

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249022

研究課題名(和文) 顆粒白血球の寄生虫感染宿主応答に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Protective effect of granular leukocytes on host defense against intestinal nematode infection

研究代表者

中西 憲司 (Nakanishi, Kenji)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：60172350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,400,000円、(間接経費) 11,220,000円

研究成果の概要(和文)：腸管寄生線虫に感染すると、哺乳動物は肺に好酸球を主とした炎症、腸管に肥満細胞を主とした炎症を起こす。本研究から、肺に到達した寄生虫の作用で肺組織内においてインターロイキン33(IL-33)の産生が誘導され、次にIL-33の作用で2型自然リンパ球(ILC2)が肺組織内で増殖し活性化され、最後にILC2が産生したIL-5とIL-13の作用で肺好酸球症が誘導され、寄生虫が傷害されることが明らかになった。次に腸管肥満細胞性炎症の誘導が2型ヘルパーT細胞(Th2)の作用で起こるが、肥満細胞が排虫作用を獲得するためにはIgEとIgG1で活性化されることが重要なことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the relevant roles of group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) for induction of pulmonary eosinophilia. Infection with *Strongyloides venezuelensis* (Sv) induces IL-33 production by increasing the number of Type II alveolar epithelial cells, which express IL-33 in their nucleus. Then, IL-33 induces ILC2s to proliferate and produce IL-5 and IL-13, which in combination induce lung eosinophilic inflammation, aiding to expel infected worms in the lungs. We also showed that Al D-/- mice, lacking the capacity to switch from IgM to other isotypes, normally develop Th2 cells and intestinal mastocytosis after infection with Sv. However, they failed to rapidly expel Sv and need adoptive transfers of IgE and IgG from Sv-infected mice to obtain the capacity to promptly expel Sv. Thus, both innate and acquired immunity are required for rapid expulsion of intestinal nematode.

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：腸管寄生虫感染 好酸球性肺炎 腸管肥満細胞性炎症 Th2細胞 ILC2 IgE IgG1

## 1. 研究開始当初の背景

蠕虫感染時にはTh2/IgE 応答が誘導される。Th2細胞が産生するIL-5の作用で全身性の好酸球増多症と肺好酸球性炎症が、Th2細胞が産生するIL-3とIL-9の作用で小腸粘膜肥満細胞増多症が、そしてIL-13の作用で小腸粘膜杯細胞増多がおこると考えられてきた。

現実には、Th2 応答が誘導される前(感染後3日～4日目頃)でも、肺での好酸球増多が起こる。この様な寄生虫感染でおこる肺炎は人ではLöffler 症候群といわれてきたが、その発症機序に関しては、尚も不明なままである。

次に、小腸粘膜肥満細胞の排虫作用であるが、IL-3とIL-9で活性化されるだけで十分排虫作用を発揮することが出来るのか、それともIgEとIgG1等で活性化されることが排虫作用を発揮する上で必要なのか、詳細な機序は不明なままであった。

## 2. 研究の目的

### (1)好酸球性肺炎の発症機序

腸管寄生虫感染で認める肺好酸球症はTh2細胞が産生するIL-5の作用と考えられた。ところが実際にはTh2細胞が誘導される前から肺好酸球性炎症が発症する。本研究は、Th2細胞非依存性に肺好酸球性炎症が起こるか、もし起こればそのメカニズムは何なのか、を解明することを目的とした。

### (2)IgG1とIgEの排虫促進機序

腸管寄生虫が感染するとTh2細胞が誘導され、IL-4の作用でIgG1とIgEの産生が、IL-3とIL-9の作用で小腸粘膜肥満細胞の増多が、そしてIL-13の作用で小腸粘膜杯細胞増多が起こる。本研究でIgG1とIgEの排虫促進作用とその効果発現機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)野生型 C57BL/6(B6)マウス、B6 バックの *Rag2* 欠損マウス、*IL-33* 欠損マウスに *Sv* の第3期幼虫を経皮感染させ、経時的に肺での好酸球浸潤と杯細胞増多を組織学的に検討した。あるいはキチンを経鼻投与し、同様の検討を行った。更に、これらの処置によって肺組織内で *IL-33* の産生が誘導されるか検討した。

(2)野生型の B6 マウスあるいは B6 バックの *AID* 欠損マウスに *Sv* を感染させ、IgG1とIgEの血中レベル、ならびに *Sv* の排虫状況を糞便中の寄生虫卵の数を測定することで検討した。

## 4. 研究成果

(1)はじめに *Sv* 感染で起こる肺好酸球症の発症に *IL-33* が重要な役割を果たす事を、*IL-33* 欠損マウスを用いて証明した。次に、肺において *IL-33* を発現している細胞が II 型肺胞上皮細胞 (ATII) であることを証明した。さらに、*Sv* 感染や、本寄生虫の虫体成分であるキチンを経鼻的に肺に投与した場合、ATII の

数や *IL-33* 発現量が増加することを明らかにした。また感染前後の肺を比較すると、野生型マウスでは *IL-5* と *IL-13* を産生する ILC2 が著明に増加しているが、この様な変化は *IL-33* 欠損マウスでは認められない事も明らかにした。最後に T 細胞 (Th2 細胞) も B 細胞も保有しない免疫不全マウス (*Rag2* 欠損マウス) でも、野生型マウスと同様に、ATII 細胞数が増加するとともに肺での *IL-33* 発現量が上昇し、肺内で ILC2 や好酸球数が増加して肺好酸球症を発症することを明らかにした。即ち、寄生虫はその構成成分であるキチンの作用で肺内で *IL-33* の産生を誘導する。次に、Th2 細胞が誘導されなくても、この *IL-33* に反応して ILC2 が誘導される。最後に、この *IL-33* 刺激を受けた ILC2 が *IL-5* と *IL-13* を産生して肺好酸球症を発症させる。更に、肺に集積した好酸球が *Sv* の傷害に関与することが示唆された。

(2)野生型B6マウスに *Sv* を感染させると、感染約 1 2 日目で *Sv* は排除される。そこで、感染マウスにおける IgG1 と IgE 産生のタイムコースを調べた。感染 1 0 日目ごろから血中 IgG1 と IgE が顕著に上昇し、それぞれ 1 4 日目にピーク値となる。本研究では、産生された IgG と IgE が *Sv* を排除するか否かを検討した。野生型B6とB細胞におけるクラススイッチが障害されている *AID* 欠損マウス (*AID* 欠損) に *Sv* を感染させた。B6 に比べ *AID* 欠損では *Sv* の排虫が約 10 日間遅れた。ところが、二度 *Sv* を感染させたマウスから得た過免疫血清を、*AID* 欠損マウスに感染 6 日目と 7 日目に計 2 回投与したところ、B6 よりも 2 日間も早く排虫を完了した。一方、*Nippostrongylus brasiliensis* に対する過免疫血清を *AID* 欠損マウスに投与しても、全く排虫の促進効果はなかった。次に、*Sv* 過免疫血清から IgG と IgE 分画を精製し、*Sv* を感染させた *AID* 欠損に感染 6 日目と 7 日目に計 2 回投与したところ、IgG と IgE の投与量依存的に *Sv* の排虫が促進された。更に遺伝子改変マウスを用い、IgG が低親和性 IgG 受容体 Fc RIII に作用して、また IgE が高親和性 IgE 受容体 Fc R1 に作用して腸粘膜肥満細胞を活性化することが明らかとなった。しかし、受容体の単独欠損マウスは正常な *Sv* 排除能を有していた。ところが、Fc RIII を欠損マウスに抗 Fc R1 抗体を投与すると、*Sv* 排除能が著しく低下した。同様に Fc R1 欠損マウスに IgG の Fc RIII への結合を阻害する抗 IgG 抗体を投与すると、*Sv* 排虫能が著しく低下した。以上の研究結果から、IgE が高親和性 IgE 受容体 Fc R1 に結合し、IgG が IgG 低親和性受容体 Fc RIII に結合することで肥満細胞を協調的に活性化して、*Sv* の排除にあたることが明らかとなった。

## 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)

(1) Muto T, Fukuoka A, Kabashima K,

- Ziegler SF, Nakanishi K, Matsushita K, Yoshimoto T. The role of basophils and pro-allergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously-sensitized food allergy. *Int immunol*, 2014, May; (査読有)  
DOI:10.1093/intimm/dxu058. [Epub ahead of print]
- (2) Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Futatsugi-Yumikura S, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K. Immediate-type contact hypersensitivity is reduced in interleukin-33 knockout mice. *J Dermatol Sci*. 2014 May;74(2):159-61. (査読有) DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.01.009.
- (3) Futatsugi-Yumikura S, Matsushita K, Fukuoka A, Takahashi S, Yamamoto N, Yonehara S, Nakanishi K, Yoshimoto T. Pathogenic Th2-type follicular helper T cells contribute to the development of lupus in Fas-deficient mice. *Int Immunol*, 2014;26(4)221-231.(査読有) DOI:10.1093/intimm/dxt070
- (4) Yasuda K, Matsumoto M, Nakanishi K. Importance of both innate immunity and acquired immunity for rapid expulsion of *S.venezuelensis*. *Front Immunol*.2014. 119(5),118, (査読有),DOI:10.3389/fimmu.2014.00118
- (5) Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Futatsugi-Yumikura S, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K. Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice. *Proc Natl Acad Sci of USA*. 2013;110(34):13921-13926, (査読有) DOI:10.1073/pnas.1307321110.
- (6) Matsumoto M, Sasaki Y, Yasuda K, Takai T, Muramatsu M, Yoshimoto T, Nakanishi K. IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. *Infect Immun*,2013;81(7) 2518-2527(査読有)DOI:10.1128/IAI.00285-13.
- (7) Fukuoka A, Futatsugi-Yumikura S, Takahashi S, Kazama H, Iyoda T, Yoshimoto T, Inaba K, Nakanishi K, Yonehara S. Identification of a novel type 2 innate immunocyte with the ability to enhance IgE production. *Int Immunol*, 2013;25 (6) 373-382.(査読有) DOI:10.1093/intimm/dxs 160.
- (8) Takahashi S, Futatsugi-Yumikura S, Fukuoka A, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yonehara S. Fas deficiency in mice with the Balb/c background induces blepharitis with allergic inflammation and hyper-IgE production in conjunction with severe autoimmune disease. *Int Immunol*, 2013;25(5)287-293. (査読有) DOI:10.1093/intimm/dxs109
- (9) Yoshimoto T, Nakanishi K. Generation and characterization of mouse basophils from bone marrow and purification of basophils from spleen. *Curr Protoc Immunol*. 2012 Aug;Chapter 3:Unit 3.24. DOI: 10.1002/0471142735.im0324s98.
- (10) Tsutsui H, Nakanishi K. Immunotherapeutic applications of IL-18. *Immunotherapy*, 2012;4,1883-1894. (査読有) DOI:10.2217/imt.12.137.
- (11) Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):184-94.e11. (査読有) DOI: 10.1016/j.jaci.2012.02.013. Epub 2012 Mar 27.
- (12) Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 28;109(9):3451-6. (査読有)DOI: 10.1073/pnas.1201042109. Epub 2012 Feb 13.
- (13) Nakahira M, Nakanishi K. Requirement of GATA-binding protein 3 for IL13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. *Int Immunol*. 2011 Dec;23(12):761-72. (査読有) DOI: 10.1093/intimm/dxr087. Epub 2011 Oct 29.
- (14) Tsutsui H, Mizutani H, Nakanishi K. Contribution of interleukin 18 to the development of infection-associated atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol*. 2011;41:93-103. (査読有) DOI: 10.1159/000323302. Epub 2011 May 12
- 和文総説
- (15) 安田好文, 中西憲司. IL-33 と IL-18, 分子消化器病, 11(1)82-87, 2014(査読無)
- (16) 武藤太一郎, 安田好文, 中西憲司. 【膠原病とアレルギー】自然免疫系のリンパ

球 Innate Lymphoid cells とアレルギー疾患, アレルギーの臨床. 34(1)22-27, 2014 (査読無)

- (17) 安田好文, 中西憲司. アレルギー性延長における IL-18 と IL-33 の役割, 炎症と免疫, 21(5)444-449, 2013(査読無)
- (18) 中西憲司. 自然免疫による好酸球性肺炎発症機構, 医学のあゆみ, 243(1)91-97, 2012(査読無)

[学会発表](計 19 件)

国際学会

- (1) Nakanishi K. Importance of Both Innate Immunity and Acquired Immunity for Rapid Expulsion of *S.venezuelensis*. 15th International congress of immunology, 2013.8.26, Mico-Milano Congressi, Milan, Italy.
- (2) Yasuda K, Muto T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Yoshimoto T, Nakanishi K. Contribution of IL-33 activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. 15th International congress of immunology, 2013.8.26, Mico-Milano Congressi, Milan, Italy.

国内学会

- (3) 中西憲司. IL-1 ファミリーサイトカインと炎症, 第 26 回日本外科感染症学会総会, 2013 年 11 月 25 日, 神戸国際会議場
- (4) 松本真琴, 安田好文, 善本知広, 中西憲司. ヴェネズエラ糞線虫初期感染における抗体依存性排除機構について. 第 69 回日本寄生虫学会西日本支部大会, 2013 年 10 月 20 日, アルファあなぶきホール
- (5) Yasuda K, Wang X, Nakahira M, Yang J, Nakanishi K. IL-18 and TGF synergistically induce IL-9 production from Th1 cells. 第 78 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2013 年 5 月 20 日, 都市センターホテル
- (6) 中西憲司. Type II Innate Cell とアレルギー炎症, 第 42 回日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会総会学術大会, 2012 年 7 月 14 日, 軽井沢プリンスホテルウエスト
- (7) 中西憲司. アレルギーに関与する基礎免疫の進歩 1-IL18 と IL-33 で誘導されるアレルギー性炎症, 第 24 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 2012 年 5 月 12 日, 大阪国際会議場
- (8) Matsumoto M, Sasaki Y, Yasuda K, Muramatsu M, Honjo T, Nakanishi K. Antibody-mediated expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 7 日, 神戸国際会議場

[図書](計 2 件)

- (1) 吉田裕樹, 中西憲司. サイトカインとケモカイン, 免疫学コア講義 改訂 3 版, 熊ノ郷淳, 阪口薫雄, 竹田潔, 吉田裕樹編, 101-107, 南山堂, 2012 年(査読有), <http://www.nanzando.com/viewer/16753/index.html>
- (2) 安田好文, 中西憲司. Th2 アジュバントの作用機序と臨床応用, アジュバント開発研究の新展開, (監修)石井健・山西弘一, 32-38, シーエムシー出版, 2011 年(査読有), [http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product\\_id=3840](http://www.cmcbooks.co.jp/products/detail.php?product_id=3840)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

- 名称 : アトピー性皮膚炎モデル動物およびその用途  
発明者 : 山西清文, 水谷仁, 今井康友, 善本知広, 中西憲司.  
権利者 : 同上  
種類 : 特許  
番号 : 特願 2013-96637  
出願日 : 2013 年 5 月 1 日  
国内外の別 : 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 憲司 (NAKANISHI, KENJI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 60172350

(2) 研究分担者

安田 好文 (YASUDA, KOUBUN)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 50333539

松本 真琴 (MATSUMOTO, MAKOTO)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 40380521