

平成30年6月21日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19118

研究課題名(和文)腸赤痢アメーバ症の慢性化と重症化におけるグループ2自然リンパ球の機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of group 2 innate lymphoid cells in chronic and severe cases of amebiasis

研究代表者

中村 梨沙(NAKAMURA, Risa)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：50645801

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)：腸赤痢アメーバ症は、慢性化し肝膿瘍・脳膿瘍などの重症化症状を呈する。赤痢アメーバ感染の慢性化を防ぐことは病態悪化の阻止に重要である。赤痢アメーバの腸管感染では、感染早期から多量のTh2サイトカインが産生されることが報告されているが、その供給源と病態形成及び重症化における役割は不明であった。本研究では、赤痢アメーバの感染早期のTh2サイトカインの産生源がグループ2自然リンパ球(ILC2)であることを見出した。さらに、ILC2のin vivo 抗体除去実験により、感染早期のILC2とそのTh2サイトカインが赤痢アメーバ症の病態形成の増悪に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Intestinal amebiasis is chronic and presents severe symptoms such as liver abscess and brain abscess. Preventing the chronic infection of *Entamoeba histolytica* is important in host defense against severe pathological conditions. It has been reported that intestinal infection of *Entamoeba histolytica* produces a large amount of Th2 cytokines from the early phase of infection, but its role in the source and pathogenesis and severity has not been clarified. In this study, we found that the source of Th2 cytokines early in infection with *Entamoeba histolytica* is group 2 innate lymphoid cells (ILC2). Furthermore, the in vivo depletion of ILC2 revealed that ILC2 and its Th2 cytokines contribute to exacerbating the pathogenesis of amebiasis.

研究分野：感染免疫学

キーワード：赤痢アメーバ症 グループ2自然リンパ球 Th2サイトカイン 寄生虫感染症 免疫学 腸赤痢アメーバ症

1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* (Eh) は世界で 5000 万人が感染し、年間約 10 万人が死亡する深刻な原虫感染症である。腸赤痢アメーバ症は、イチゴゼリー様粘血便を特徴とし、数週間の周期で増悪・寛解を繰り返しながら慢性化する。慢性感染化すると、腸管上皮に侵襲したアメーバ原虫が血行性に移動し、肝臓・脳に膿瘍を形成する(アメーバ性肝膿瘍、脳膿瘍)。肝膿瘍の発症は肝細胞の壊死、膿瘍の破裂による腹膜炎等の合併症を引き起こし死に至る。よって、赤痢アメーバの腸管慢性感染を制御し排虫を促すことは、死亡に繋がる多臓器感染、病態悪化の阻止に重要である。

赤痢アメーバの腸管感染では、CD4 T 細胞より産生された IFN- γ がマクロファージや好中球を活性化させ病原体排除に働く。一方で感染後、持続的に Th2 サイトカイン(インターロイキン(IL)-4、IL-5、IL-13)も産生される。これまでに感染マウスでの IL-4 の中和実験により、Th2 サイトカインは IFN- γ 産生を抑制し腸管からの赤痢アメーバの排虫を遅延させることが明らかとなっている。これまで持続的な Th2 サイトカインの産生は、感染後に誘導される Th2 細胞によるものと考えられてきた。しかし、腸管の IL-4、5、13 産生は感染 3 日目にはすでに高値を示す。抗原特異的 T 細胞の誘導は通常 5 日以上を要するため、T 細胞以外の細胞による過剰な Th2 サイトカイン産生が誘導されると推察できる。赤痢アメーバ感染において、感染早期から持続的に多量に産生される Th2 サイトカインの産生細胞は不明である。

近年、T 細胞、B 細胞や顆粒球とは異なる新規自然リンパ球として、Th2 サイトカインを産生するグループ 2 自然リンパ球(Group 2 Innate lymphoid cell ; ILC2) ILC2 が同定された。ILC2 は、腸間膜脂肪関連リンパ組織(FALC: fat-associated lymphoid cluster)、腸管、肝、肺などの末梢組織に存在する。ILC2 は、腸管寄生線虫 *Nippostrongylus brasiliensis* 感染において IL-25、IL-33 による刺激により驚異的な量の IL-5、IL-13 を産生する。また、ILC2 が産生する IL-5、IL-13 は、杯細胞のムチン産生を増加させ、アレルギー症状を増悪させることが知られている。赤痢アメーバ症の病態形成または感染防御における ILC2 の役割は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究は、多量の Th2 サイトカインを産生する ILC2 に着目し、ILC2 が赤痢アメーバ感染初期の Th2 サイトカイン産生を担い、防御免疫に対して抑制的に制御するという仮説のもと、ILC2 の動態及びその Th2 サイトカイン産生が赤痢アメーバ感染後の病態形成にどのように関与するのかを解明を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、赤痢アメーバの腸管感染およびその重症化における病態形成と感染制御に対する ILC2 の役割を解明するため、赤痢アメーバ易感染性の CBA/JN マウス及び我々が確立したアメーバ性肝膿瘍マウスモデルを用いて、以下の点について検討する。

(1) 赤痢アメーバ症における ILC2 の動態

感染後、全身性及び感染局所における Th2 サイトカイン産生を確認し、産生細胞を同定する。特に腸管粘膜固有層リンパ球(LPL)、FALC と肝臓に着目する。感染後、全身性及び各種臓器における Th2 サイトカインの産生を定量するため、感染後経時的に腸管・肝臓を回収しホモジナイズ後、その上清および血清中の IL-4、IL-5、IL-13 を ELISA 法にて測定する。もしくは Th2 サイトカインの遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析する。また、腸管感染後の Th2 サイトカインを産生する細胞集団の局在・動態を解明するため、腸管上皮リンパ球(IEL)、LPL、FALC、肝臓を回収し、フローサイトメーターにて T1/ST2+ CD25+ c-kit+ IL-7Ra+ Linage- の表面マーカーで同定される ILC2 およびその他の Th2 サイトカイン産生細胞(Th2 細胞、肥満細胞、好酸球)の数を経時的に解析する。

(2) ILC2 の活性化及び Th2 サイトカイン産生能の解析

ILC2 は IL-2 によって増殖し、IL-25、IL-33 の刺激で活性化するため、感染後継時的に各臓器のホモジネート液における IL-2、IL-25、IL-33 産生を ELISA 法又は Real-time PCR 法で測定する。感染後、ILC2 のサイトカイン産生能を検討するため、各臓器から精製したリンパ球を *in vitro* で培養後、タンパク質レベルで IL-4、IL-5、IL-13 の産生を測定する。具体的には、ILC2 は IL-25、IL-33 の刺激で Th2 サイトカインを産生するため、分離したリンパ球を *in vitro* で刺激し、ILC2 を細胞内染色法にて解析する。Th2 細胞は腸管、MLN から回収したリンパ球を soluble entamoeba antigen (SEA)で刺激し、抗原特異的な IL-4、IL-5、IL-13 産生を ELISA 法、細胞内染色法で解析する。

(3) 病態形成、重症化における ILC2 の役割

ILC2 が赤痢アメーバ症の病態形成にどのように影響するのかを検討するため、ILC2 の抗体除去を行い、感染後の病態形成を評価する。具体的には、T 細胞、B 細胞を欠損した Rag2KO マウスに抗 CD25 抗体を投与し ILC2 を除去したマウスに感染後、経時的に PCR によるアメーバ数の検出及び HE 染色で病態形成の評価を行う。また、ILC2 の Th2 サイトカインが病態形成に直接関与するか検証するため、ILC2 の養子移入を行い、病態形成、アメーバ数、Th2 サイトカイン産生を評価する。

4. 研究成果

(1) 赤痢アメーバ症における ILC2 の動態

CBA/J マウスの虫垂に Eh を感染後 7、14 日目に腸管組織の HE 染色を行い観察したところ、経時的に粘膜固有層の肥厚、リンパ球浸潤及び腸管上皮の脱落が確認できた(図 1、A)。この時の FALC 及び LPL 中の ILC2 数は感染 7、14 日目に増加し 21 日目に減少していた(図 2)。また、腸赤痢アメーバ症の重症化モデルとして、より自然感染に近い感染方法として赤痢アメーバの経門脈感染を用いたアメーバ性肝膿瘍のマウスモデルの作成に成功した(図 1、B)。アメーバ感染後の肝膿瘍形成と ILC2 の動態を解析したところ、肝 ILC2 も経時的に増加した。このことから、赤痢アメーバ症の病態形成に伴って ILC2 が感染局所で著しく増加することが明らかとなった。

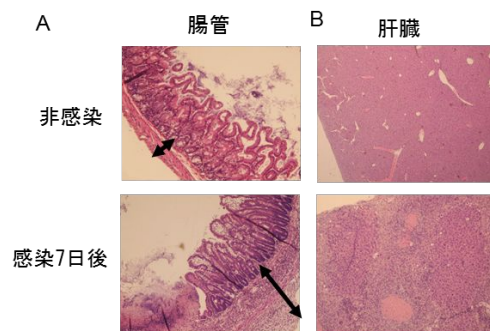


図1. 赤痢アメーバ感染後の腸管 (A) 及び肝臓 (B) のHE染色像

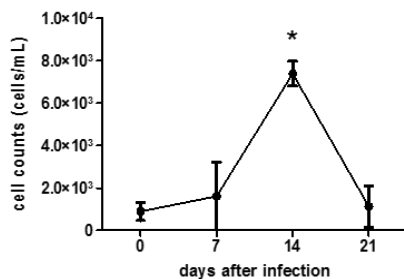


図2. 赤痢アメーバ腸管感染後の FALC中の ILC2数

(2) ILC2 の活性化及び Th2 サイトカイン産生能の解析

ILC2 は IL-25、IL-33 の刺激で活性化し多量の Th2 サイトカインを産生する。そこで、アメーバ感染後、局所の IL-25、IL33 mRNA 発現を Real-time PCR にて解析したところ、非感染マウスと比べ、IL-25 の発現増加は認められなかったが、顕著な IL-33 発現上昇が確認できた。このことは、アメーバ感染局所において ILC2 が増加・活性化できる環境であることが示唆される。赤痢アメーバ症の感染早期に顕著に増加した ILC2 が Th2 サイトカインの産生源であるか見極めるため、感染の FALC、LPL 及び肝リンパ球を回収し、リコンビナント IL-33 で刺激後 ILC2 の IL-5、IL-13 産生を ELISA 法、細胞内染色法を用い

てフローサイトメトリーにて解析した。その結果、IL-5 産生 ILC2、IL-13 産生 ILC2 及び IL5+IL-13+ILC2 数が著しく増加した(図 3)。さらにその他の Th2 サイトカイン産生細胞の感染後の動態も検討したところ、LPL、肝の赤痢アメーバ抗原特異的 CD4T 細胞の IL-13 産生は認められなかったが、IL-5 産生が確認された。これらの結果より、抗原特異的 CD4T 細胞も Th2 サイトカインの産生源であるが、ILC2 が感染早期の Th2 サイトカインの供給源の一つである可能性が示唆された。

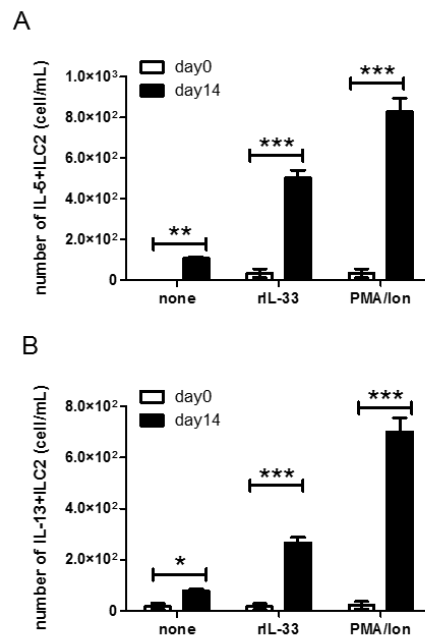


図3. 赤痢アメーバ腸管感染後の FALC中の IL-5産生 ILC2数 (A)と IL-13産生 ILC2数 (B)

(3) 病態形成、重症化における ILC2 の役割

これまでの結果から、腸管および肝において赤痢アメーバ感染後、顕著な ILC2 の増加が見られ、この増加した ILC2 が感染早期の IL-5、IL-13 産生源であることが示された。そこで、感染前後に抗 CD25 抗体をマウス腹腔内に投与し ILC2 の in vivo 除去を行い感染後の病態形成を HE 染色とアメーバ数の検討を行った。その結果、ILC2 を抗体除去したマウスではアメーバ数が著しく排除され肝膿瘍形成が認められなかった。この時の IL-5、IL-13 産生は ILC2 除去の影響を受け、有意に減少していた。そこで、ILC2 除去による Th2 サイトカインの減少が IFN- γ を代表とする Th1 サイトカインの産生を増強させ肝膿瘍形成をコントロールした可能性を検討するため、ILC2 除去アメーバ感染マウスの IFN- γ 産生を解析したところ、コントロール抗体投与マウスと比べ差は認められなかった。したがって、ILC2 は IFN- γ による感染防御機構に影響することなく、直接的にアメーバ感染後の病態形成の増悪に関与することが示唆された。本研究により、腸赤痢アメーバ症と重症化モデルである肝膿瘍で ILC2 が感染早期に Th2 サイトカインを産生し、直接病態形成

を増悪させることが明らかとなった。

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4件)

1. Moriyasu, T, Nakamura R, Deloer S, Senba M, Kubo M, Inoue M, Culleton R, Hamano S: Schistosoma mansoni infection suppresses the growth of Plasmodium yoelii parasites in the liver and reduces gametocyte infectivity to mosquitoes. PLoS Negl. Trop. Dis. 2018; 12(1): e0006197. 査読有
2. Deloer S, Nakamura R, Kikuchi M, Moriyasu T, Kalenda Y.D.J, Mohammed E.S, Senba M, Iwakura Y, Yoshida H, Hamano S: IL-17A contributes to reducing IFN- γ /IL-4 ratio and persistence of Entamoeba histolytica during intestinal amebiasis. Parasitol. Int. 2017; 66(6): 817-823. 査読有
3. Chadeka E.A., Nagi S., Sunahara T, Cheruiyot N.B, Bahati F, Ozeki Y, Inoue M., Osada-Oka M., Okabe M., Hirayama Y, Changoma M, Adachi K, Mwende F, Kikuchi M, Nakamura R, Dan Justin Y.K., Kaneko S, Hirayama K., Shimada M, Ichinose Y, Njenga S.M, Matsumoto S, Hamano S: Spatial distribution and risk factors of Schistosoma haematobium and hookworm infections among schoolchildren in Kwale, Kenya. PLoS Negl. Trop. Dis. 2017; 11(9): e0005872. 査読有
4. Deloer S, Nakamura R, Mi-Ichi F, Adachi K, Kobayashi S, Hamano S: Mouse models of amoebiasis and culture methods of amoeba. Parasitol Int. 2016; 65(5 Pt B): 520-525. 査読有

(学会発表)(計23件)

1. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Masachika Senba, Mihoko Kikuchi, Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Group 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess by IFN- γ independent manner in mice. 第87回日本寄生虫学会大会, 2018年3月16~18日, 国立国際医療研究センター(東京都新宿区)
2. Taeko Moriyasu, Risa Nakamura, Richard Culleton, Shinjiro Hamano: *Schistosoma mansoni* infection suppresses the growth of *Plasmodium yoelii* parasites in the liver and reduces gametocyte

infectivity to mosquitoes. 第87回日本寄生虫学会大会, 2018年3月16~18日, 国立国際医療研究センター(東京都新宿区)

3. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Masachika Senba, Mihoko Kikuchi, Shigeo Koyasu, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Group 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess by IFN- γ independent manner in mice. 第11回寄生虫感染免疫研究会, 2018年2月22~23日, 杏林大学三鷹キャンパス 大学院講堂(東京都三鷹市)
4. Taeko Moriyasu, Risa Nakamura, Richard Culleton, Shinjiro Hamano: *Schistosoma mansoni* infection suppresses the growth of *Plasmodium yoelii* parasites in the liver and reduces gametocyte infectivity to mosquitoes, 日米医学寄生虫疾患部会合同会議, 2018年2月16~17日, 長崎大学坂本キャンパス(国際学会、長崎県長崎市)
5. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. 第46回日本免疫学会学術集会, 2017年12月12~14日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)
6. Taeko Moriyasu, Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Richard Culleton, Shinjiro Hamano: *Schistosoma mansoni* infection suppresses the growth of *Plasmodium yoelii* parasites in the liver and reduces gametocyte infectivity to mosquitoes, グローバルヘルス合同大会2017, 2017年11月24~26日, 東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)
7. Taeko Moriyasu, Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Richard Culleton, Shinjiro Hamano: *Schistosoma mansoni* infection suppresses the growth of *Plasmodium yoelii* parasites in the liver and reduces gametocyte infectivity to mosquitoes, 第70回日本寄生虫学会南日本支部大会第67回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会, 2017年11月4~5日, AiAiひろば(鹿児島県奄美市)
8. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, 2017年10月29日~11月2日, ISHIKAWA ONGAKUDO, ANA CROWNE PLAZA KANAZAWA(国際

- 学会、石川県金沢市)
9. Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Taeko Moriyasu, Yombo Dan Justin Kalenda, Eman Sayed Mohammed, Masachika Senba, Yoichiro Iwakura, Hiroki Yoshida, Shinjiro Hamano: IL-17A contributes to the decrease of IFN- γ /IL-4 ratio and the persistence of *Entamoeba histolytica* during intestinal amebiasis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, 2017年10月29日~11月2日, ISHIKAWA ONGAKUDO, ANA CROWNE PLAZA KANAZAWA (国際学会、石川県金沢市)
 10. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. 第16回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2017年9月4~7日、淡路夢舞台国際会議場 (国際学会、兵庫県淡路市)
 11. 中村梨沙, Sharmina Deloer, 茂呂和世, 濱野真二郎: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. 第86回日本寄生虫学会大会、2017年5月28~29日、北海道大学 学術交流会館 (北海道札幌市)
 12. 森保妙子、中村梨沙、Richard Culleton、濱野真二郎、マンソン住血吸虫の先行感染がマラリア肝臓ステージに及ぼす影響、第86回日本寄生虫学会大会、2017年5月28~29日、北海道大学 学術交流会館 (北海道札幌市)
 13. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium / Leading Program International Symposium 2017, 2017年5月18~19日、長崎大学 坂本キャンパス (国際学会、長崎県長崎市)
 14. Taeko Moriyasu, Risa Nakamura, Richard Culleton, Shinjiro Hamano: Pre-existing *Schistosoma mansoni* infection dampened sporozoite-induced malaria liver burden、The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium / Leading Program International Symposium 2017、2017年5月18~19日、長崎大学 坂本キャンパス 良順会館 (国際学会、長崎県長崎市)
 15. Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Masachika Senba, Taeko Moriyasu, Eman Sayed Mohammed, Shinjiro Hamano: IL-17A may help to persist of *Entamoeba histolytica* by keeping antagonistic relationship with Th1 response in animal model of intestinal amebiasis. The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium / Leading Program International Symposium 2017, 2017年5月18~19日、長崎大学 坂本キャンパス (国際学会、長崎県長崎市)
 16. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: Type 2 innate lymphoid cells exacerbate severe amebic liver abscess in mice. 第10回寄生虫感染免疫研究会、2017年2月9~10日、徳島大学 蔵本キャンパス (徳島県徳島市)
 17. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: IFN- controls amebic liver abscess and the function of type 2 innate lymphoid cells in mice intraportally inoculated with *Entamoeba histolytica*. 第45回日本免疫学会学術集会、2016年12月5~7日、沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル (沖縄県宜野湾市)
 18. 森保妙子、中村梨沙、Richard Culleton、濱野真二郎: マンソン住血吸虫の先行感染がマラリア肝臓ステージに及ぼす影響、第10回蠕虫研究会、2016年11月18~19日、静岡・熱海温泉ハートピア熱海 (静岡県熱海市)
 19. Risa Nakamura, Sharmina Deloer, Kazuyo Moro, Shinjiro Hamano: IFN- controls amebic liver abscess and the function of type 2 innate lymphoid cells in mice intraportally inoculated with *Entamoeba histolytica*. ASTMH 65th 2016 Annual Meeting, 2016年11月13~17日、Atlanta, Georgia, USA (国際学会)
 20. Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Masachika Senba, Shinjiro Hamano: Intestinal amebiasis: Does IL-17 play any role? ASTMH 65th 2016 Annual Meeting, 2016年11月13~17日、Atlanta, Georgia, USA (国際学会)
 21. 森保妙子、中村梨沙、Richard Culleton、濱野真二郎: マンソン住血吸虫の先行感染がマラリア肝臓ステージに及ぼす影響。第69回日本寄生虫学会南日本支部大会・第66回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会 (2016)、2016年11月5~6日、佐賀大学医学部 (鍋島キャンパス) (佐賀県佐賀市)
 22. Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Masachika Senba, Shinjiro Hamano, Intestinal amebiasis : Does IL-17 play any role? 第15回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2016年9月6~9日、淡路夢舞台

- 国際会議場（国際学会、兵庫県淡路市）
23. Sharmina Deloer, Risa Nakamura, Mihoko Kikuchi, Masachika Senba, Shinjiro Hamano: Intestinal amebiasis: Does IL-17 play any role? 第5回感染症若手フォーラム, 2016年9月4～6日, 淡路夢舞台国際会議場（兵庫県淡路市）

〔図書〕（計3件）

1. 田中美緒・中村梨沙・濱野真二郎：住血吸虫症, 小児科臨床〔月刊〕第70巻増刊号, 2017年12月20日発行, P2289, 日本小児医事出版社
2. 森保妙子・中村梨沙・濱野真二郎: 感染症の現状 ～3大感染症から新興・再興感染症、NTDs, 医学の歩み「連載 グローバル感染症最前線 ～NTDsの先へ」, 2016; 258(3), 2016年7月16日発行, P252～257, 医歯薬出版株式会社
3. 中村梨沙・見市文香・Sharmina Deloer・濱野真二郎: アメーバ赤痢, 臨床免疫・アレルギー科「特集 寄生虫感染と生体防御・免疫系」, 65(5), 2016年4月25日発行; P412～418, 科学評論社

〔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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/parasitology/>
<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/nekken/research/parasitology.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 梨沙 (NAKAMURA, Risa)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：50645801