

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：21301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450469

研究課題名(和文) 線虫感染防御応答の初期ステージに関与する細胞の役割とその連携機構の解明

研究課題名(英文) The role and networks of immune and nonimmune cells in the small intestine in the early stage of gastrointestinal parasite infection.

研究代表者

森本 素子 (MORIMOTO, Motoko)

宮城大学・食産業学部・教授

研究者番号：30250301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：消化管粘膜では、リンパ球のほか自然免疫系の細胞や腸管上皮・平滑筋細胞などが連携して生体防御に重要な役割を果たしている。本研究では、線虫感染マウスモデルを用いて、感染初期ステージの消化管粘膜局所のさまざまな細胞の役割とその連携機構を調べた。その結果、感染直後は自然リンパ球が最初に活性化して2型サイトカインを大量に産生するが、その後収束し、続いてTh2の活性化が始まることが示唆された。自然リンパ球の活性の収束にはIFN γ が重要な役割を果たす可能性が考えられた。一方、メモリー応答では感染直後からTh2が主要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The coordinated actions of lymphocytes, innate immune cells, epithelium, and smooth muscles can play an important role in host intestinal immune function and homeostasis. We investigated type2 immune responses in early stage against nematode parasite in the murine intestine. The results suggested that innate immune cells initiate production of type2 cytokines, communicate with other immune cells including T cells and mediate adaptive pathogen-specific immune responses to eliminate pathogens. IFN γ might regulate the termination of innate immune responses in the early stage. While, Th2 play mainly in memory responses against re-infection of nematode parasite.

研究分野：動物免疫学

キーワード：線虫 2型サイトカイン 樹状細胞 小腸 T細胞

1. 研究開始当初の背景

感染防御システムにおいては、迅速に適切な免疫応答を開始し、必要な免疫細胞や分子を誘導して病原体を排除するための細胞間ネットワークが非常に重要である。不十分・不適切な応答が起これば、感染が成立するだけでなく、宿主組織に損傷を与えることもある。慢性炎症性疾患やアレルギーなど多くの疾患にはこのような不適切な免疫応答が関与していることが多いが、その解決のためには生体内で起こっている免疫応答を正確にとらえることが大前提となる。げっ歯類の消化管内寄生線虫である *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) は小腸粘膜下にシストを形成し、感染局所における免疫応答を調べるのに非常にすぐれたモデルであり、本モデルを用いて 2 型免疫応答の機序の詳細が解明されてきた。Hp を排除するためには、感染初期に適切な免疫応答を誘導することが不可欠であるが、これまでその主役は 2 型ヘルパー T 細胞(Th2)とされてきた (Paul WE & Zhu J. Nat Rev 2010)。しかし、最近、ナチュラルヘルパー (NH) 細胞をはじめとする自然免疫系の細胞(ILCs)が、2 型免疫応答の初期ステージに極めて重要な働きをすることが報告され (Moro K, et al. Nature 2010) さらに、粘膜上皮細胞や平滑筋細胞のような非免疫細胞についても、生体防御に関する分子メカニズムが解明されつつある。すなわち、感染体の存在する粘膜局所では、多種類の細胞がオーケストラのように相互作用して、感染体の排除に働いていると考えられるが、その全貌は明らかになっていない。特に、自然免疫系から獲得免疫系への細胞間連携の重要性は明白であるが、その機序は未だ解明されていない。また、プライマリー応答(初感染)とメモリー応答(再感染)の違いも明らかでない。

申請者は、これまでに種々の線虫感染モデルマウスを用いて腸管生理学の視点から小

腸の機能的変化を検討してきた (Morimoto M. et.al. J. Immunol. 2004, 2006, 2009)。腸管は食物や細菌などさまざまな非自己成分に対応する特殊な臓器であるため、極めて複雑な応答を適切に行う必要がある。したがって、その全貌を明らかにするためには、個々の細胞の応答をとらえることはもちろん、感染体のアプローチから排除に至るまでの生体の防御機構を複合的に考察する必要がある。Hp 感染系はその解明のために最も優れたモデルの一つである。

2. 研究の目的

感染初期ステージは感染体を排除できるか否かのカギをにぎる重要な過程である。前述のように、2 型免疫応答に関する自然免疫系の細胞が次々に発見され、寄生虫感染防御やアレルギー疾患の機序解明への期待が高まっている。しかし、自然免疫系から獲得免疫系の発動には免疫細胞だけでなく、上皮などの非免疫細胞も関与しており、これらの各種細胞のクロストークについては未だ不明な点が多い。本研究では、線虫感染マウスモデルを用いて、感染初期の消化管粘膜局所のさまざまな細胞の役割とその連携機構を明らかにし、2 型免疫応答の誘導メカニズムを解明することによって、寄生虫コントロールやアレルギー疾患の予防・治療に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 樹状細胞の関与：Th2 応答の開始に樹状細胞がいかに関与するのかを明らかにするため、免疫恒常性の維持に重要であるとされるペア型イムノグロブリン様受容体 (PIR) のうち、抑制機能を持つ PIR-B 欠損マウスを用いて Hp を感染させた。2 型免疫応答の誘導における樹状細胞の関与について、特に B7 や OX40 については報告があるが、PIR-B がどのように関与するのかということにつ

いては、これまで全く調べられていない。そこで、Hp を感染させた PIR-B 欠損マウスを感染初期に経時的にと殺し、小腸および腸管膜リンパ節を採取して IL-4, IL-13, IFN γ IL-6, IL-10 などのサイトカイン遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。また、小腸および腸管膜リンパ節の凍結切片を作成し、集積する免疫細胞のフェノタイプを免疫染色によって同定した。さらに、小腸粘膜下の免疫細胞を採取してフローサイトメトリ法を用いてフェノタイプを解析した。また、虫が排除されるかどうか調べるため、小腸粘膜に残った虫をカウントした。

(2) 上皮細胞と T 細胞の活性化: NH 細胞に関するこれまでの報告では、線虫感染の非常に初期に NH 細胞を含む自然免疫系が活性化し、IL-13 の産生を始めることが示されている。NH 細胞の活性化は IL-33 や IL-7 依存的であり、そのソースは上皮細胞と考えられるが、少なくとも線虫が小腸に達して上皮に接触する前にそのような活性化がどこから起こるのかは非常に疑問である。そこで、Hp の 3 期幼虫を Balb/c マウスに経口的に感染させ、感染直後から経時的にと殺して小腸の凍結ブロックを作成し、LCM 法を用いて上皮細胞を採取した。そこから RNA 抽出後 cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を用いて、IL-33, IL-25 などの遺伝子発現定量解析を行った。同時に、病理切片を作成してヘマトキシリンエオジン (HE) 染色により線虫が粘膜にアプローチする時点を確認し、サイトカイン産生の時間経過と比較した。

(3) 再感染時の応答: Hp は初感染では持続感染となるが、薬剤にて虫を排除したのち再感染させると、迅速で強力な 2 型免疫応答が起こって虫が排除される。この違いはどこから生じるのか。研究代表者は再感染時の応答には特に感染初期の 4 日目までの応答が重要であることを報告しているが (Morimoto M. et al. J. Immunol. 2004)、感染直後から 4

日目までの詳細については明らかにしていない。そこで、Hp の再感染モデルを作成し、同様の実験を行ってメモリー応答における各種細胞の役割を検討した。具体的には、初感染 14 日後に駆虫剤 (コンバントリン) 2mg を投与し、50 日後に再感染を行って、その後経時的にサンプリングを行った。

4. 研究成果

(1) 樹状細胞の関与: 消化管内寄生虫である Hp がマウスに感染すると T 細胞は Th2 細胞へと分化し、Interleukin (IL) -4 や IL-13 などの 2 型サイトカインの増大によって Hp の排除が起こる。本研究では、この 2 型免疫応答の初期ステージに関わる細胞として樹状細胞の働きに着目した。樹状細胞は侵入した病原体を補足し、抗原提示によって適切な免疫応答を開始するに必須の細胞である。しかし PIR-B をノックアウトしたマウスでは樹状細胞の成熟が阻害される。PIR-B は PIR-A と対を成して免疫細胞上に存在する受容体の一つであり、PIR-B を欠損したマウスでは未熟な樹状細胞により炎症性サイトカインである IL-12 が十分に産生されず、免疫応答が Th2 型へと偏ることが報告されている。

そこで、PIR-B^{-/-}マウスに Hp を感染させ、小腸におけるサイトカイン遺伝子の発現を解析したが、2 型サイトカインである IL-4, IL-13, IL-10 発現について PIR-B^{-/-}マウスと PIR-B^{+/+}マウスに有意な差はなく、Th1 サイトカインである IFN- γ , IL-6 についても同様であった。また、シスト周辺に集積する免疫担当細胞 (好中球、CD4⁺T 細胞、樹状細胞) にも差は見られなかった。

次に、Hp をいったん駆虫し、再感染させた後、IL-4, IL-13, IL-10 の発現を調べたところ、IL-4 および IL-10 は 4 日目でピークを迎え、7 日目では発現が低くなっていたが、PIR-B^{-/-}マウス、PIR-B^{+/+}マウス間に有意な

差は見られず、他の1型サイトカインについても同様であった。

以上のことから、樹状細胞が未成熟な状態であっても、Hpの初感染および再感染後に誘導される2型免疫応答は阻害されないことがわかった。

(2) 上皮細胞とT細胞：消化管内寄生虫であるHpがマウスに感染するとT細胞はTh2細胞へと分化し、IL-4やIL-13などの2型サイトカインの増大によってHpの排除が起こる。そこで、感染直後から8日目までのサイトカイン産生の変動と消化管上皮の働きについて解析した。

Balb/c (8週齢)マウスにHpを経口感染させ、感染直後から経時的(Day0,1,2,3,4,5,8)に腸間膜リンパ節と小腸を採取して種々の解析を行った。その結果、小腸では、感染直後からIL-4、IL-13、IL-33遺伝子の発現が一時的に上昇した後、減少し、さらに4、5日目から再び上昇する一方(図1) IL-25、TLR2、TLR4は変動しないことがわかった。

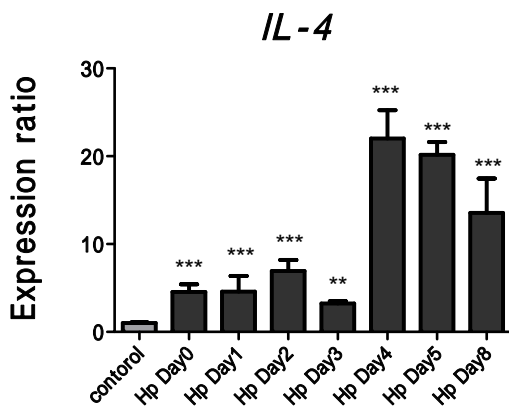


図1. 小腸におけるIL-4遺伝子の発現

また、HE染色による小腸組織の病理学的解析により、感染3日目からシストが形成されていることを確認した。さらに、蛍光免疫染色により、シスト周辺におけるCD4陽性細胞の集積は感染3日目から徐々に始まり、感染8日目に最大となることが確認された。

一方、腸間膜リンパ節でIL-4、IL-13の遺伝子発現が始まったのは感染4日後になって

からであり、CD4/25陽性細胞の割合も5日目になって上昇を示した(図2)。腸間膜リンパ節から分離した腸間膜リンパ節細胞を培養した結果、感染後4日目からIL-4の産生が起こることが確認された(図3)。

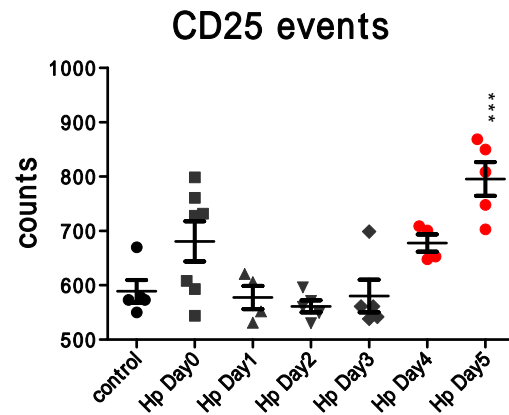


図2. 腸間膜リンパ節におけるCD4+CD25+細胞の数

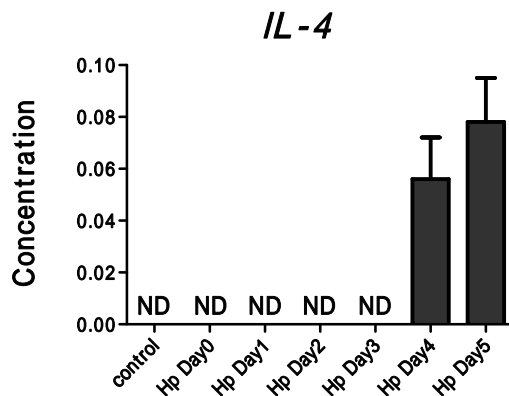


図3. 腸間膜リンパ節細胞のIL-4遺伝子の発現

LCM法により採取した小腸上皮の解析の結果、IL-33の産生は感染直後(Day0~2)に見られることも確認された。虫体のシスト形成および腸間膜リンパ節細胞の活性化以前に小腸粘膜下にサイトカイン産生を誘導する機序については、今後さらに解析する必要がある。

一方、本研究の期間中に、線虫感染の初期ステージに重要とされる自然リンパ球はIFN γ によりその作用が抑制されるという報告があった。そこで、初回感染のゼロ日から8日目までの小腸組織におけるIFN γ の発現

を調べたところ、興味深いことに感染2日目に非常に強い発現が見られ、その後減少し、5日目から8日目には非感染レベルに推移することがわかった(図4)。したがって、初回感染の初期ステージではまず自然リンパ球が活性化して2型サイトカインを大量に産生するが、感染2日目以降に増大するIFN γ によりその活性が抑制され、続いてTh2の活性化が始まる可能性が考えられた。

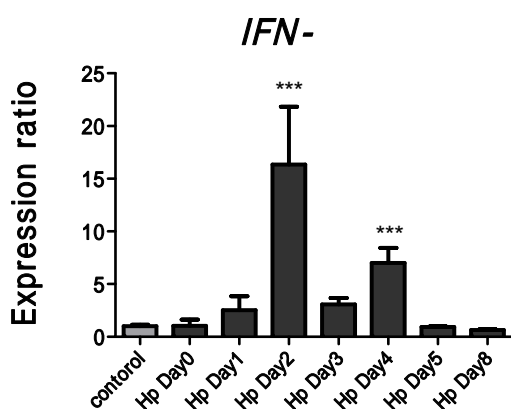


図4. 小腸におけるIFN γ 遺伝子の発現

(3)再感染時の応答：げっ歯類の消化管寄生線虫であるHpは、初感染では持続感染となるが、薬剤にて虫を排除したのち再感染させると、迅速で強力な2型免疫応答が起こって虫が排除される。最終年度は、この再感染モデルを作成してサイトカイン遺伝子の発現と小腸粘膜下に集積する細胞群のフェノタイプについて調べた。その結果、腸間膜リンパ節において、初感染時には感染4日目以降に見られたIL-4およびIL-13の発現上昇は、再感染時には2日目に確認され、初感染時よりもTh2の活性化が早く始まっていることが示唆された。また、再感染時は感染4日後にはすでに多数のCD4陽性細胞が小腸粘膜下に集積しており、メモリー応答ではTh2が感染直後の初期ステージから主要な役割を果たしている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2 件)

1. Impairment of Host Resistance to Helminthes with Age in Murine Small Intestine. Morimoto M, Saito C, Muto C, Akamatsu Y, Chiba T, Abe T, Azuma N, Suto Y. Parasite immunology 37(4):171-9, 2015.
DOI: 10.1111/pim.12170 (査読有)
2. 消化管線虫感染によって誘導される2型免疫応答の機序. 森本素子, 獣医寄生虫学会誌 12(1) 51-60 2013年9月 (査読有)

(学会発表)(計 8 件)

1. Motoko MORIMOTO, Age-related Changes in Host Resistance to Helminthes in Murine Small Intestine. 第9回寄生虫感染免疫研究会、2016年2月11-12日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
2. Motoko MORIMOTO, Age-related Changes in Host Resistance to Helminthes in Murine Small Intestine. 第44回日本免疫学会総会・学術集会、2015年11月18-20日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
3. 森本素子, 線虫感染によって誘導される2型免疫応答の初期ステージ 第2報 新實香奈枝, 第158回日本獣医学会学術集会 2015年9月7-9日、北里大学(青森県十和田市)
4. Motoko Morimoto, Noritsugu Azuma, Tatsuya Abe and Yoshiko Suto, Regulation of type 2 diabetes by helminth-induced Th2 immune responses. 17th International Congress of Mucosal Immunology 14-17 July, 2015 Maritim Hotel (Berlin, Germany)
5. Motoko MORIMOTO, The effect of dietary selenium deficiency on Th2 immune responses against nematode infection. 第43回日本免疫学会総会・学術集会 2014年12月10-12日、国立京都国際会館(京都府京都市)
6. 新實香奈枝, 須藤佳子, 石塚魁, 菊地愛美, 川辺玲奈, 森本素子, 線虫感染によ

って誘導される 2 型免疫応答の初期ステージ. 第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月 9 - 12 日、北海道大学 (北海道札幌市)

7. 森本素子、高井俊行 PIR-B plays a limited role in Primary and Memory Th2 Response against Helminth Infection. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会 2013 年 12 月 11-13 日、幕張メッセ (千葉県千葉市)
8. Motoko Morimoto, Shohei Abe, Noritsugu Azuma, Sayaka Kamei, Kanami Dewa, The effects of astaxanthin in improving age associated declines of Th2 immune responses. 15th International Congress of Immunology, Aug22-27,2013, Milano Connessi (Milan, Italy)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森本 素子 (MORIMOTO MOTOKO)

宮城大学・食産業学部・教授

研究者番号 : 30250301

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

高井 俊行 (TAKAI TOSHIYUKI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号 : 20187917