

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460523

研究課題名(和文) 低病原性寄生蠕虫を用いた自己免疫疾患の予防・治療に関する実験的研究

研究課題名(英文) Experimental study on prevention and therapy of autoimmune diseases using lowly pathogenic parasitic helminths

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性疾患に抑制作用をもつ寄生虫を複数比較し、抑制効果に必須の因子を見出すことを目指した。腸管寄生線虫 *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) とマンソン住血吸虫 (*Sm*) のマウス実験的1型糖尿病 (T1D) 抑制効果はSTAT6とIL-10二重欠損下においても観察できた。その際脾リンパ節や脾臓マクロファージが非典型的なM2様活性化を受けており、抗糖尿病効果に關与している可能性が考えられた。一方 *Sm* のコラーゲン関節炎抑制効果はSTAT6に依存していた。本成果により蠕虫の抗炎症機構の一端が解明された。将来の低病原性寄生蠕虫を用いた炎症性疾患治療法開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：By comparison of multiple helminth species, we tried to find essential factors for anti-inflammatory properties of parasitic helminths. An intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) and *Schistosoma mansoni* (Sm) showed anti-diabetic effects on experimental type 1 diabetes in mice. These effects were observed not only in wild-type genetic background but also in dual genetic absence of STAT6 and IL-10. In such a genetic condition, non-typical M2-like macrophages were induced in the pancreatic lymph nodes and spleens and the cells might be involved in anti-diabetic effects of helminths. Sm is also known to suppress collagen-induced arthritis and in the current study we have found that the anti-arthritis effects of Sm were dependent on STAT6. The findings obtained in our research partially elucidated the anti-inflammatory effects of helminths and would contribute to development of lowly pathogenic helminth-based therapy on inflammatory diseases in the future.

研究分野：寄生虫学

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 関節炎 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

ある種の微生物や寄生虫への感染によりアレルギー疾患や自己免疫疾患などの炎症性疾患が予防される、または改善するという現象は「衛生仮説」(Hygiene hypothesis)としてよく知られている。そのメカニズムについてはまだ不明な点が多いが、この仮説に基づいて「生きた寄生虫」を難治性炎症性疾患の治療に応用できないかというアイデアが出てきている。欧米では既に寄生蠕虫(ブタ鞭虫やアメリカ鉤虫)を用いた臨床試験が実施され、ブタ鞭虫卵は炎症性腸疾患などへの改善効果が認められている。このように寄生虫の抗炎症効果を臨床適用するためには極めて病原性の低い寄生蠕虫であることが必要である。ブタ鞭虫はこれにあてはまるが、他にも体内移行を行わない消化管寄生蠕虫類など病原性が低く本目的に合致する寄生蠕虫が考えられる。我々は過去の研究において、マンソン住血吸虫(Sm)感染によりコラーゲン関節炎(CIA)が抑制されることや、Smや腸管寄生線虫の一種(*H. polygyrus*, Hp)の感染により薬剤誘発性の1型糖尿病(T1D)が抑制されることなどを明らかにしてきた。以上の背景に基づき、複数の寄生蠕虫を用いて抑制機構を比較解析することにより寄生蠕虫の炎症性疾患抑制効果を規定する条件を見出すことができれば、その基準に基づいて臨床応用可能な低病原性寄生蠕虫あるいは寄生蠕虫由来物質を評価・スクリーニングすることが可能になると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

寄生蠕虫の感染により生じる免疫変調(Immunomodulation)のうちの変化が炎症性疾患の抑制において必須であるか明らかにする。Smや旋毛虫(Ts)など病原性が無視できないながらも抗炎症効果の優れた寄生蠕虫や、Hpや縮小糸虫(Hd)などの低病原性の寄生蠕虫の両者を用いて、蠕虫により誘導される代表的抑制性サイトカインであるIL-10のKOマウス、およびTh2サイトカインIL-4/IL-13のシグナル伝達アダプター分子(STAT6)のKOマウスにおいてT1DやCIAに対する抑制作用がどのように影響されるか比較解析を行った。

(1) Sm および Hp のストレプトゾトシン(STZ)誘発T1D抑制機構の解析

我々は前回の科研費による研究(課題番号22590386)において、STAT6KOマウスおよびIL-10KOマウスにおいてもT1D抑制効果が失われないこと、すなわちIL-4、IL-13、IL-10のいずれも抑制作用において必須ではないことを明らかにしている。しかしながらMishraらの報告(2013)によれば、IL-4KOのNODマウス(自然発症T1Dモデル)においてIL-10を中和するとHpのT1D抑制作用が失われるという。つまりIL-4、IL-10それぞれは抑制作用において必須ではないが、両者

が同時に失われると抑制作用がなくなる(=両サイトカインは冗長的にT1D抑制作用を発揮している)ことになる。我々はSTZ誘発T1Dに対する抑制作用についても同様の現象が観察されるか検討するため、STAT6とIL-10の二重欠損(STAT6/IL-10DKO)マウスを作成し、SmとHpの両者を用いて同様の実験を行った。

(2) Sm および Ts の CIA 抑制機構の解析

我々は前々回の科研費による研究(課題番号18590411)において、Sm感染がCIAを抑制することを明らかにしている。CIAはDBA/1マウスでないと効率良く誘導することができないため、戻し交配によってDBA/1背景のSTAT6KOマウスとIL-10KOマウスを作成し、SmのCIA抑制効果について野生型(WT)マウスのそれと比較検討した。Smと同様にCIA抑制作用があることが判明しているTsについてもIL-10KOマウスを用いて検討を行った。Hpは予備検討においてCIA抑制作用が観察されなかったため本実験では用いなかった。

(3) Hd またはその抗原の投与による T1D、CIA 抑制作用の検討

Hdの固有宿主ラットのSTZ誘導T1Dに対するHd感染の影響を検討した。また、Hd成虫ホモジネートをマウスに投与し、CIAに対する抑制作用の有無を検討した。

3. 研究の方法

(1) Sm および Hp の STZ 誘発 T1D 抑制機構の解析

C57BL/6背景のSTAT6KOマウスとIL-10KOマウスの交配によりSTAT6/IL-10DKOマウスを作成し、雄性マウスを実験に供した。Smセルカリア100隻の経皮感染6週後、あるいはHp感染幼虫200隻の経口感染1週後よりSTZを投与開始した。STZは50mg/kg/回で1日1回、5日連続で腹腔内投与した。初回投与の1、2、3週後に血糖値の測定を行った。3週目にマウスを安楽死させ、脾臓および膵リンパ節を採取するとともに抗CD3刺激下にて脾細胞の培養を行った。培養上清中のサイトカインをELISAで測定した。また、採取した組織はRNAを採取して逆転写の後、リアルタイムPCRで遺伝子発現の変化を測定した。

(2) Sm および Ts の CIA 抑制機構の解析

DBA/1背景の雄性STAT6KOマウスとIL-10KOマウスにSmセルカリア80隻の経皮感染を行い、3週後にウシII型コラーゲン(IIC)200 μ gをFCAエマルジョンにして尾の根元の背部皮内に免疫した。さらに3週後より四肢それぞれに対して目視によるスコアリングおよび厚み測定を行い評価した。免疫6週後に足肢採取・採血とともに抗CD3刺激下にて脾細胞の培養を行い上清中のサイトカインをELISAで測定した。

(3) Hd またはその抗原の投与による T1D、CIA 抑制作用の検討

雄性WistarラットにHd擬囊尾虫10隻を

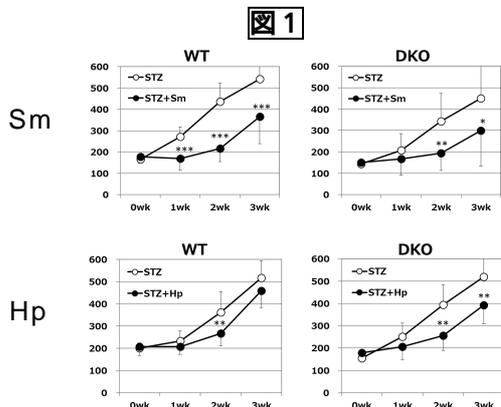
経口感染させ、1 週または 2 週間後から STZ を 20mg/kg/回で 1 日 1 回、5 日連続で腹腔内投与した。初回投与の 1、2 週後に採血し血糖値の測定を行った。

雄性 DBA/1 マウスに IIC/FCA エマルジョンを免疫し、2 週後より Hd の成虫ホモジェネートを 2mg/回で 3 日に 1 回腹腔内投与し、関節炎強度に与える影響を評価した。

4. 研究成果

(1) Sm および Hp の STZ 誘発 T1D 抑制機構の解析

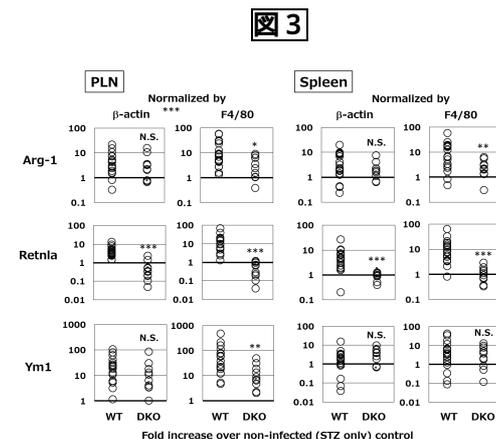
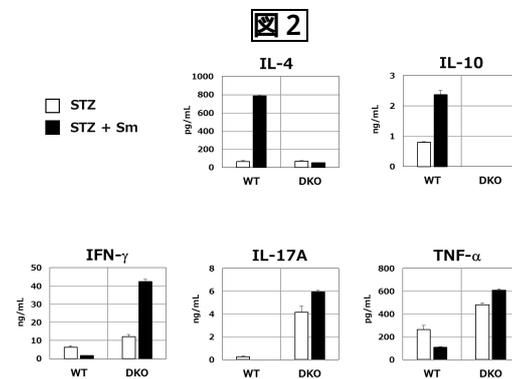
STAT6/IL-10 DKO マウス (以後 DKO マウス) においても、WT マウスと同様に Sm の血糖値上昇抑制作用が観察された。Hp 感染 DKO マウスにおいても、同様に血糖値上昇抑制作用が観察された (図 1)。このことから、Mishra らの NOD マウスでの報告とは異なり IL-4/IL-13 と IL-10 がお互いのシグナルの不在を補って T1D 抑制作用を示している訳ではなく、IL-4, IL-13, IL-10 すべてが機能しない状態でも蠕虫類は T1D 抑制作用を発揮できることが判明した。



上記 WT マウス, DKO マウスの脾細胞からのサイトカイン産生パターンを調べたところ、Sm 感染 WT マウスにおいてみられる T1D 抑制性サイトカイン IL-4 の産生量の顕著な増加は DKO マウスにおいては消失していた。遺伝子が破壊されている IL-10 は (理論的に予測されるとおり) 検出されなかった。T1D 促進性 Th1/Th17 サイトカインである IFN- γ , IL-17A, TNF- α の産生量は WT マウスでは Sm 感染により減少がみられた。これに対し DKO マウスでは、非感染マウスにおけるベースの産生量が増加していた上に、Sm 感染によってさらなる増加が生じていた (図 2)。この結果から、T 細胞刺激時に産生されるサイトカインの変動では Sm 感染による T1D 抑制効果はうまく説明できないことが判明した。

次に脾リンパ節 (PLN) および脾臓における M2 マクロファージマーカーの変化について WT マウスと DKO マウスを比較した。全細胞あたりの発現量とマクロファージ当たりの発現量の両方を観察するため、 β -actin お

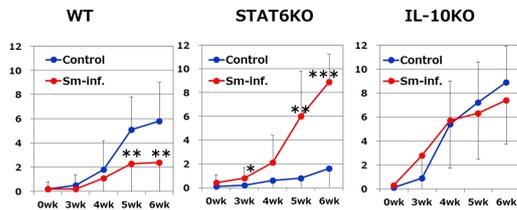
よび F4/80 それぞれで補正を行った。WT マウスの PLN、脾臓では Sm 感染により M2 マーカー 3 種 (Arg-1, Retn1a, Ym1) とも上昇が観察された (図 3、縦軸数値は非感染マウスに対する上昇倍率)。一方 DKO マウスでは感染による Retn1a の発現上昇はほぼ消失していた。Arg-1, Ym1 に関しては WT に比べ上昇幅が有意に低下しているもの (F4/80 補正時の PLN の Arg-1 および Ym1 と、同補正時の脾臓の Arg-1) も、WT と変わらないレベルのものもあるが、いずれにしても感染による発現上昇がある程度維持されていた。これらの結果から、IL-4, IL-13, IL-10 すべてが機能しない状態でも感染によりマクロファージが M2 様の活性化 (Arg-1+, Retn1a-, Ym1+) を受けていることが判明した。この「非典型的」M2 様マクロファージが DKO マウスにおける蠕虫類の T1D 抑制作用に関与しているのではないかと考えられる。



(2) Sm および Ts の CIA 抑制機構の解析

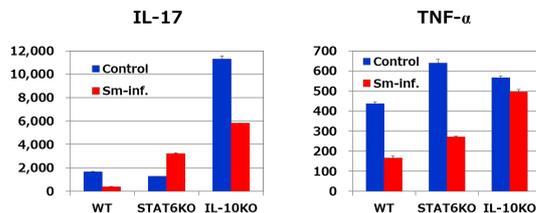
WT、IL-10KO および STAT6KO マウスについて Sm 感染の抗関節炎効果を比較した (図 4、縦軸単位は四肢の合計スコア)。WT マウスでは感染により関節炎スコアが約半分程度に抑制された。IL-10KO マウス (非感染) では WT マウス (非感染) よりも重症度の高い関節炎が発症し、かつ Sm 感染による抑制効果は消失していた。STAT6KO マウス (非感染) では逆に WT (非感染) よりも重症度は低く、Sm 感染によって有意な増悪効果が観察された。

図4



脾細胞からのサイトカイン産生について検討したところ、感染 WT マウスで観察される IL-17 の産生量低下は STAT6KO マウスでは観察されずむしろ感染によって増加していた (図5、縦軸単位 pg/mL)。IL-10KO マウスでは感染による IL-17 産生量低下自体は WT 同様に観察されたが、(非感染マウスにおける)ベースの産生量が WT マウスに比べ顕著に増加しているため、感染により抑制されてもなお、非感染の WT マウスを上回る高い産生量を示した。また TNF- α に関しては、WT マウスおよび STAT6KO マウスでは感染による産生量低下が観察されたが、IL-10KO マウスではほとんど観察されなかった。

図5



以上の結果から、Sm 感染による CIA の関節炎抑制作用および IL-17 産生低下作用においては STAT6 シグナルが、TNF- α 産生低下作用には IL-10 シグナルが必須であること、Sm 感染には STAT6 非依存的に関節炎を増悪する作用が存在することが示唆された。また IL-10KO マウスでは Sm の関節炎抑制作用が表面上失われているが、同マウスにおけるベースの IL-17 産生レベルが極めて高くなっているため Sm の IL-17 低下作用が関節炎抑制を示すのに十分でなかったのではないかと考えられる。なお Ts 感染の場合は IL-10KO マウスにおいても関節炎が強く抑制された (図は示していない) ので、Sm の結果 (IL-17 産生低下作用は残っている) と併せ、蠕虫による関節炎抑制において IL-10 は本質的には必須ではない可能性が高い。

(3) Hd またはその抗原の投与による T1D、CIA 抑制作用の検討

Hd 感染によってラットの STZ 誘導 T1D は抑制されなかった。また、Hd ホモジェネート投与によるマウス CIA 抑制作用は観察されなかった。

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は

下線)

[雑誌論文](計4件)

Osada Y, Yamada S, Nakae S, Sudo K, Kanazawa T. Reciprocal effects of *Schistosoma mansoni* infection on spontaneous autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Parasitol Int.* 査読あり.64(1):13-7,2015. DOI: 10.1016/j.parint.2014.09.001.

Adachi K, Nakamura R, Osada Y, Senba M, Tamada K, Hamano S. Involvement of IL-18 in the expansion of unique hepatic T cells with unconventional cytokine profiles during *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS One.* 査読あり.9(5):e96042,2014. DOI:10.1371/journal.pone.0096042. eCollection 2014.

Adachi K, Osada Y, Nakamura R, Tamada K, Hamano S. Unique T cells with unconventional cytokine profiles induced in the livers of mice during *Schistosoma mansoni* infection. *PLoS One.* 査読あり.8(12):e82698.2013. DOI:10.1371/journal.pone.0082698. eCollection 2013.

Osada Y, Yamada S, Nabeshima A, Yamagishi Y, Ishiwata K, Nakae S, Sudo K, Kanazawa T. *Heligmosomoides polygyrus* infection reduces severity of type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin in mice via STAT6- and IL-10-independent mechanisms. *Exp Parasitol.* 査読あり.135(2):388-96.2013. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.08.003.

[学会発表](計9件)

長田良雄、金澤保. STAT6 や IL-10 の欠損が住血吸虫による抗関節炎作用に及ぼす影響. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 宮崎 (2016 年 3 月 19 - 20 日)

長田良雄、金澤保. 寄生蠕虫は宿主の IL-4, IL-10, IL-13 シグナルが「同時に」欠損しても抗糖尿病効果を示す. 第 68 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 65 回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会. 長崎 (2015 年 10 月 17 - 18 日)

長田良雄、金澤保. 寄生蠕虫の抗糖尿病効果において IL-4 と IL-10 は冗長的に関与しているのか? 第 84 回日本寄生虫学会大会. 三鷹 (2015 年 3 月 21 - 22 日)

Osada Y, Ishiwata K, Yamada S, Kanazawa T. Helminths suppress streptozotocin-induced diabetes via STAT6- and IL-10-independent mechanisms. 13th International Congress of Parasitology. Mexico city (2014年8月10 - 15日)

長田良雄、中江進、須藤カツ子、金澤保。寄生蠕虫感染が実験的自然発症関節炎に及ぼす影響。第35回日本炎症・再生医学会/第1回日本骨免疫会議。名護(2014年7月1 - 4日)

長田良雄、加治つくし、神村直人、金澤保。寄生蠕虫が実験的1型糖尿病マウスの遺伝子発現に及ぼす効果(続報)。第83回日本寄生虫学会大会。松山(2014年3月27 - 28日)

長田良雄、中江進、須藤カツ子、金澤保。マンスン住血吸虫感染がマウス自然発症関節炎に及ぼす相反的效果。第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会。由布(2013年11月2 - 3日)

長田良雄、中江進、須藤カツ子、金澤保。マンスン住血吸虫感染がマウス自然発症関節炎に及ぼす相反的影響。第54回日本熱帯医学会大会。長崎(2013年10月4 - 5日)

安達圭志、長田良雄、中村梨沙、玉田耕治、濱野真二郎。マンスン住血吸虫感染時にマウスの肝臓内で増加する、ユニークなサイトカイン産生能を有するT細胞集団について。第54回日本熱帯医学会大会。長崎(2013年10月4 - 5日)

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

なし

(3) 連携研究者

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

山田壮亮 (YAMADA SOHSUKE)
(旧) 産業医科大学・医学部・講師
(現) 鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師
研究者番号：90525453