

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580344

研究課題名（和文）

小腸における酸化ストレス及びマクロファージの2型メモリー免疫応答誘導への関与

研究課題名（英文）Oxidative stress and alternatively activated macrophages (AAMacs) in Th2 immune responses in small intestine against nematode parasites infection.

研究代表者

森本素子 (MORIMOTO MOTOKO)

宮城大学・食産業学部・准教授

研究者番号：30250301

研究成果の概要：宿主組織が消化管内寄生虫と相対している粘膜微細環境における免疫応答について詳細を明らかにするため、2型免疫応答と酸化ストレス、および再感染時に誘導されるメモリー反応における好中球、マクロファージの関与について検討した。その結果、再感染時には、シスト周辺に非炎症性マクロファージ（AAMacs:CD206<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>）が多数集積しており、その領域において2型サイトカインの遺伝子発現が初感染群に比較して著しく増大していることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
20年度	1,900,000円	570,000円	2,470,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000円	1,080,000円	4,680,000円

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：サイトカイン、酸化ストレス、寄生虫、マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

ヘルパーT細胞（Th）は、抗原提示細胞の刺激によって、細胞性免疫に関与する1型Tヘルパー（Th1）細胞、あるいは液性免疫に関与する2型Tヘルパー（Th2）細胞に分化する。細胞内に感染する細菌やウイルスなどの病原体が宿主体内に侵入すると、Th1細胞はインターロイキン2（IL-2）やインターフェロン $\gamma$ （IFN $\gamma$ ）を産生し、炎症性反応を導く（1型免疫応答）。一方、細胞外に感染する線虫などの寄生虫が侵入すると、Th2細胞がインターロイキン4（IL-4）やインターロイキン13（IL-13）を産生し、B細胞によるIgEの産生

が促され、好酸球が活性化される（2型免疫応答）。Th1細胞の産生する1型サイトカインと、Th2細胞の産生する2型サイトカインはお互いに抑制しあう関係にあり、このバランスの崩れによって種々の疾患が起こると考えられている。1型サイトカインの誘導されるメカニズムについてはこれまでに多くの報告があり、詳細に明らかにされてきたが、2型サイトカインの作用機序に関しては、いまだ未解明な部分が多く残されているのが現状である。特に、初めて病原体に暴露されたとき（初感染）に見られるプライマリー反応にくらべ、2回目以降（再感染）に生じるメモリ

一反応については不明な点が多い。たとえば、マウスの消化管内寄生虫である

*Heligmosomoides polygyrus* (*Hp*)が初めて宿主に感染すると持続感染となり、虫は排除されないが、再感染時には迅速で強力なメモリー反応が誘導されて排虫が起こる。これまでに、研究代表者は、*Hp*を用いて2型免疫応答を誘導し、初感染4日後には虫体を好中球が取り囲み、さらにその周辺にマクロファージが集積しているものの、CD4陽性細胞は見られず、一方、再感染時には多数のCD4陽性細胞が寄生虫の形成するシスト周辺に集積していることを報告した (Morimoto M. et al, J. Immunol. 172:2424-2430, 2004)。Laser Capture Microdissection (LCM)法を用いて虫体を取り囲む細胞群、およびシスト周辺の細胞群を分取し、遺伝子発現解析を行った結果、初感染時と比較して、再感染時にはこれらの宿主細胞にIL-4およびIL-13の強い産生を認めた。さらにその反応が抗CD4抗体投与によってブロックされたことから、強力なメモリー反応が誘導される要因として、好中球、マクロファージ、CD4陽性細胞の細胞間の情報伝達が不可欠であると考えた。一方、研究開始当初に、Anthonyらの報告により、虫体の存在する局所での免疫応答におけるエフェクター細胞として alternative activated macrophages (AAMacs)の存在が重要であることが初めて指摘された (Anthony RM. et al, Nat. Med. 12:955-960, 2006)。従来、マクロファージは、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS)の発現と一酸化窒素(NO)産生によって殺菌的に働き、1型免疫応答に関与すると考えられてきたが、これらの研究結果から、2型免疫応答においてもマクロファージが重要な役割を果たし、フリーラジカルが関与している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)消化管における2型免疫応答、特にメモリー反応の初期ステージにおけるマクロファージおよび好中球の関与、(2)酸化ストレスの増大する加齢期のマウスモデルにおける2型免疫応答の変化、について明らかにし、2型免疫応答の新しい作用機構のモデルを提唱することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)消化管粘膜微細環境に誘導される2型メモリー応答におけるマクロファージおよび好中球の関与

①シスト周辺に集積する免疫担当細胞のフェノタイプの決定

[試料の採取]

初感染群：マウスに *Hp*(200匹/頭)を経口投与により感染させ、感染4日目にと殺して小腸を採取した。

再感染群：初感染後12日目にコンバントリン (ファイザー) 2mg/頭を投与していったん虫を排除した。初感染後50日で再度 *Hp*を感染させ、4日目にと殺して小腸を採取した。 [凍結切片の作成]

OCTを用いて、採取した小腸の凍結ブロックを作成し、クリオスタットにより4μmに薄切した。

[蛍光免疫染色]

CD206, F4/80, Gr-1, CD-4に対する抗体を用い、蛍光免疫染色を行って小腸シスト周辺に集積する免疫担当細胞のフェノタイプを決定した。

②遺伝子発現定量解析

小腸におけるサイトカインおよび細胞マーカー (IL-4, IL-13, IL-6, TNFα, IFNγ, ARG-1, NOS2, CD206)の遺伝子発現について調べるため、①で採取した小腸の一部を用い、RNAを抽出後、cDNAを合成して、リアルタイムPCR法により解析した。また、凍結切片からLCM法によりシストおよびその周辺の細胞を採取し、同様に遺伝子発現定量解析を行った。

(2)加齢マウスモデルにおける2型免疫応答の変化

3ヶ月齢および18ヶ月齢のC3H/HeN雌マウスを用い、(1)と同様に *Hp*を感染させ、感染後4,8,12日に小腸を採取し、蛍光免疫染色および遺伝子発現定量解析を行った。さらに、HE染色により、組織修復について調べた。

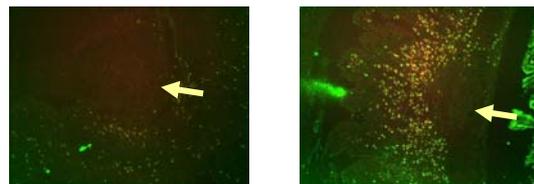
## 4. 研究成果

(1)消化管粘膜微細環境に誘導される2型メモリー応答におけるマクロファージおよび好中球の関与

①シスト周辺に集積する免疫担当細胞のフェノタイプの決定

初感染4日後、再感染4日後ともに小腸粘膜下にはシストが形成され、虫体の周囲には多数の好中球(Gr-1<sup>+</sup>)が集積しており、その周りにマクロファージ (F4/80<sup>+</sup>) がとりまいていることが観察された。また、集積しているマクロファージの中に、多数のAAMacs

(CD206<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>)を認めた。その数は初感染群と比較して再感染群では明らかに増加していた (図1)。



初感染4日後

再感染4日後

図1 AAMacsのシスト周辺への集積  
矢印は粘膜下に形成されたシスト。CD206(緑)、

F4/80 (赤)、ダブルポジティブ (黄色) が AAMacs

## ② 遺伝子発現定量解析

初感染 4 日後および再感染 4 日後のサイトカイン遺伝子発現について解析した結果、IL-4 (図 2) および IL-13 の発現は再感染時に有意に増加していた。しかし感染 7 日目では、両群に有意な差はなく (データ示さず)、初感染時よりも迅速に 2 型サイトカインを産生することが再感染時の排虫を促すために重要であると考えられた。

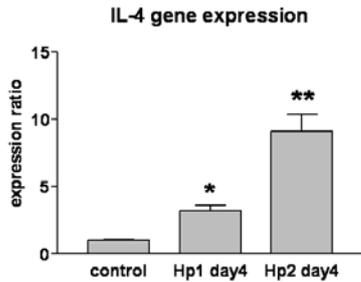


図 2 Hp 感染後の小腸における IL-4 の遺伝子発現

データは非感染コントロールにおける発現を 1 とし、相対的に表した。p<0.05

免疫染色の結果、再感染時には多数の AAMacs がシスト周辺に集積していることが確認されたが、遺伝子解析の結果、AAMacs で多量に産生される ARG-1 の発現が有意に増大しており (図 3)、再感染時には 2 型サイトカインの迅速な産生にとともに、マクロファージの AAMacs への分化が促進されることが示唆された。

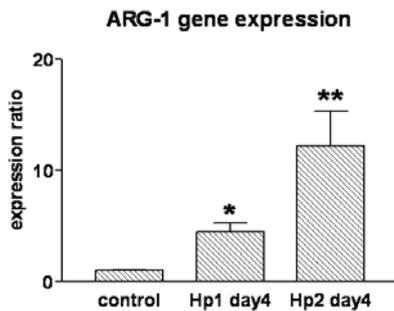


図 3 Hp 感染後の小腸における ARG-1 遺伝子の発現

データは非感染コントロールにおける発現を 1 とし、相対的に表した。p<0.05

続いて、虫が宿主組織と相対している微細環境における遺伝子発現解析を調べるため、LCM を行い、虫を取り巻いている細胞 (好中球領域) およびその周辺 (マクロファージ領域) の細胞を採取した。その結果、初感染群

における IL-4 および IL-13 の発現は検出限界以下となったが (採取できる細胞数が少ないため)、再感染群では発現が強く認められた。(図 4)

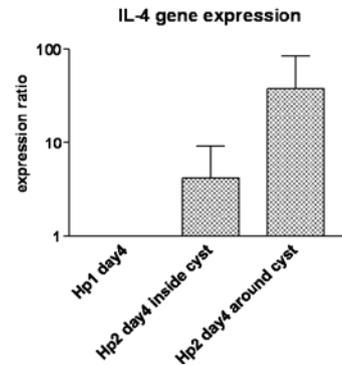


図 4 LCM によるシスト周辺の IL-4 遺伝子発現

非感染群にはシストが存在しないため、非感染群パイエル板における IL-4 の発現を 1 としたときの相対的な発現量として表している。

したがって、再感染時には好中球及びマクロファージが 2 型サイトカイン産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## (2) 加齢マウスモデルにおける 2 型免疫応答の変化

2 型免疫応答の誘導における酸化ストレスの関与について明らかにするため、種々の動物モデルを検討したが、加齢期には、酸化ストレスによって NF- $\kappa$ B の活性が増大することがよく知られていることから、本研究では加齢マウスモデルを用いて以後の実験を行った。

3 ヶ月齢群において線虫の感染後に誘導される IL-4 および IL-13 遺伝子の発現は、18 ヶ月齢群では有意に低い値を示した (図 5)。

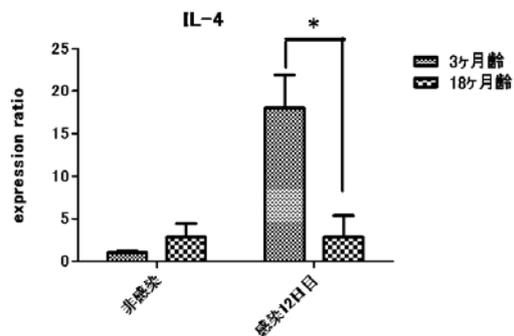


図 5 加齢マウスにおける IL-4 遺伝子の発現

また、2 型サイトカインによって誘導され、炎症を抑制し組織修復を促すとされる AAMacs のマーカーである ARG-1 も 18 ヶ月齢群で有意に

低下していたが (図6)、通常1型免疫応答時に活性化する炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$  (図7)、IL-6) 遺伝子の発現が増大していた。

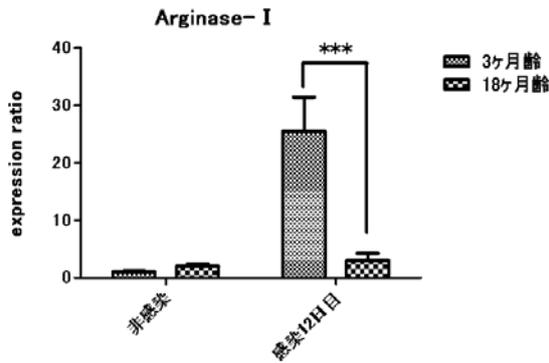


図6 加齢マウスにおける ARG-1 遺伝子の発現

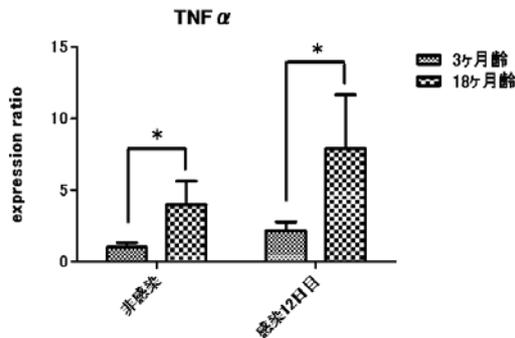


図7 加齢マウスにおける TNF  $\alpha$  遺伝子の発現

また、蛍光免疫染色によって、加齢マウスでは AAMacs の数が減少していることが確認された (図8)。

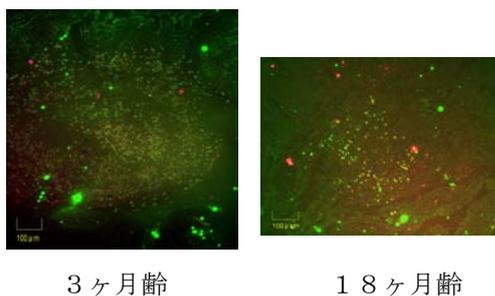


図8 シスト周辺に集積する免疫担当細胞の加齢マウスにおける変化  
CD206(緑)、F4/80 (赤)、ダブルポジティブ (黄色) が AAMacs

AAMacs は2型サイトカインによって誘導され、組織修復に関わるとされている。そこで、HE染色により、シスト周辺の組織の変化を

比較した。その結果、加齢マウス群では虫が消化管腔に脱した後の繊維化に違いが見られた (図9)。

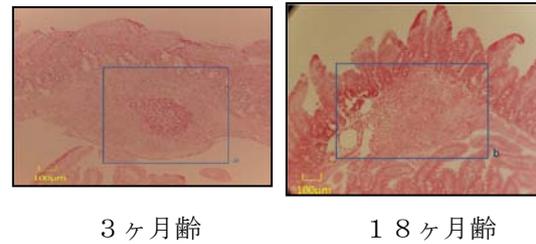


図9 HE染色による病理組織学的検査 (感染後12日)

以上の結果から、加齢マウスでは2型サイトカインの産生が抑制されることにより、非炎症性マクロファージ(AAMacs)による炎症抑制が機能せず、さらに炎症性応答へ偏向する可能性が示唆され、組織においては、炎症性マクロファージが十分に誘導されないため、組織修復が不完全あるいは遅延する可能性が考えられた。

#### まとめ

本研究により、2型メモリー応答にマクロファージが強く関与していることが示されたが、その関与は、当初予想していたように2型サイトカイン誘導の初期ステージに関わるというよりも、むしろ、2型サイトカイン誘導の結果として非炎症性マクロファージへの分化が進み、それにより炎症性反応が抑えられ、かつ組織修復が進むという機序が考えられた。また、加齢マウスでは、十分な2型免疫応答が誘導されなかったことから、酸化ストレスを含む老齢期の腸管粘膜微細環境の変化が、免疫能の減退に関与することが考えられ、今後のさらなる検討がのぞまれる。

#### 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)

[学会発表] (計3件)

- ① 森本素子、線虫感染マウスモデルを用いた2型免疫応答の研究、第54回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2007年9月22日、仙台
- ② 菅原康裕、小野寺紗智、角鹿祐一、森本素子、線虫感染後誘導される免疫応答の加齢による変化、第147回日本獣医学会学術集会、2009年4月2日、宇都宮
- ③ Motoko MORIMOTO, Th2 immune response and alternatively activated macrophages (AAMacs) in aged mice with helminth infection. The 9<sup>th</sup> World Congress on Inflammation, 2007.7.6~10, Tokyo

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・准教授

研究者番号：30250301