

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15719

研究課題名(和文) マダニ感染に対する免疫獲得メカニズム解析

研究課題名(英文) Clarification of the mechanisms of acquired tick resistance

研究代表者

吉川 宗一郎 (YOSHIKAWA, Soichiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10549926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マダニは重篤な感染症を引き起こす病原体を媒介するベクターであり、感染対策が重要である。古くからマダニに刺された経験のある動物ではマダニ吸血に対する免疫ができることが知られていた。この免疫発揮には好塩基球が必須であることがわかっていたが、詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、好塩基球がマダニ感染局所に浸潤するメカニズムと、マダニの吸血を阻害するメディエーターの同定解析を行った。その結果、好塩基球は皮膚常在型CD4メモリーT細胞が放出するIL-3によってまだに感染局所へ浸潤し、浸潤した好塩基球がヒスタミンを放出することで皮膚表皮を肥厚させることでマダニ吸血を阻害していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SFTSをはじめとするマダニ媒介性感染症には致死性の高いものもあり、昨今わが国でも大きな問題となっている。マダニ媒介性感染症を予防する最も有効な手段は、マダニに刺されないことである。しかし、殺ダニ剤を用いた対処では、薬剤耐性マダニの出現や環境被害の影響があり、多くの問題が残っていた。古くからマダニに対する免疫を持った動物ではこの感染症の伝播が起こりにくいことが知られており、マダニに対する免疫が注目されていた。本研究により、マダニに対する免疫のメカニズムの一端が解明された。本研究成果は、マダニ吸血に対する有効的なワクチンの開発に活かすことができ、学術・社会的な面からも非常に意義のある研究である。

研究成果の概要(英文)：Ticks are blood-sucking arthropods that can transmit various pathogenic organisms to host animals and humans, causing serious infectious diseases. Several species of animals develop resistance to tick-feeding after single or multiple tick infestation. Basophils reportedly play key roles in the manifestation of acquired tick resistance, but it remains ill-defined how they were recruited and how they contribute to it. In present study, we demonstrated that skin-resident memory CD4 T cells are stimulated with tick antigens to produce IL-3 that in turn promotes the recruitment of IgE-armed basophils from the peripheral blood to the tick-feeding site. Moreover, IgE-armed basophils are activated with tick antigens to release histamine that acts on keratinocyte, resulting in epidermal hyperplasia that may interfere with tick attachment or blood feeding in the skin, and hence contribute to acquired tick resistance.

研究分野：免疫学

キーワード：獲得免疫 好塩基球 ヒスタミン IL-3 細胞浸潤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において、マダニによって媒介される疾患患者の報告数は近年増加傾向にあり、特に最近では、致死性の高い重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) がマダニ感染により伝播されることが報告されており、その対策が急がれている。特に SFTS は有効な治療法もないため、マダニに刺咬されないことが最も効果的な防御策である。最も効果的なマダニ対策としては、殺ダニ剤を用いた駆除であるが、近年では甚大な環境破壊懸念と薬剤耐性マダニの出現により、これに換わる方法が求められてきている。古くから、あらゆる動物において、マダニに刺された経験のある個体は再感染時に血を吸われにくくなること (マダニに対する免疫の獲得) が知られており、さらにはマダニ媒介性病原体の伝播が大幅に減少することが報告されている。したがって、抗マダニ免疫メカニズムを解明する事は、新たなマダニ媒介性感染症につながることを期待される。

近年われわれは、マダニ (*Haemaphysalis longicornis*) に対する感染防御には好塩基球が重要な役割を果たしていることを明らかにした。マダニをマウスに2度感染させると、感染させた皮膚の局所で1度目の感染時には見られない、好塩基球の浸潤が多数観察された。この2度目以降の感染前に、当研究室で樹立した誘導的に好塩基球を欠損できるマウスを用いて好塩基球の除去を行ったところ、マダニに対する抵抗性が消失した (Wada *et al.*, *J Clin Invest.* 2010)。さらに最近の結果から、マダニに対する耐性獲得には好塩基球上に発現する IgE 受容体 (Fc RI) とイムノグロブリンが重要であることが判明し、好塩基球の脱顆粒によって放出される因子がマダニの排除を起こしていることが示唆された (Wada *et al.*, *J Clin Invest.* 2010, 未発表データ)。しかしながら、マダニ抗原に対する IgE をナイーブマウスに投与しても、マダニに対する耐性は獲得されず、この原因は好塩基球がマダニ感染局所に浸潤しないことが原因であると示唆された。以上より、抗マダニ免疫は好塩基球がマダニ感染局所に集積し、IgE とマダニ抗原による活性化によりマダニの吸血を阻害していることが考えられた。しかし、その分子メカニズムはまだ分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) マダニ感染局所への好塩基球浸潤メカニズム解明と、(2) マダニ吸血阻害を引き起こす好塩基球由来の因子の同定を行う。

### 3. 研究の方法

マダニの感染は、マウスの体側にプラスチックカプセルを接着し、その中でマダニを40匹感染させた。1度目の感染はマウスの左側体側に、2度目の感染は右側体側に行った。マダニ吸血量の測定は、飽血した全てのマダニの体重を電子天秤で計量し、(吸血量%) = (実験群の飽血したマダニの総重量) / (初感染マウスから回収した飽血したマダニの総重量) × 100 によって算出した。マダニ感染局所へ浸潤する好塩基球、T細胞、マスト細胞はコラゲナーゼ処理により単離し、フローサイトメトリーで解析、または細胞分離を行い、遺伝子の発現解析を行った。マダニ感染皮膚の組織染色は、ホルマリンで固定したサンプルを用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) マダニ感染局所への好塩基球浸潤メカニズム解析

好塩基球の浸潤は2度目以降の感染で起こることから、獲得免疫が関与していると考えられた。T細胞、またはB細胞を欠損するマウスにそれぞれ2度マダニを感染させると、B細胞欠損マウスでは正常に好塩基球の浸潤が見られるのに対し、T細胞欠損マウスでは見られなかった。T細胞欠損マウスに各種T細胞を移植する実験を行ったところ、CD4+ メモリーT細胞を移植した時のみ好塩基球の浸潤が回復した。各種解析の結果、このT細胞は皮膚常在性メモリーT細胞であり、マダニ感染局所でIL-3を高発現していることがわかった。CD4+ T細胞特異的にIL-3を欠損するようなマウスでは2度目の感染で起こる好塩基球浸潤が起こらなかったことから、IL-3を産生するCD4+ メモリーT細胞が好塩基球の浸潤に必須であることがわかった。驚くことに、IL-3を産生する皮膚常在性メモリーCD4+ T細胞は2度目の感染直前の段階ですでに全身の皮膚で検出されており、マダニの感染に備え、いち早く応答できる様に皮膚でスタンバイしていることがわかった。以上の研究内容は(Ohta T *et al.* *Front Immunol.* 2017)で報告した。

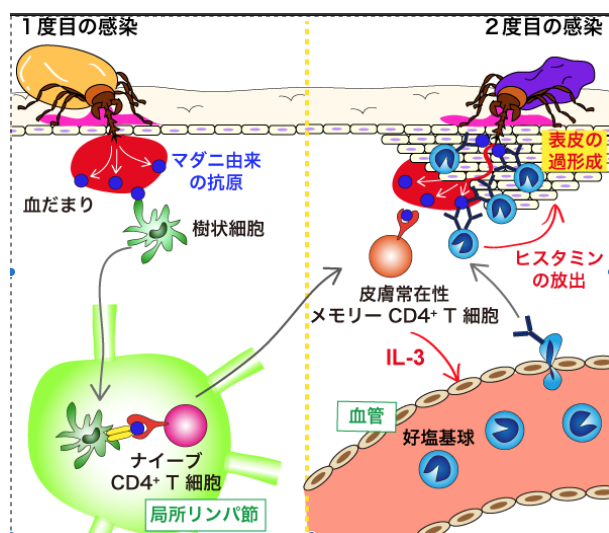
#### (2) マダニ吸血阻害を引き起こす好塩基球由来の因子の同定

好塩基球のIgE受容体がマダニ吸血耐性に必須であることから、好塩基球の脱顆粒時に放出される物質がマダニの吸血を阻害していることが示唆された。過去の文献情報や、我々の予備実験から、ヒスタミンがその有力候補として上がった。そこで、これを検証するために、ヒスタミンをマダニ感染局所に投与してみたところ、1度目の感染にも関わらず、マダニの吸血が大幅に阻害されることがわかった。また、ヒスタミン受容体阻害剤の投与、もしくはヒスタミン受容体欠損マウスでマダニ吸血耐性を評価したところ、2度目の感染で見られるマダニ吸血耐性が完全に消失していた。以上より、ヒスタミンはマダニ吸血耐性において重要であることがわかった。

ヒスタミン産生細胞の同定を行うため、ヒスタミン合成酵素欠損マウス（HDC 欠損）マウスを用いて実験を行った。HDC 欠損マウスは免疫細胞においてヒスタミンが産生されないため、マダニ吸血耐性が見られない。この HDC 欠損マウス、または野生型マウス由来の好塩基球を単離し、好塩基球欠損マウスへそれぞれ移植したところ、野生型好塩基球を移植した時にはマダニ吸血阻害が再現されたが、HDC 欠損マウス由来好塩基球ではその吸血耐性が見られなかった。よって、好塩基球由来のヒスタミンがマダニ吸血阻害に関与していることがわかった。

最後に、ヒスタミンによるマダニ吸血阻害のメカニズム解明を試みた。ヒスタミンは表皮のケラチノサイトの増殖を誘導することが知られている。また、マダニ吸血耐性をもつマウスでは、マダニ感染局所の表皮が肥厚している。しかし、HDC 欠損マウス、好塩基球欠損マウスでは表皮の肥厚が見られないことがわかった。初感染マウスのマダニ感染局所にヒスタミンを投与すると表皮の肥厚が現れることから、表皮が厚くなることがマダニ吸血耐性に影響することが示唆された。以上の研究内容は(Tabakawa Y et al. *Front Immunol.* 2018)で報告した。

以上、本研究課題において、まだに感染局所における好塩基球の浸潤メカニズム、並びに、マダニ吸血阻害を引き起こす好塩基球由来の因子の同定を行うことができた。これらの研究成果を総括すると、次の様なメカニズムでマダニ吸血耐性が生じているものと考えられる（下図参照）。1 度目の感染でマダニ由来の抗原を取得した樹状細胞が局所リンパ節へ移行し、ナイーブ CD4+ T 細胞に抗原を提示する。この過程で一部のマダニ抗原特異的 T 細胞は皮膚常在性メモリー CD4+ T 細胞へと分化し、全身の皮膚へ遊走される。その後、2 度目のマダニ感染が生じると、これがいち早く活性化して IL-3 を産生し、マダニ感染局所へ好塩基球を集積させる。局所に集積した好塩基球は、マダニ抗原とその抗原に反応する IgE によって脱顆粒し、ヒスタミンを放出する。このヒスタミンによってケラチノサイトが増殖し、表皮の肥厚（過形成）が生じる。マダニは表皮と真皮の間に血だまりを形成し、ここから吸血を行うことが知られているため、表皮が肥厚することで血だまりとマダニの吸血口の間距離ができてしまい、これにより吸血が阻害されてしまっているものと考えられる。本研究成果は、効果的な抗マダニワクチンの開発に大きく寄与するものと考えられる。



(図) 宿主のマダニ吸血耐性獲得メカニズム模式図

1 度目の感染でマダニ由来の抗原を取得した樹状細胞が局所リンパ節へ移行し、ナイーブ CD4+ T 細胞に抗原を提示する。この過程で一部のマダニ抗原特異的 T 細胞は皮膚常在性メモリー CD4+ T 細胞へと分化し、皮膚へ浸潤する。その後、2 度目のマダニ感染が生じると、この T 細胞が即座に IL-3 を放出し、マダニ感染局所へ好塩基球を集積させる。局所に集積した好塩基球は、マダニ抗原とその抗原に反応する IgE によって脱顆粒し、ヒスタミンを放出する。このヒスタミンによってケラチノサイトが増殖し、表皮の肥厚（過形成）が生じる。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 9 件 )

**\*Yoshikawa, S.**, Oh-hora, M., Hashimoto, R., Nagao, T., Peters, L., Egawa M., Ohta, T., Miyake, K., Adachi, T., Kawano, Y., Yamanishi, Y., and Karasuyama, H.: Pivotal role of STIM2 but not STIM1 in IL-4 production by IL-3-stimulated murine basophils. *Sci. Signal.* 12, 576, 2019. (\*:corresponding author)

\*Karasuyama, H., Tabakawa, Y., Ohta, T., Wada, T., and **\*Yoshikawa, S.**: Crucial role for basophils in acquired protective immunity to tick infestation. *Front. Physiol.* 9:1769, 2018. (DOI: 10.3389/fphys.2018.01769.) (\*:corresponding author)

Tabakawa, Y., Ohta, T., **\*Yoshikawa, S.**, Elisabeth, JR., Yamaji, K., Ishiwata, K., Kawano, Y., Miyake, K., Yamanishi, Y., Ohtsu, H., Adachi, T., Watanabe, N., Kanuka, H. and Karasuyama, H. Histamine released from skin-infiltrating basophils but not mast cells is crucial for acquired tick resistance in mice. *Front. Immunol.* 1540:9, 2018. (DOI: 10.3389/fimmu.2018.01540.) (\*:corresponding author)

Ohta, T., \*Yoshikawa, S., Tabakawa, Y., Yamaji, K., Ishiwata, K., Shitara, H., Taya C., Oh-hora, M., Kawano, Y., Miyake, K., Yamanishi, Y., Yonekawa, H., Watanabe, N., Kanuka, H., and Karasuyama, H.: Skin CD4+ memory T cells play an essential role in acquired anti-tick immunity through IL-3-mediated basophil recruitment to tick-feeding sites. Front. Immunol. 1348:8, 2017. (DOI: 10.3389/fimmu.2017.01348.) (\*:corresponding author)

〔学会発表〕（計 8 件）

Yoshikawa S., Tabakawa Y., Ohta T., Yamaji K., Ishiwata K., Kawano Y., Yamanishi Y., Ohtsu H., Adachi T., Watanabe N., Kanuka H., Karasuyama H. Histamine released from skin-infiltrating basophils but not mast cells is crucial for acquired tick resistance in mice. The 47th Japanese Society for Immunology 2018. Dec 10th-12th. Fukuoka. Japan.

YOSHIKAWA S., HO-HORA M, MIYAKE K, KAWANO Y, YAMANISHI Y, KARASUYAMA H. Prolonged Ca<sup>2+</sup> influx via STIM2 is essential for cytokine-induced IL-4 production in basophil. The 46th Japanese Society for Immunology 2017. Dec. 12th-14th, Sendai, Japan.

〔図書〕（計 0 件）

〔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：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：嘉糠 洋陸  
ローマ字氏名：KANUKA Hirotaka

研究協力者氏名：山地 佳代子  
ローマ字氏名：YAMAJI Kayoko

研究協力者氏名：石渡 賢治  
ローマ字氏名：ISHIWATA Kenji

研究協力者氏名：渡邊 直熙  
ローマ字氏名：WATANABE Naohiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。