

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590435

研究課題名(和文) LPS誘発急性肝障害に対する住血吸虫感染マウスのサバイバル機構の解析

研究課題名(英文) Study on the survival mechanism of *Schistosoma mansoni*-infected mice against fulminant hepatitis induced by injection with LPS and D-galactosamine.

研究代表者

田邊 将信 (TANABE MASANOBU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号:80051928

研究成果の概要： 致死量のリポポリサッカライドと D-ガラクトサミン(LPS/D-GalN)投与による急性肝障害に対するマンソン住血吸虫(Sm)感染、あるいは CILIP 投与マウスのサバイバル機構を解析した。これらのマウスでは、LPS/D-GalN 投与による肝細胞アポトーシスの抑制が生存に不可欠であり、Sm 感染マウスでは、iNOS がその抑制に関与していることが示唆された。CILIP 投与マウスの救命機構は特定できていないが、住血吸虫由来物質がその救命に働いている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：マンソン住血吸虫、リポポリサッカライド、D-ガラクトサミン、アポトーシス、急性肝障害、劇症肝炎、凝固活性化リポ蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 致死量のリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン(LPS/D-GalN と略)混液を静脈内投与された正常マウスでは、LPS 刺激による大量の炎症性サイトカイン産生が肝細胞アポトーシスおよび肝病変形成に関与し、投与後8時間以内に急性肝障害(劇症肝炎)を起こして100%死亡する。これに対して、マンソン住血吸虫(Sm)感染マウス、

あるいは Sm 感染マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫から分離した凝固活性化リポ蛋白(CILIP)投与マウスは、共に LPS/D-GalNによる劇症肝炎に対し高い抵抗性を示し、実験マウスが高率に生存し続けることを見いだした。

(2) 慢性 Sm 感染マウスでは、LPS/D-GalNを投与した場合の血清中 TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-12、IFN $\gamma$  レベルは著しく増加し、いずれも LPS

/D-GalN投与を受けた非感染群よりも高値を示した。この結果は、肝臓及び脾臓内の炎症性サイトカイン遺伝子mRNA発現解析(RT-PCR)からも確認された。

(3)同様な結果が CILIP 投与マウスにおいても観察されたことから、Sm 感染および CILIP 投与マウスでは、共に LPS/D-GalN 投与後の血清中サイトカイン量は著しく増加しているにもかかわらず、肝臓の出血性病変や肝細胞アポトーシスが殆ど認められなかったことになる。従って、我々が解析している実験モデルでは、炎症性サイトカインの産生抑制というよりは、肝細胞アポトーシスの抑制がこの救命に働いている可能性が強く示唆された。

(4)そこで、LPS/D-GalN投与後のマウスの肝臓をTUNEL 法を用いてアポトーシス陽性細胞数を解析したところ、Sm感染およびCILIP投与マウスでは、肝細胞のアポトーシス陽性細胞数が著しく少ないことが明らかとなった。このことは、我々が解析している実験モデルでは、肝細胞のアポトーシス抑制が肝病変形成阻止、あるいは救命に働いている可能性が強く示唆された。

## 2 . 研究の目的

(1) 慢性Sm感染、あるいはCILIP投与マウスにおけるLPS/D-GalN に対する抵抗性がどのような機構を介してなされているか、Sm感染マウスのどのような病態生理学的変化がこの抵抗性に関与しているか、CILIP を構成するどの分子がこの救命機構に関わっているのか、といった点を明らかにするために研究を計画した。

(2) 慢性 Sm 感染、あるいは CILIP 投与マウスにみられる救命効果が肝細胞アポトーシスの抑制に依存したものであることを明らかにし、アポトーシス誘導がどの段階で抑制されているか、そしてどのような機構がその抑制に働いているかを解析することにした。

(3)初代培養肝細胞、あるいは各種セルラインを用いたアポトーシス誘導系に CILIP を添加した場合のアポトーシス抑制効果を検証し、CILIP によるアポトーシス抑制機構の解析を行うことにした。

(4)CILIPに対する23種類のモノクロナル抗体を用いて、LPS/D-GalNによる肝細胞アポトーシスの抑制に働いているCILIP構成分子の特定を試みることにした。

(5)チオグリコレート誘発腹腔マクロファージ(Mφ)、骨髄細胞から誘導したMφ (BMMφ) や樹状細胞 (BMDC)に各種サイトカイン、あるいは住血吸虫由来物質を加えて刺激し、これらの細胞から分離したmicrosomal画分の投与効果を解析し、CILIPと同等の救命効果をもった人工CILIPの作製を試みることにした。

## 3 . 研究の方法

(1) 劇症肝炎モデルはB6マウスにLPS/D-GalNを静脈内に投与して作製した。Sm感染B6マウスは25隻のセルカリアを皮下に投与して作製した。CILIPは住血吸虫感染マウスの肝臓内虫卵性肉芽腫から精製し、ポリミキシン・カラムでLPSを除去した後に実験に用いた。抗CILIPモノクロナル抗体は、ハイブリドーマを動物血清フリーのPFHM-II培地で培養し、培養上清から硫酸塩析、Protein Gカラム、あるいは IgY 精製用カラムを使って分離精製した。LPS/D-GalN投与非感染マウスの肝細胞のアポトーシス誘導時期を特定するため、経時的にアポトーシスの検出を行った (apoptosis detection ELISA kit、DNAフラグメンテーション、TUNEL法)。

(2) LPS/D-GalN に対する Sm 感染および非感染マウスの反応の違いを捉えるため、アポトーシス誘導時期に感染および非感染マウスから肝臓を取り比較解析を行った。特に、caspase 活性、アポトーシス関連分子 (FADD、Fas、FasL、TNFR-1)、あるいは細胞死防御機能をもつ分子

( FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) 、 heme-oxygenase-1 (HO-1)、iNOS、heat shock protein-70 (hsp70)、Bcl-2、Bcl-XL)を解析した。測定は WB や RT-PCR を用いて蛋白および mRNA 発現量を半定量した。また、iNOS 阻害剤 (aminoguanidine) や HO-1 阻害剤 (Zinc-protoporphyrin IX)を投与したマウスの抵抗性の変化 (死亡率、死亡時間、肝臓の形態学的変化、caspase 活性)についても解析した。

(3) CILIP のアポトーシス抑制効果が効率的に検出できる培養細胞実験系を利用し、非投与細胞と CILIP 投与細胞との違いをマイクロアレイ法を用いて網羅的に解析した。発現に明らかな違いが認められた遺伝子を特定し、RT-PCR 法で発現の違いを確認することにした。また、過酸化水素による細胞死(ミトコンドリア経路のアポトーシス)に対しても CILIP が救命効果を発揮できるかどうかについて解析した。

(4) LPS/D-GalNに対するCILIPの救命効果に働いている分子を認識するモノクロナル抗体を検索した。現在までにクローニングできている CILIP に対するモノクロナル抗体(23種類)を用い、CILIP の救命効果を中和できる抗体をスクリーニングした。CILIP活性を中和し得るモノクロナル抗体が得られた段階で、この抗体が認識する分子を二次元電気泳動法およびWB 法で解析することにしてきた。

(5) Mφや DC が Toll-like Receptor(TLR) agonist による刺激で CILIP を誘導できることはすでに明らかとなっているが、cross tolerance が問題となるため、TLR agonist を CILIP 誘導に使うことはできない。そこで、TLR agonist 以外の刺激による CILIP の効率的な誘導法の開発をめざし、骨髓細胞から誘導した BMDc, BMMφ, あるいはチオグリコレート誘発腹腔 Mφを *in vitro* で培養し、この培養系に免疫複合体、各種サイトカイン、あるいは Sm 成虫(SWAP)や虫卵(SEA)から分離した物質を投与し、これらの細胞における CILIP 誘

導活性、あるいは LPS/D-GalN 投与に対する救命活性を比較検討した。CILIP の凝固活性化活性は Factor-X 活性化活性および抗 CILIP-MoAb を用いた Dot-ELISA で行い、救命活性は LPS/D-GalN 投与マウスを用いて検討した。

#### 4. 研究成果

LPS/D-GalN 投与による劇症肝炎に対する Manson 住血吸虫 (Sm) 感染および CILIP 投与マウスの抵抗性機構を解析し、以下の成績を得た。

(1) Sm 感染及び CILIP 投与マウスは、LPS/D-GalN 投与によって、血清中炎症性サイトカイン量が対照群と同程度以上に増加したが、肝臓内アポトーシス陽性細胞や caspase 3 活性は低値を示し、肝病変もほとんど観察されなかった。

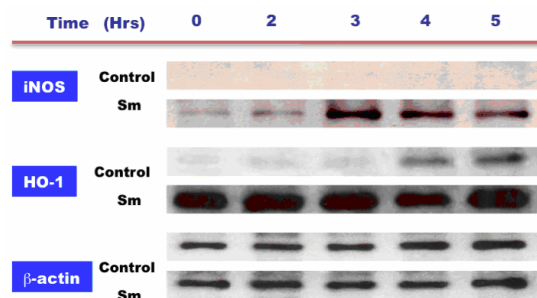


Fig.1 WB analysis of iNOS and HO-1 expression in the livers of *Schistosoma mansoni*-infected and uninfected mice after LPS/D-GalN challenge

(2) LPS/D-GalN 投与後経時的に肝臓内アポトーシス関連遺伝子発現を解析し、感染マウスでは、Fas、FasL、Bcl-2、iNOS、HO-1、HSP-70 mRNA 発現量の増加、さらには iNOS、HO-1、HSP-70 蛋白発現の増加が観察された (Fig.1)。しかし、CILIP 投与マウスでは、肝臓内 iNOS mRNA は若干増加していたが、HO-1、HSP-70 発現は対照と差がなかった。

(3) 特異的 iNOS 阻害剤が Sm 感染マウスの LPS/D-GalN に対する抵抗性を著しく低下さ

せたが、CILIP 投与マウスには無効であった (Fig.2)。

(4) 培養細胞のアポトーシス誘導系 (Wehi231/ 抗 IgM 抗体、Jurkat/staurosporin、293/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に

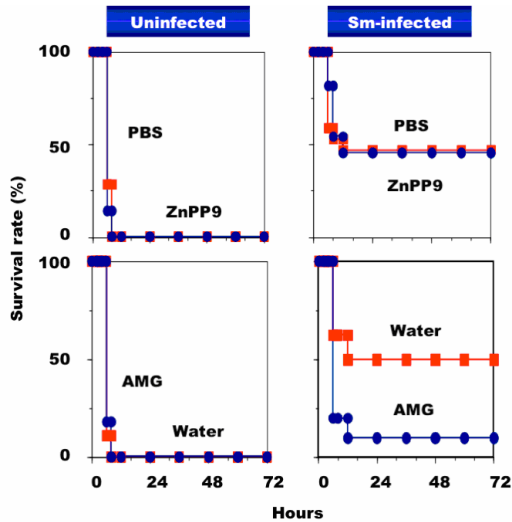


Fig.2 Effect of administration with zinc-protoporphyrin IX or aminoguanidine on the survival rate of *Schistosoma mansoni*-infected and uninfected mice after LPS/D-GaIN challenge

CILIP を添加すると、その添加量に依存して細胞の DNA 合成量 (Fig. 3) および生細胞数が増加し、CILIP がアポトーシス誘導シグナルを阻止しうる可能性が示唆されたが、その機構の特定には至らなかった。

(5) 救命に働いている CILIP 構成分子を特定するため、CILIP の救命効果の特異的に阻害するモノクロナル抗体のスクリーニングを行ったが (23 種類)、CILIP の救命効果を抑制できる抗体は検出できなかった。

(6) マウス腹腔内 Mφ、骨髄細胞から誘導した Mφ (BMMφ) や樹状細胞 (BMDC) の *in vitro* 培養系に各種 TLR リガンドやサイトカインを添加すると、これら細胞の microsomal 画分に強い凝固活性化活性が誘導されるが、LPS/D-GaIN 投与による劇症肝炎に対する救命効果はみられなかった。

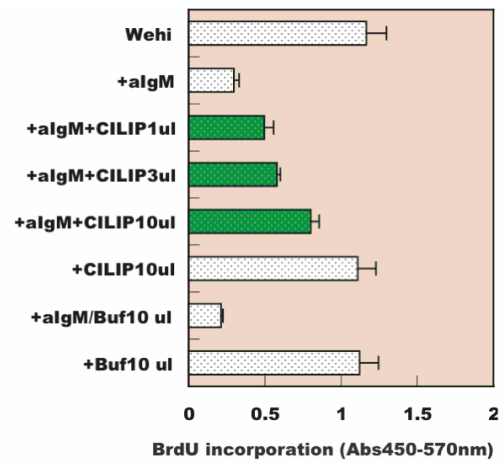


Fig. 3 Effect of CILIP addition on the DNA synthetic activity of Wehi-231 cells after apoptosis-inducing stimulation with anti-IgM antibody

(7) マンソン住血吸虫成虫 (SWAP)、あるいは虫卵 (SEA) の粗抽出液、あるいはこれらで刺激した細胞の microsomal 画分には凝固活性化活性はみられなかったが、劇症肝炎に対する高い救命効果が認められた (Fig. 4)。

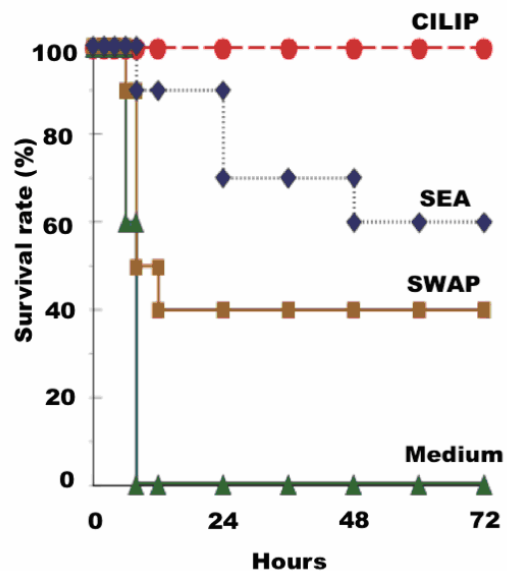


Fig.4 Effect of pretreatment with SEA or SWAP on the survival rate of mice after LPS/D-GaIN challenge

以上の解析から、Sm 感染及び CILIP 投与マウスの LPS/D-GaIN 投与に対する抵抗性は、アポ

トースス誘導刺激に対する肝細胞の抵抗性増加によるものと考えられ、慢性 Sm 感染マウスでは、iNOS がその抵抗性に深く関わっていることが推定された。CILIP 投与マウスの抵抗性機構は特定できなかったが、CILIP の救命効果はその凝固活性化活性に依存していないこと、また住血吸虫成虫、あるいは虫卵由来分子が救命に働いている可能性が示唆された。

#### 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 1 件 )

( 1 ) Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, et al. Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. Blood 112(3), 2008: 635-643, . 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

( 1 ) 田邊將信、深尾太郎、永田博司、関塚永一、宮崎耕司、竹内 勤 慢性 Manson 住血吸虫感染マウスは *Pseudomonas aeruginosa* 致死感染に対し抵抗性である 第77回日本寄生虫学会大会, 2008年4月4日、長崎県長崎市.

( 2 ) Tanabe M, Fukao T, Takeda, K, Fukuda, Y, Nara T, Ohta N, et al. Resistance of the chronically infected mice with *Schistosoma mansoni* against lipopolysaccharide (LPS)-induced fulminant hepatitis 17th International Congress of Tropical Medicine and Malaria, 2008年10月1日, 韓国済州島.

( 3 ) 田邊將信、深尾太郎、永田博司、関塚永一、宮崎耕司、竹内 勤 *In vitro*における凝固活性化リポ蛋白 (CILIP) の誘導とその劇症肝炎抑制効果 第78回日本寄生虫学会大会, 2009年3月27日、東京都千代田区.

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

ホームページ等 : なし

#### 6 . 研究組織

( 1 ) 研究代表者

田邊 將信 ( TANABE MASANOBU )

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号 : 80051928

( 2 ) 研究協力者

深尾 太郎 ( FUKAO TARO )

Max-Planck-Institute of Immunobiology,  
Freiburg, Germany. 主任研究員

研究者番号 : 20401127