

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460521

研究課題名(和文) 糞線虫感染に伴うレフレル症候群の発症意義の解明

研究課題名(英文) A role of Loeffler syndrome in Strongyloides-infected mice.

研究代表者

安田 好文 (YASUDA, Koubun)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50333539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糞線虫(Sv)に感染すると肺好酸球症を発症するが、この時グループ2自然リンパ球(ILC2)もIL-33依存性に集積し、さらに感染排除後まで残存する。このILC2は次にSvと異なる寄生虫(Nb)の感染にさらされた時、早期に大量のIL-5、IL-13を産生して好酸球を肺に集積させ、活性化することでNbに対する抵抗性を宿主に賦与する。この抗原非特異的耐性獲得は生体が寄生虫浸淫地域で生活する上で重要な自然免疫システムであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When host animals develop lung eosinophilic inflammation by Strongyloides(Sv) infection, the number of group 2 innate lymphoid cells(ILC2) also increase in the lung dependently on IL-33, and sustain even after the expulsion of parasite is completed. If the host infected secondary with other species of nematode(Nb), the residual ILC2s promptly proliferate and produce IL-5 and IL-13 to accumulate and activate eosinophils in the lung, which make the hosts resistant against Nb. This study demonstrates Sv-infected hosts acquire an antigen-nonspecific resistance, which is a benefit for the host animals to live in an area where multiple parasites spread.

研究分野：免疫学

キーワード：自然免疫 寄生虫免疫 自然リンパ球 好酸球性肺炎

1. 研究開始当初の背景

回虫や鉤虫、糞線虫のような腸管寄生線虫は、宿主に経口あるいは経皮感染すると一旦血行性に肺へ移動するものがある。これらの寄生虫は肺に来ると肺胞に出て、気道から咽喉を経て小腸へ達し、ここで成虫となり産卵する。この時、肺に好酸球の集積を特徴とするレフレル症候群が発症する。しかし、その炎症のメカニズムは長らく不明であった。虫体成分に対するアレルギー反応であるとも考えられてきたが、ヌードマウスでも発症することが示されており、何らかの自然免疫応答であると推測される。またこの好酸球性炎症の特徴は、線虫が肺からいなくなった後までも持続的に炎症が続くことである。申請者はこの疾患の発症機構を解明するため、糞線虫感染に応答して働く自然免疫の因子として上皮細胞の産生するサイトカインである IL-33 について特に注目した。

我々は IL-33 を経鼻投与すると肺でレフレル症候群同様の变化を誘導できることや、好塩基球や IL-5 で刺激された好酸球に IL-33 の受容体である ST2 が発現すること、さらに IL-33 で刺激することで IL-4 やケモカインを産生することを明らかにした (Kondo, **Yasuda**, *Int Immunol.* 2008、Matsubaki-Kitamura, **Yasuda**, *Int Immunol.* 2010)。最近の研究では、グループ 2 自然リンパ球 (innate lymphoid cells; ILC2) も IL-33 に反応して大量の IL-5 や IL-13 を産生する (Moro, *Nature* 2010, Neill, *Nature* 2010) ことが明らかとなっている。また我々は寄生虫外皮の主成分であるキチンが、Jmjd3-IRF4 を介して M2 マクロファージを誘導し、好酸球浸潤を誘導することも報告した (Satoh, **Yasuda**, *Nat. Immunol.* 2010)。おそらく幼虫の感染後、肺に到達した際にそこで虫体のキチンの作用で M2 マクロファージが誘導されると推測できる。また、IL-33 欠損マウスを用いてヴェネズエラ糞線虫 (*Strongyloides venezuelensis*; Sv) 感染により誘導される好酸球性肺炎の誘導機構について解析したところ、宿主の肺では感染によって型肺胞上皮細胞に IL-33 が発現誘導されること、そして IL-33 によって ILC2 が肺に増加し、Th2 サイトカインを産生することで好酸球性炎症を引き起こすことを明らかにし、長年不明であったレフレル症候群の発症機序を解明した (**Yasuda**, *PNAS.* 2012) (図 1)。しかし、その詳細な発症機序や発症の意義は未だ不明のままである。

本研究ではこれを明らかにするため、IL-33 や ILC2 の産生するサイトカインの上皮細胞への働きを調べ、好酸球性炎症発症と排虫における役割を検討した。ついで、寄生虫感染によって誘導される IL-33、ILC2、好酸球のそれぞれについて、寄生虫感染防御における役割を、特に 2 次感染を中心に検討した。

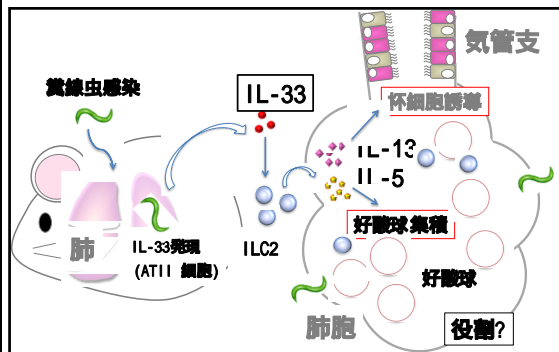


図 1 糞線虫感染による好酸球性肺炎発症機序 糞線虫が感染すると、幼虫が肺を通過する際に型肺胞上皮細胞(ATII)から IL-33 を産生させる。IL-33 は ILC2 を肺に集積させ、さらに IL-5 や IL-13 産生を誘導する。これらの働きで好酸球が肺に集積する。

2. 研究の目的

糞線虫感染症患者ではレフレル症候群と呼ばれる好酸球増多を主体とした肺炎を併発する。本研究では、感染後に誘導される IL-33 と型リンパ系細胞、好酸球の働きを上皮細胞に対する作用、寄生虫感染防御の 2 つの観点から解析し、レフレル症候群の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) C57BL/6, IL-33 欠損マウス、野生型 / IL-33 欠損骨髄キメラマウス、野生型 / ST2 欠損骨髄キメラマウスにげっ歯類の糞線虫 *Strongyloides venezuelensis* (Sv) 幼虫を皮下投与により感染させた。
- (2) 非感染、Sv 感染 1 ヶ月後のマウスに *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) 幼虫を皮下投与により感染させた。2 日後に頸椎脱臼により安楽死させ、肺を採取し、肺中に含まれる Nb 幼虫数を計測した。あるいは 5、6、7 日後に安楽死させ、小腸内の Nb 成虫数を計測した。
- (3) 非感染、Sv 感染 1 ヶ月後のマウスの腹部を麻酔下に切開し、Nb 感染ラットから回収した Nb 成虫を胃より小腸内へ注入し、閉腹した。翌日安楽死させ、小腸内の Nb 成虫数を計測した。
- (4) IL-5 を中和するため、Sv 感染前後に抗 IL-5 抗体を投与した。また CD4 陽性 T 細胞を除去するため、抗 CD4 抗体を投与した。
- (5) 非感染及び Sv 感染 7 日後、あるいは Nb 感染 5 日後のマウスの肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、BALF 中に含まれる ILC2、好酸球についてフローサイトメトリーを用いて解析した。
- (6) 非感染及び Sv 感染 7 日後、あるいは Nb 感染 5 日後のマウスの肺組織の RNA を抽出し、逆転写後、各種サイトカイン (IL5, IL13, IL33) 発現について TaqMan プローブを用いた real-time PCR 法を用いて解析した。
- (7) 非感染及び Sv 感染 7 日後のマウスの肺

をホルマリン固定し、パラフィンブロックを作成し、組織切片について抗 IL-33 抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) レフレル症候群発症機構の解析

糞線虫が宿主に経皮感染すると、肺に好酸球を主体とした細胞浸潤を特徴とするレフレル症候群が発症する。申請者はその発症に上皮細胞由来サイトカインである IL-33 と自然リンパ球である ILC2 が関与することを明らかにしたが、その詳細なメカニズムや意義は明らかではない。そこで、まず ILC2 の産生する主なサイトカインとして知られる IL-5, IL-13 の役割を検討した。

まず、Sv 感染による好酸球集積における IL-5 の役割を明らかにするため、抗 IL-5 抗体を用いて中和実験を行った。その結果、IL-5 抗体投与によって Sv 感染後 7 日目の肺胞中への好酸球浸潤は完全に抑制された。この時、ILC2 の集積や肺の IL-33, IL-13 の mRNA 発現には影響がなかった。

次に、IL-13 の役割を検討するため、IL-13 欠損マウスに Sv を感染させた。IL-13 欠損マウスでは好酸球浸潤が抑制されるだけでなく、IL-33 の発現、ILC2 の集積も抑制された。さらに IL-13 欠損マウスに IL-33 を点鼻投与したところ、ILC2 の集積は回復したが、IL-33 の発現は回復しなかった。一方で IL-13 を点鼻投与することで IL-33 の発現が誘導できたことから、IL-13 は IL-33 の発現に働くことがわかった。

これらの結果から、レフレル症候群発症には ILC2 からの IL-5 と IL-13 が重要であり、さらに IL-13 は IL-33 の発現を上昇させてポジティブフィードバックに働くことが明らかとなった。

(2) IL-33 産生細胞と標的細胞の同定

また、我々は型肺胞上皮細胞が IL-33 を発現することを報告しているが、マクロファージなど骨髄由来細胞も IL-33 を発現することが報告されており、その関与は否定できていなかった。そこで、野生型マウスと IL-33 欠損マウスの骨髄キメラマウスを作製して Sv を感染させたところ、IL-33 の発現はドナーの遺伝子型によらずレシピエントが野生型の場合のみ認められ、IL-33 欠損マウスがレシピエントの場合には IL-33 の発現は全く認められなかった。つまり、Sv 感染マウスの場合、骨髄由来細胞ではなく完全に肺の日骨髄由来細胞が IL-33 を発現していることがわかった。

また、産生された IL-33 の標的細胞として我々は ILC2 が重要であることを報告しているが、肺胞上皮細胞にも ST2 が発現することを見出した。この肺胞上皮細胞の IL-33 受容体 (ST2) の役割を調べるため、野生型マウスと ST2 欠損マウスの骨髄キメラマウスを作製し、Sv を感染させた。その結果、肺胞上皮

細胞が ST2 欠損マウスで骨髄細胞が野生型の場合、好酸球浸潤が亢進することを見出した。

この結果から、上皮細胞の発現する ST2 は好酸球浸潤にネガティブに働いていると考えられ、骨髄系の細胞と IL-33 を競合、あるいは積極的に IL-33 を排除して炎症の抑制に寄与している可能性が考えられる。

(3) レフレル症候群の発症意義

レフレル症候群において肺に ILC2 や好酸球の集積が最も強くみられる時期は Sv 感染後、肺から虫が小腸へ移行した後であることから、その役割は Sv の排除とは考えにくい。そこで、この細胞集積の役割を検討するため、まず感染後の肺胞中の ILC2, 好酸球数の変化を調べた。その結果、好酸球数や *I15*, *I113* mRNA 発現は寄生虫が排除される感染 2 週間目をピークに速やかに減少するのに対し、ILC2 の集積が感染排除後 4 週間以上持続することを見出した。そこでこの残存 ILC2 が新たな感染に対する生体防御に働いていると仮説を立て、肺を通過する Sv とは異なる腸管寄生線虫である *Nb* の幼虫を Sv 感染 4 週間後に経皮感染させた。その結果、Sv 感染マウスでは小腸から回収される *Nb* 成虫数が Sv 非感染マウスに比べて有意に減少しており、*Nb* 感染抵抗性を示すことがわかった。

そこで、この Sv 感染マウスの *Nb* 抵抗性のメカニズムの解析を行った。この Sv/*Nb* 連続感染マウスの肺胞には *Nb* 単独感染と比較し、*Nb* 感染 5 日目ですでに多くの好酸球と ILC2 の集積が認められ、*I15*, *I113* mRNA 発現も強く誘導されていた。この現象は Sv の再感染では認められなかった。これは 1 度目の感染による獲得免疫によって幼虫が皮膚あるいは血中で捕捉され、肺まで到達できなかったためと考えられる。一方で、Sv 感染マウスは *Nb* に対する Th2 細胞や抗体を持たないため、肺に至る経路では影響を受けない。実際、*Nb* 経皮感染後に肺から回収される *Nb* 幼虫数は Sv 感染、非感染マウス間で違いは認められなかった。また、*Nb* 成虫を直接小腸に移入した場合の成虫の生着数も差はなかったことから、肺までの移行と小腸での定着には差はなく、肺から小腸へ至る過程で *Nb* が傷害されていると考えられた。

初回の Sv 感染による ILC2 の増加は IL-33 欠損マウスでは認められなかった。そこで、IL-33 欠損マウスに Sv/*Nb* 連続感染したところ、野生型マウスでみられた *Nb* 抵抗性は消失し、Sv 非感染マウスと同程度の *Nb* 成虫が小腸から回収できた。さらに、抗 IL-5 中和抗体、好酸球欠損マウス、CD4 除去抗体を用いた実験からこの現象は IL-5、好酸球依存性であり、CD4 陽性 T 細胞非依存性であった。

以上より、Sv 感染時に IL-33 によって肺に集積した ILC2 は Sv 排虫後も肺に残り、さらなる感染に対し、早期に大量の IL-5 を産生して好酸球を活性化し、*Nb* 抵抗性を宿主に賦与することが明らかとなった (図 2)。

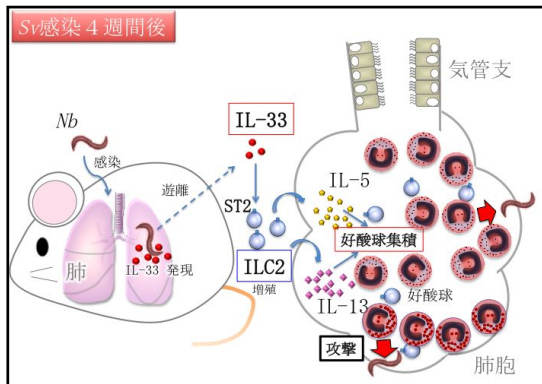


図2 糞線虫感染による好酸球性肺炎発症の意義 糞線虫感染によって一旦集積した ILC2 はしばらく肺にとどまり、新たな外敵の侵入に備える。再び感染があると、迅速に IL-5, IL-13 を産生し、好酸球を動員して攻撃することで感染に対する抵抗性をもたらす。

本研究で明らかになった IL-33/ILC2/IL-5/好酸球を介した *Nb* 感染抵抗性のメカニズムは Th2 細胞に非依存性であり、寄生虫感染経験を一時的に記憶する自然免疫による新たな生体防御メカニズムの一つと考えられる。通常寄生虫浸淫地域では複数の寄生虫が蔓延しており、この *Sv* 感染によって誘導された非特異的耐性獲得は生体が寄生虫浸淫地域で生活する上で重要な自然免疫システムであると考えられる。

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 11 件)

- Akasaki S, Matsushita K, Kato Y, Fukuoka A, Iwasaki N, Nakahira M, Fujieda S, Yasuda K, Yoshimoto T. Murine allergic rhinitis and nasal Th2 activation are mediated via TSLP- and IL-33-signaling pathways. *Int Immunol*. 査読あり, 28(2), 2016, 65-76. doi:10.1093/intimm/dxv055.
- 安田好文. IL-33 と ILC2. *臨床免疫・アレルギー科*. 査読なし, 65, 2016, 214-219
- Shan J, Oshima T, Muto T, Yasuda K, Fukui H, Watarai J, Nakanishi K, Miwa H. Epithelial-derived nuclear IL-33 aggravates inflammation in the pathogenesis of reflux esophagitis. *J Gastroenterol* 査読あり, 50(4), 2015, 414-423. doi:10.1007/s00535-014-0988-1.
- Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Yumikura S, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K. Immediate-type contact hypersensitivity is reduced in interleukin-33 knockout mice. *J Dermatol Sci* 査読あり, 74(2), 2014, 159-161. doi:10.1016/j.jdermsci.

2014.01.009

安田好文, 中西憲司. 線虫・真菌などのキチンによる IL-33 産生の誘導とアレルギー. *臨床免疫・アレルギー科* 査読なし, 61(5), 2014, 552-559.

武藤太一郎, 安田好文, 中西憲司. 自然系のリンパ球 Innate Lymphoid cells とアレルギー疾患. *アレルギーの臨床*. 査読なし, 34(1), 2014, 22-27

安田好文, 中西憲司. IL-33 と IL-18 分子消化器病 査読なし, 11(1), 2014, 82-87

安田好文, 中西憲司. アレルギー炎症における IL-18 と IL-33 の役割. *炎症と免疫* 査読なし, 21(5), 2013, 444-449

Yasuda K, Matsumoto M, Nakanishi K. Importance of Both Innate Immunity and Acquired Immunity for Rapid Expulsion of *S. venezuelensis*. *Front Immunology*. 査読あり, 119(5), 2013, 118. doi: 10.3389/fimmu.2014.00118.

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. *Infection and Immunity* 査読あり, 81(7), 2013, 2518-2527. doi:10.1128/IAI.00285-13.

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. *PNAS*. 査読あり, 110(34), 2013, 13921-13926. doi: 10.1073/pnas.1307321110.

[学会発表](計 14 件)

安田好文, 松本真琴, 中西憲司, 善本知広, 糞線虫感染排虫後の IL-33 依存性 *N. brasiliensis* 感染抵抗性の獲得. 第 81 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2016.5.13-14, 長崎大学(長崎県長崎市)

Yasuda K, Muto T, Imai Y, Nakanishi K, Yoshimoto T, Role of IL-33 and ILC2 in an aluminium adjuvant-induced eosinophilic inflammation. 第 44 回日本免疫学会総会, 2015.11.18-20, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).

安田好文, 松本真琴, 中西憲司, 善本知広, *Strongyloides venezuelensis* 感染による好酸球性肺炎発症における Th2 サイトカインの役割. 第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 2015.7.17-18, 東京工業大学(東京都目黒区).

安田好文, 松本真琴, 中西憲司, 善本知広. *Strongyloides venezuelensis* 感染による

好酸球性肺炎発症機序における Th2 サイトカインの役割. 第 84 回日本寄生虫学会大会 2015.3.21-22, 杏林大学(東京都三鷹市).

安田好文、松本真琴、中西憲司、善本知広. Role of Th2 cytokines in *Strongyloides venezuelensis* infection-induced lung eosinophilic inflammation. 第 8 回寄生虫感染免疫研究会 2015.2.27-28, 大阪大学(大阪府吹田市).

安田好文、武藤太一郎、今井康友、中西憲司. アルミニウムアジュバントによる好酸球性炎症における IL-33 の役割. 第 8 回次世代アジュバント研究会 2015.1.20, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市).

安田好文. *Strongyloides venezuelensis* 感染による肺好酸球症発症における IL-33 の役割. 第 67 回日本細菌学会関西支部総会(招待講演). 2014.11.22, 兵庫医科大学(兵庫県西宮市).

安田好文、松本真琴、中西憲司、善本知広. *Strongyloides venezuelensis* 感染により誘導された ILC2 による生体防御機構の解析. 第 70 回日本寄生虫学会西日本支部大会 2014.10.18-19, 兵庫医療大学(兵庫県神戸市).

安田好文. IL-33 と好酸球性炎症. 関西実験動物研究会第 122 回研究会(招待講演). 2014.6.13, 神戸大学(兵庫県神戸市).

Yasuda K. Role of IL-33 in *Strongyloides venezuelensis* infection-induced lung eosinophilic inflammation. 第 7 回寄生虫感染免疫研究会. 2014.3.6-7, ベストウエスタンホテル高山(岐阜県高山市).

Yasuda K. Role of IL-33 in innate type eosinophilic inflammation. 第 42 回日本免疫学会総会・学術集会(シンポジウム) 2013.12.11-13, 幕張メッセ(千葉県千葉市).

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 2013.10.19-20 香川県民ホール(香川県高松市).

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. 2013.8.22-27 Milan(Italy).

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 2013.5.20-21. 都市センターホテル(東京

都千代田区).

〔その他〕

ホームページ等

http://www.hyo-med.ac.jp/department/immn/project/IL-33_infect.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 好文 (YASUDA, Koubun)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50333539