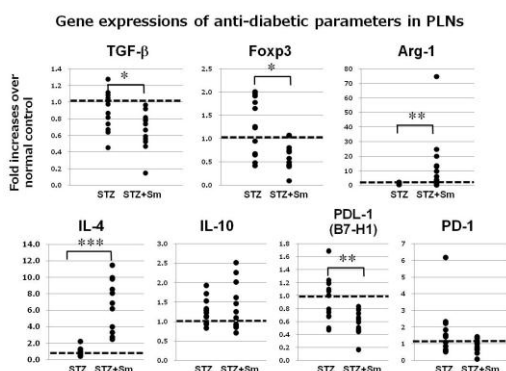


図 3



（3）Th2 サイトカインの関与の解析

Sm, Hp ともに、STAT6KO, IL-10KO どちらのマウスにおいても、STZ 誘発血糖値上昇に対する抑制作用は失われなかった（STAT6KO マウスについて図示、図 4）。他の寄生蠕虫と同様に、Sm, Hp も IL-4, IL-13, IL-10 などのサイトカインを誘導することが知られているが、これらの Th2 シグナルは 1 型糖尿病の抑制作用には必須ではないことが示された。

STAT6 is not required for the anti-diabetic effects of helminths

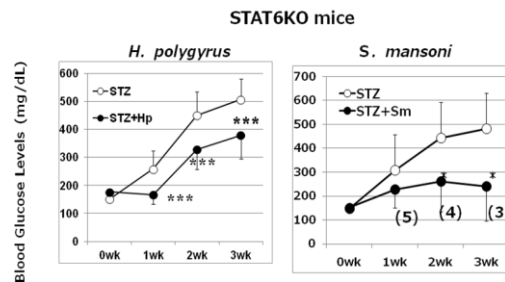


図 4

前述のように膵リンパ節における遺伝子発現解析では M2 マクロファージを誘導する IL-4 や M2 マクロファージの活性化の指標となる Arg-1 の発現が顕著に上昇していたが、この細胞を誘導する最も重要なサイトカインである IL-4 と IL-13 のシグナルが伝達されない STAT6KO マウスにおいても抗糖尿病作用が失われなかった事実から、STAT6KO マウスにおいては何らかの代償的なシグナル（IL-10 あるいは TGF- β ）が活性化して異なるタイプの抑制性マクロファージを誘導している可能性が考えられる。実際に自然発症型の NOD マウスにおいては、IL-4 と IL-10 の両シグナルが阻害された状態では Hp の抗糖尿病作用は失われることが Mishra ら (2013) により報告されている。今後は STAT6KO/IL-10 double KO マウス（現在作成中）を用いて両シグナルの冗長性を確認するとともに、TGF- β シグナルの必要性および各 KO マウスにおける M2 マクロファージの活性化状態についても遺伝子発現の解析により確認を行う予定である。

最後に、（1）②で述べたように IL-1Ra KO 関節炎に対しては、Sm は抑制作用を示すが Hp は示さないことが判明した。コラーゲン関節炎に関しても同様の結果が得られており、どちらの寄生虫も抑制効果を示す 1 型糖尿病とは明らかに異なっている。本研究により自己免疫性関節炎に対する寄生蠕虫の抑制機序は 1 型糖尿病に対するそれとは異なること、Sm と Hp の免疫修飾作用も異なることが示唆され、今後解析を進展させる予定である。

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 5 件)

① Mbanefo EC, Chuanxin Y, Kikuchi M, Shuaibu MN, Boamah D, Kirinoki M, Hayashi N, Chigusa Y, Osada Y, Hamano S, Hirayama K. Origin of a novel protein-coding gene family with similar signal sequence in *Schistosoma japonicum*. *BMC Genomics*. 査読あり. 13 (260), 2012.
DOI: 10.1186/1471-2164-13-260.

② 金澤保 長田良雄. 日本住血吸虫と神経系. 神経内科. 査読なし. 77 (3) 267-273, 2012.

③ Imai K, Koibuchi T, Kumagai T, Maeda T, Osada Y, Ohta N, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Cerebral schistosomiasis due to *Schistosoma haematobium* confirmed by PCR analysis of brain specimen. *J Clin Microbiol*. 査読あり. 49(10) : 3703-3706, 2011.
DOI:10.1128/JCM.01073-11.

④ Osada Y, Kanazawa T. Schistosome: its benefit and harm in patients suffering from concomitant diseases. *J Biomed Biotechnol*. 査読あり. 2011(264173), 2011.
DOI:10.1155/2011/264173.

⑤ 長田良雄. 寄生虫とアレルギーの親密な関係. *Medical Practice*. 査読なし. 27 (9), 1541-1542, 2010.

[学会発表] (計 11 件)

① 長田良雄, 藤山智宏, 山田壮亮, 金澤保. マンソン住血吸虫が実験的1型糖尿病マウス膵臓の遺伝子発現に及ぼす効果. 第82回日本寄生虫学会大会. 東京 (2012年3月29-31日)

② 長田良雄, 山田壮亮, 金澤保. STZ投与マウス膵臓の炎症メディエーター発現に対する寄生蠕虫の効果. 第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会. 長崎 (2012年11月10-11日)

③ Osada Y, Yamada Y, Kanazawa T. Helminths reduce severity of experimental type 1 diabetes in mice via STAT6- and IL-10- independent mechanisms. Forum Cheju 15. The 15th Japan-Korea Parasitologists' Seminar. Current Trends

in Parasitology Research in Japan and Korea. 宮崎 (2012年5月23-25日)

④ 長田良雄, 山田壮亮, 金澤保. 寄生蠕虫の抗糖尿病効果に関与する因子の解析. 第81回日本寄生虫学会大会. 西宮 (2012年3月23-24日)

⑤ 長田良雄, 山田壮亮, 山岸靖宣, 金澤保. *Heligmosomoides polygyrus* 感染はマウスのストレプトゾトシン誘発糖尿病を抑制する. 第80回日本寄生虫学会大会. 東京 (2011年7月17-18日)

⑥ 長田良雄, 山田壮亮, 金澤保. 腸管寄生虫感染はマウスのストレプトゾトシン誘発糖尿病を抑制する. 第32回日本炎症・再生医学会. 京都 (2011年6月2-3日)

⑦ 長田良雄, 黒田悦史, 金澤保. コラーゲン関節炎に対する蠕虫感染の影響. -*Heligmosomoides polygyrus* の場合 -. 第63回日本寄生虫学会南日本支部大会・第60回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会. 鹿児島 (2010年11月6-7日)

⑧ Osada Y. Experimental *Schistosoma mansoni* infection suppresses autoimmune arthritis in mice. EPS Global-Shanghai 1st International Biomedicine Forum. 中国/上海 (2010年9月10-11日)

⑨ Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* has anti-arthritic effects accompanied with IL-17's down-modulation dependent on viable eggs. XIIth International Congress of Parasitology. オーストラリア/メルボルン (2010年8月15-20日)

⑩ 長田良雄, 清水少一, 熊谷貴, 山田壮亮, 金澤保. 住血吸虫による関節炎抑制には、炎症性サイトカインの産生抑制が伴う. 第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会. 北九州 (2010年6月25日)

⑪ 長田良雄, 金澤保. 住血吸虫によるThサイトカイン修飾に関与する因子の解析. 第79回日本寄生虫学会大会. 旭川 (2010年5月20-21日)

[図書] (計1件)

① Osada Y. Parasitic Helminths as Potential Therapeutic Agents against Autoimmune Disorders. In: Autoimmune Disorders - Current Concepts and Advances from Bedside to Mechanistic Insights.

InTech, 591-614 (Chapter 29), 2011.
DOI: 10.5772/21640

〔その他〕 (計 1 件)

① Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* has anti-arthritic effects accompanied with IL-17's down-modulation dependent on viable eggs. *Proceedings of XIIth International Congress of Parasitology*. 113-116, 2010. (国際学会会議録)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 良雄 (OSADA YOSHIO)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80282515

(2) 研究分担者

黒田 悦史 (KURODA ETSUSHI)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・准教授
研究者番号：10299604

(3) 連携研究者

中江 進 (NAKAE SUSUMU)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：60450409