

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670204

研究課題名(和文)多光子顕微鏡ならびにPET/SPECTを用いた住血吸虫症の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathological process of schistosomiasis using multiphoton fluorescence microscopy and PET/SPECT

研究代表者

濱野 真二郎 (HAMANO, Shinjiro)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：70294915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、Natural Helper 細胞(NH細胞)が見出された(Moro K, Nature 2010)。マウスにおいて、マンソン住血吸虫の虫卵(2000ヶ)投与後、NH細胞の肝臓内集積が認められ、投与3日後にピークを示した。PET-SPECTを用いた観察では、ピーク時に肝臓全体のシグナル増強が認められたものの、住血吸虫虫卵周囲の肉芽形成過程を描写するには、解像度を含めて改善すべき点も多く、今後の課題が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recently, natural helper cell (NH cell) was discovered (Moro K, Nature 2010). We detected the accumulation of NH cells in the liver of mice, which showed the peak 3 days after inoculation of Schistosoma mansoni 2000 eggs. The signal detected in the liver by PET-SPECT increased when NH cells shows their peak in the liver. However so as to visualize process of granuloma formation around Schistosoma egg, both improvement of method and increase of resolution are required.

研究分野：寄生虫学

キーワード：住血吸虫 肉芽形成 ナチュラルヘルパー細胞 NH cell 可視化 PET-SPECT 多光子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

『腸管粘膜～門脈～肝臓』は生体防御の最前線であり、門脈系に寄生する住血吸虫による病態形成の場でもある。病態の主体は、肝臓および腸管に運ばれた虫卵であり、宿主は Th2 優位の免疫応答を惹起し、虫卵周囲に好酸性肉芽腫を形成して組織障害を最小限に留める、と理解されている。しかしながら詳細を検討してみると、話はそう単純ではない。

2010 年、腸間膜脂肪関連リンパ組織 (FALC: fat-associated lymphoid cluster) に Natural Helper 細胞 (NH 細胞: Lin⁻, c-Kit⁺, T1/ST2⁺) が見出された。NH 細胞は、T 細胞や B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞とは異なるユニークな新規リンパ球であり、脾臓やリンパ節には存在しない。NH 細胞を見出した連携研究者の茂呂らは、NH 細胞がアレルギーや寄生虫感染において IL-5、IL-6、IL-13 などの Th2 サイトカインを産生すると報告した (Moro K, Nature 2010)。その産生量は驚異的で、Th2 ヘルパー T 細胞、肥満細胞、好塩基球などからの産生量を遥かに凌駕する。住血吸虫が寄生する『腸管粘膜から肝臓に至る門脈系』は、NH 細胞が分布する腸間膜の FALC に隣接し、その NH 細胞は Th2 サイトカインを迅速にかつ大量に産生できるため、住血吸虫卵による腸管や肝臓での病態形成や感染防御に重要な役割を果たしていることが予想される。しかしながら、住血吸虫による病態形成における NH 細胞の役割、腸や肝臓への集積、組織内動態などは不明なままである。

生体内の中で起こっている現象を生きた状態でいかに正確に捉えるかは、医学・生命科学研究を進める上で、1 つの大きな課題である。近年、多光子顕微鏡や PET (陽電子放射断層撮 positron emission tomography) /SPECT (単光子放射型断層撮影) などの画像撮影装置にも著しい進歩が認められる。PET/SPECT は放射性核種 (RI) で標識した放射性化合物を生体内に投与し、標的部位に分布あるいは標的分子に結合した放射性化合物から放出されるガンマ線を体外より検出・定量し、画像化する技術である。多光子顕微鏡では脳神経の走行など深部組織

の観察が可能となってきた。このような特徴を生かして、PET/SPECT や多光子顕微鏡による分子イメージングは現在、医学研究・創薬研究・臨床診断など様々な分野での貢献が期待されている。

本研究では PET/SPECT ならびに多光子顕微鏡を用いて住血吸虫症の病態形成過程を視覚的に提示し、肝臓および腸管での病態形成に果たす NH 細胞の役割を解明する。

2. 研究の目的

『腸管粘膜～門脈～肝臓』は生体防御の最前線であり、門脈系に寄生する住血吸虫による病態形成の場でもある。近年、腸間膜脂肪関連リンパ組織 (FALC: fat-associated lymphoid cluster) に Natural Helper 細胞 (NH 細胞) が見出され、驚異的な Th2 サイトカイン産生能を有することが判明したものの (Moro K, Nature 2010)、住血吸虫感染における NH 細胞の役割はおろか、腸や肝臓などへの集積、臓器内局在、機能なども依然として不明である。本研究では PET/SPECT ならびに多光子顕微鏡を用いて住血吸虫症の病態形成過程を視覚的に提示し、肝臓および腸管での病態形成に果たす NH 細胞の役割を解明する。

3. 研究の方法

住血吸虫の虫卵をマウス門脈に直接接種して、1) 虫卵や虫卵周囲の病態形成の過程を PET/SPECT を用いて経時的に観察・撮影する。また、2) NH 細胞特異的な細胞表面マーカーを検索・同定し、蛍光によって NK 細胞を特異的に認識できる状態を作り出し、3) 肝臓や腸管における NH 細胞の動態を多光子顕微鏡を用いて観察する。次いで、住血吸虫セルカリアの経皮的自然感染系を用いて、産卵想定時期前より 1)、3) の研究を行う。NH 細胞の動態や局在と、肝臓や腸管における病態の経時的な変化を把握したら、Rag2^{-/-} マウスに加えて NH 細胞を欠損する γ -Rag2^{-/-} マウスにおいて、小動物用 PET/SPECT を用いて虫卵周囲の病態形成を視覚的に提示し、NH 細胞の肉芽形成に果たす役割を解明する。

【虫卵の門脈内投与系】

(1) *Schistosoma mansoni* の虫卵を直接 C57BL/6 野生型マウスの門脈内へ接種し、虫卵周囲の病態形成の過程を、長崎大学 BSL3 ならびに BSL2 動物飼育実験室に設置した小動物用 PET/SPECT を用いて経時的に観察・撮影する。まずは、グルコースの代謝を指標として、¹⁸F-2-デオキシ-2-フルオロデオキシグルコース (¹⁸FDG) を分子プローブとして使用し、右図に示すような虫卵周囲への炎症細胞の集積の初期過程の検出を目指す。上記研究の遂行と平行して、住血吸虫卵周囲に形成される免疫細胞の検出に最適な分子プローブの検索を行う。

(2) NH 細胞特異的な細胞表面マーカーを検索・同定。実験 1) により多数の NH 細胞が肝臓から分離されることが予想される。それら NH 細胞と他の免疫細胞の遺伝子発現プロファイルを作製し、NH 細胞特異的な分子を同定する。

(3) 多光子顕微鏡を用いた肝臓や腸管における NH 細胞の動態の観察。NH 細胞に固有のマーカーは存在しないが、NH 細胞には驚異的な Th2 サイトカイン (IL-5、IL-6、IL-13) 産生能が備わっている。最初は IL-13 産生などを指標として、IL-13 プロモーターの下流に GFP を発現する遺伝子組換えマウスを使用し、NK 細胞を含む細胞集団を可視化し、その動態を把握することから始める。

NH 細胞特異的な細胞表面マーカーが同定できたら、その分子をコードする遺伝子のプロモーター下流に GFP 遺伝子を組み入れた組換え体マウスを作製する。次いで、多光子顕微鏡を用いて、肝臓ならびに腸管への NH 細胞の集積を経時的に観察・測定すると共に、臓器内局在、住血吸虫卵との時空間的な相関関係を解明する。

【住血吸虫セルカリアの経皮自然感染系】

H25 年度の実験を通して、マンソン住血吸虫の虫卵周囲における初期病態形成過程が視覚的に明確になったら、マンソン住血吸虫セルカリアの経皮的な自然感染実験を行う。次いで、H25 年度の実験 1) 3) で行った解析を自然感染系で行い、H25 年度の観察結果が、住血吸虫の自然感染系でも得られるかどうかの検証を行う。

【NH 細胞の関与を多角的に検証】

T 細胞・B 細胞を欠損する Rag2^{-/-} マウス、および T 細胞・B 細胞に加えて NH 細胞を欠損する *cy^{-/-}Rag2^{-/-}* マウスを用いて、虫卵の門脈内投与系、住血吸虫セルカリアの経皮的自然感染系によって、H25 年度の実験 1) 3) を行い、NH 細胞の役割を検証する。

4. 研究成果

NH 細胞は Th2 細胞の数 10 倍～数百倍高い Th2 サイトカイン (IL-5、IL-6、IL-13) の爆発的産生を通して腸管寄生蠕虫の排除に重要な役割を果たしており、住血吸虫感染時の腸管や肝臓組織での NH 細胞の動態、局在、機能変化、病態修飾や感染防御に果たす機能の解明は、粘膜を出発点とする感染症の包括的な理解や粘膜ワクチンの開発に寄与するのみならず、アレルギーや自己免疫疾患など難治性疾患の病態理解の基盤的知見を提供すると考えられる。

住血吸虫の虫卵を門脈内に投与した後、NH 細胞の肝臓内動態をフローサイトメトリーを用いて経時的に観察したところ、マンソン住血吸虫の虫卵 (2000 個) 投与後、NH 細胞の肝臓内集積が認められ、投与 3 日後にピークを示した。

次いで BSL3 ならびに BSL2 動物飼育実験室に設置した PET/SPECT を使用し、住血吸虫の虫卵をマウス門脈内に直接接種した

のち、虫卵周囲の病態形成の過程をPET/SPECTを用いて経時的に観察した。その際、グルコースの代謝を指標として18F-2-デオキシ-2-フルオロデオキシグルコース(18FDG)を分子プローブとして使用し、虫卵周囲への炎症細胞集積の初期過程の検出を目指した。PET-SPECTを用いた観察では、ピーク時に肝臓全体のシグナル増強が認められたものの、住血吸虫虫卵周囲の肉芽形成過程を描写するには、解像度を含めて改善すべき点も多く、今後の課題が明らかとなった。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

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** 2014; 9(5): e96042. (査読あり)

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** 2013; 8(12): e82698. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

安達圭志、長田良雄、中村梨沙、玉田耕治、濱野真二郎: Unique T cells with unconventional cytokine profiles induced in the livers of mice during *Schistosoma mansoni* infection、第54回日本熱帯医学会大会、長崎(ブリックホール)、2013年10月4日~5日(国内学会)

Adachi, K., Osada, Y., Nakamura, R., Tamada, K., Hamano, S.: The hepatic T cell population with uncommon cytokine profiles induced during *Schistosoma mansoni* infection in mice. 第8回寄生虫感染免疫研究会、大阪(大阪大学IFReC)、2015年2月27日~28日(国内学会)

〔図書〕(計 2 件)

濱野真二郎: 住血吸虫症、今日の治療指針 2015、医学書院、2015、278.

濱野真二郎: 「第42章 蠕虫学」標準微生物学 第12版、医学書院、2015、551-564.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱野 真二郎 (HAMANO, Shinjiro)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 70294915

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

茂呂 和世 (MORO, Kazuyo)
独立行政法人理化学研究所・免疫細胞システム研究グループ・上級研究員
研究者番号: 90468489