

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590497

研究課題名(和文)慢性感染成立に寄与する消化管寄生線虫成分と宿主免疫応答

研究課題名(英文)Host immune responses and parasite derived substances associated with the establishment of chronic infection

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの身体には病原体を認識して排除する“免疫”が備わっているにも関わらず、消化管の寄生虫は長期間、寄生(感染)し続ける。この不思議な現象がどのようにして起きているのかを、マウスを用いて研究した。その結果、長期間寄生し続ける(慢性感染する)寄生虫の感染を受けたマウスは、感染の早い段階から免疫応答が抑えられているようであった。それは寄生虫由来の物質によって誘導されていることが考えられたが、どのような物質であるかは、未だ解析が終了していない。

研究成果の概要(英文)：Although human body has an immune system which recognizes and rejects foreign pathogens, intestinal parasites establish in the gut for a long time; i.e. chronic infections. The mechanism of the infection was examined by mice model. Results suggested that the mouse immune response was suppressed at the very early phase of the infection. Parasite derived substances, such as excretory-secretory products, were thought to cause the suppression, however, the analysis is still in process.

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：消化管寄生虫 慢性感染 宿主免疫応答 寄生虫成分 樹状細胞 粘膜免疫 蠕虫

1. 研究開始当初の背景

ヒトの消化管寄生線虫感染は慢性に経過し、依然として世界的に重要な問題である (Bethony-J et al. 2006)。マウスの実験結果からは、寄生線虫の排除がタイプ2サイトカインの IL-4、IL-13 とその受容体およびそのシグナル伝達分子 Stat6 に大きく依存していることが示され、一方で IL-4 産生抑制など Th2 応答発現の遅延が慢性感染に関与すると考えられている (Anthony-R et al. 2007)。Th2 応答の発現機序は未だ明らかにされていないが、T 細胞の活性化には樹状細胞による抗原提示とともに補助刺激分子やサイトカインの刺激が不可欠である。また、制御性 T 細胞 (regulatory T cells; 以下 Treg) による調節もなされている。

我々はこれまで、マウスの寄生虫感染系のうち急性に感染が終息する *Nippostrongylus brasiliensis* (以下 Nb) を用いて Th2 応答を解析してきた。一方、慢性に移行する *Heligmosomoides polygyrus* (以下 Hp) 感染では初期の Th2 応答が遅く、また Treg の活性化が報告されている。

マウスの消化管寄生線虫感染モデルの多くは感染後 2 週前後に感染が終息することから、感染後 2 週までの免疫応答が急性/慢性を分けていると推察される。この期間に寄生虫が免疫応答細胞としての樹状細胞と T 細胞にどのように作用し、どのような T 細胞群が応答しているのか？そして、それらの応答にどのような分子が関与しているのか？2 週を越える寄生を誘導する寄生虫成分は何なのか？これらを明らかにすることで慢性感染の成立メカニズムが理解できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、「なぜ慢性感染するのか？」に対する回答を得るために行う。

このために、マウスの小腸に慢性感染する Hp と急性感染に終わる Nb を用いて、1) 慢性感染と急性感染における樹状細胞と T 細胞の、フローサイトメトリーを中心とした比較解析で、感染初期あるいは慢性感染期の Hp 感染に特徴的な細胞あるいは分子の特定、2) Hp 感染に特徴的な細胞を欠失させた状態をマウスで作成し、そのマウスにおける Hp 感染動態の検討、3) 虫体成分のうち、前項の特徴的な細胞を誘導する成分の同定を予定した。

3. 研究の方法

実験動物：急性感染の先行実験で使用した BALB/c マウス、7 週齢雄を使用した。  
 フローサイトメトリーによる解析：腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph nodes; 以下 MLN) から細胞浮遊液を作成し (Ishiwata-K et al. 2010)、Fc ブロック処理後、蛍光標識モノクローナル抗体 (BD Biosciences および eBiosciences) を反応させた。解析は

FACSCalibur (Becton Dickinson) あるいは MACS Quant (Miltenyi Biotec) を用いた。固有層からの浮遊細胞の作成は Uematsu-S et al. 2008 の方法に従った。

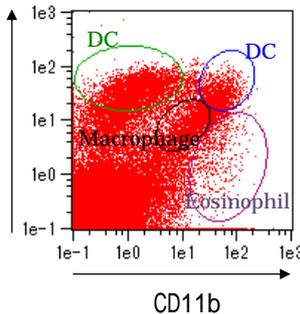
寄生虫成分の回収：寄生虫の排泄分泌産物 (Excretory-Secretory products; 以下 ES 産物) は、宿主免疫を刺激する寄生虫抗原の一部であり、抗原性において特異性が高いと言われている。Hp および Nb の成虫を培養液 Dulbecco's Modified Eagle Medium (high glucose, Gibco) 中で 37 一晚培養し、培養液内に放出されたタンパクを ES 産物とした。寄生虫の切片作成：寄生虫を O.C.T. Compound (Tissue-Tek) 内で液体窒素にて急速に凍結して、クリオスタットで切片を作成した。薄切後、冷アセトンで 10 分間固定し、解析まで 4 保存した。

4. 研究成果

(1) フローサイトメトリーによる解析

DC の変化

急性に感染が終息する Nb 感染においては、Nb の腸管定着後 1 日に MLN 内の樹状細胞 (CD11c 陽性; 以下 DC) 上の MHC class II および CD86 分子の発現増強が認められた; MHC class II は抗原ペプチドを T 細胞に提示する分子、CD86 は補助刺激分子である。T 細胞の活性化はその翌日より認められた。Nb は感染後 10 日に小腸より排除される (急性感染の所以) が、同 8 日にはまだ定着している。にもかかわらず、両分子の発現は一過性に増強した後、減弱に転じた。感染後 8 日の DC は、同 4 日 (腸管定着後 1 日) の DC に比して Nb 感染に対する免疫記憶 T 細胞の増殖能が有意に低いが、MHC class II の発現に最も深く関わる CIITA 遺伝子発現に有意な差は認められなかった。一方、初感染が 7~8 週と持続する Hp 感染 (慢性感染の所以) においては、DC の活性化を明瞭に認めず、また MHC class II の発現低下の程度が Nb 感染よりも早期に、強く認められた。MHC class II の低下をきたす細胞群を洗い出すために、Uematsu-S et al. 2008 を参考に MLN の B220 陰性細胞を CD11c と CD11b の発現パターンで解析した。これによって、CD11c<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> の DC、CD11c<sup>high</sup>CD11b<sup>low</sup> の DC、さらに CD11c<sup>int</sup>CD11b<sup>int</sup> のマクロファージ、CD11c<sup>int</sup>CD11b<sup>high</sup> の好酸球に分けられた (下図)。これらの細胞群はいずれも MHC class II を発現しているが、リンパ節への遊走に重要な CCR7 の発現は CD11c<sup>high</sup>CD11b<sup>low</sup> の DC の一部 (以下; DC1) が最も強く、次いで CD11c<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> の DC、マクロファージ、好酸球の順であった。DC1 は、MHC class II 発現も最も高い。これ



ら細胞群は、感染経過に伴い MHC class II 発現を低下させていた。しかしながら、MHC class II 発現細胞の割合としては、マクロファージ、次いで好酸球が多くなり、未感染時に発現強度、数ともに優位であった DC はその数を激減させた。この変化は Hp 感染で顕著であった。以上のことから、MLN においてはプロフェッショナルな抗原提示細胞である DC によってナイーブ T 細胞が活性化し、Th2 応答が発現した後の免疫応答持続のための抗原提示はマクロファージ、感染によって MLN に集簇してくる好酸球(ともに CCR7 の発現が高い)によって担われることが示唆された。さらに、この変化が Hp において顕著であったことから、慢性感染への移行に大きく関与していることが予想された。

#### 腸管固有層での DC 変化

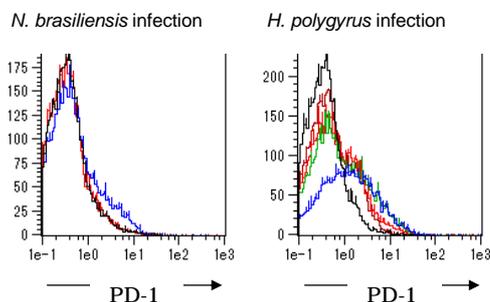
Nb は腸管粘膜上に定着するが、Hp の感染幼虫は一旦小腸粘膜下組織へ侵入し、その 8 日後に腸管腔に再び出て、粘膜上に定着する。この感染初期の寄生部位の違いが宿主免疫応答に反映されている可能性がある。また近年、腸管粘膜上皮間にも M 細胞が存在することが明らかとなり、固有層においても免疫応答がなされていることが示唆されている。これらを考慮して、腸管固有層における樹状細胞の変化を検討した。未感染時の腸管組織からは前述した細胞群が分離されたが、感染時の組織からの分離は困難であった。予備的な結果からは、固有層の DC に MHC class II 発現低下は認めなかった。

#### Treg 応答

Hp 感染によって Treg が発現してくることが知られているが、その時期は研究グループによって異なる。また、Treg には内因性と誘導性が存在するが、どちらが応答しているかは明らかではなかった。Hp 感染での Treg 応答を CD4 陽性 CD25 陽性細胞について Helios と Foxp3 の発現で解析したところ、内因性 Treg は増加を認めたが誘導性 Treg は減少傾向を示した。

#### T 細胞における抑制性分子の発現

免疫応答を調節するための抑制性分子は、T 細胞上に CTLA-4 および PD-1 などが認められている。今回、CD4 陽性 T 細胞上の PD-1 発現を検討した(下図: 黒; 感染 0 日、茶; 同 2 日、赤; 同 4 日、緑; 同 6 日、青; 同 8 日)。



PD-1 発現は Nb 感染後 8 日に亢進を認めた。一方、Hp 感染では感染後 2 日より発現亢進を

認め、同 8 日まで増強され続けた。さらにこれと経過を同じくして、CD4 陽性 T 細胞のリンパ球における割合が減少した。

#### (2) 寄生虫成分の分析

抗原特異性の高い寄生虫の ES 産物を質量分析にかけ、Hp および Nb の EST データベースを利用して分子同定を進めている。また、Hp については虫体切片を作成し、顕微鏡下で寄生虫の各部位の成分を質量分析にかけた; FlexImaging(Bruker)による解析。これらの解析については、現在進行中である。

#### (3) 得られた成果の意義と今後の展望

消化管寄生線虫感染において、その主な免疫応答の場である MLN では、適応免疫の主軸である T 細胞への抗原提示の担い手が時系列的にシフトしていることを明らかにできた。この応答は T 細胞への刺激後、寄生虫の排除に関係なく早い段階で抑制的に働くようになり、その早さと強度および感染部位が慢性感染への移行に影響すると考えられた。解析が未完であるが、これに寄生線虫の ES 産物が関わっていることが他の研究グループからの報告でも支持されてきている。この予想外の成果は、免疫応答の初動と調節に種々の細胞が入れ替わりながら関わっていることを具体的に示したものとして、その理解に大きく貢献したと考える。さらにこれを基に感染の慢性化を破綻させる具体的な方策が見出されてくることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 7 件)

Ishiwata-K. Antigen-presenting cell responses of mesenteric lymph nodes in mice infected with a gastrointestinal nematode, *Nippostrongylus brasiliensis*. 13<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells, 2014 9 14-18, Loire Valley, France

石渡賢治. 消化管寄生線虫の急性感染と慢性感染の混合感染による相互作用. 第 83 回日本寄生虫学会大会, 2014 3 28, 松山市

Ishiwata-K. Antigen-presenting cell responses in mesenteric lymph nodes of mice infected with gastrointestinal nematodes. 日本免疫学会総会・学術集会, 2013 12 13, 千葉市

石渡賢治. 腸管寄生線虫感染における所属リンパ節樹状細胞の応答. 第 82 回日本寄生虫学会大会, 2013 3 29, 東京都

石渡賢治. 寄生虫感染における腸管免疫の進歩. 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会,

2012 9 16, 東京都

石渡賢治. 腸管内寄生蠕虫感染における  
宿主免疫応答. 日本大学生物資源科学部動  
物医科学研究センターセミナー, 2011 9 27,  
藤沢市

石渡賢治. *Nippostrongylus brasiliensis*  
感染マウスにおける腸間膜リンパ節の免疫  
応答. 第 81 回日本寄生虫学会大会, 2012 3  
24, 西宮市

〔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  
<http://www.jikei-tropmed.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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