

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006－2008

課題番号：18590411

研究課題名（和文） 住血吸虫による炎症性疾患抑制効果の研究

研究課題名（英文） Study on anti-inflammatory effects of schistosome

研究代表者

長田 良雄（OSADA YOSHIO）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：80282515

研究成果の概要：

寄生虫感染は、実験的に自己免疫疾患やアレルギー疾患の症状を抑制することが報告されている。我々はこの機構を明らかにする目的で、住血吸虫の抗炎症効果について検討した。マウスにあらかじめマンソン住血吸虫を感染させることにより、関節リウマチの動物モデルであるコラーゲン関節炎の発症が抑制された。感染によって、Tリンパ球による炎症促進因子の産生能が低下するとともに、足肢における、炎症・骨吸収の促進因子の発現上昇が抑制された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

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：感染症 微生物 免疫 寄生虫 炎症 関節炎 サイトカイン 住血吸虫

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初より、いわゆる衛生仮説（微生物感染がアレルギーや自己免疫疾患を抑制する）が注目を集めており、このメカニズムを明らかにするために疫学レベルおよび実験動物レベルで様々な解析が行われていた。その中で特に、蠕虫感染やその抗原の投与が、実験的自己免疫疾患発症を抑制するという報告が相次いでいた。マンソン住血吸虫に関するものでは、マウスの自己免疫疾患（NOD マウスのインスリン依存性糖尿病、

ストレプトゾトシン誘導膵島炎、実験的アレルギー性脳脊髄炎、Graves 甲状腺機能亢進症など）を抑制したという報告があった。当時までに挙げられていた衛生仮説の機構としては、①蠕虫感染により全身的な Th2 側への免疫応答の偏りが生じ、Th1 応答に依存する自己免疫疾患が抑制される ②細菌・原虫感染によって Th1 側への免疫応答の偏りが生じ、Th2 応答に依存するアレルギー疾患が抑制される ③制御性 T 細胞の活性化により、過剰な免疫応答の抑制が生じる ④NKT

細胞の増殖により Th2 への偏りが生じる、などがある。このような多くの研究にも関わらず、疾患の抑制メカニズムについては研究者らの見解は必ずしも一致していなかった。

一方で、寄生虫由来物質が直接の免疫抑制作用をもつという報告も多くなされていた。このうちマンソン住血吸虫については、虫卵に存在するオリゴ糖 Lacto-N-fucopentaose III (LNFPIII) が住血吸虫感染マウスの B 細胞を刺激し PGE2 や IL-10 を分泌させることや、シストソミュラの ES 物質が keratinocyte を刺激し PGE2 や IL-10 を分泌させることなどが報告されていた。以上のような背景のもと、我々は当研究室で従来研究対象として用いていたマンソン住血吸虫を利用し、自己免疫炎症抑制の機構を解析することとした。住血吸虫とその抗原は、種々の実験的自己免疫疾患の発症を抑制することがすでに分かっていたが、関節炎については同様の報告はなかった。ただし住血吸虫以外の蠕虫の抗関節炎作用に関しては、ネズミのフィラリア (*Acanthocheilnema viteae*) の分泌・排泄物質 (ES) である ES-62 を投与することによりマウスコラーゲン関節炎が抑制されたという報告があった。関節リウマチ (RA) は自己免疫疾患の中でも患者数が多い重要な炎症性疾患であるので、住血吸虫由来物質による関節炎発症抑制効果が確認され、そのメカニズムが明らかになることの意義は大きい。

本研究を遂行することにより、「衛生仮説」の研究に新たな知見を付け加え、未だ明らかになっていないそのメカニズムの解明に貢献することが出来ると考えた。また将来的には寄生虫抗原に含まれる炎症抑制因子を同定することにより、難治性炎症性疾患の治療法開発にもつなげられると考えた。

## 2. 研究の目的

(1) T 細胞由来の炎症性サイトカインの関与する慢性自己免疫疾患としてマウスコラーゲン関節炎を選び、住血吸虫感染による発症予防効果・治療効果を検討する。また、成虫抗原や虫卵抗原の投与による発症抑制効果も同様に検討する。

(2) 住血吸虫 (感染または抗原の投与) が上記炎症モデルに対して抑制を示す実験条件において、Th1/Th2/Th17 サイトカインおよびマクロファージ系細胞由来の炎症性サイトカインや、抗コラーゲン抗体の動態を明らかにする。

(3) この解析結果に基づき、重要な役割を担うエフェクター細胞と、それによる抑制メ

カニズムを明らかにする

(4) エフェクター細胞に対する住血吸虫由来物質の直接作用を *in vitro* において検証する。

## 3. 研究の方法

(1) 住血吸虫の感染や抗原の投与がマウスコラーゲン関節炎に与える影響

一般に関節炎モデルとしてはラットのコラーゲン関節炎やアジュバント関節炎がよく知られているが、ラットは住血吸虫の好適宿主ではないため本実験系では使用しにくい。一方 DBA/1 マウスは II 型コラーゲン免疫により 1 ヶ月程度で容易にコラーゲン関節炎を発症することが知られており、マウスが住血吸虫の好適宿主であることも考え合わせると本実験系に適している。この系において、スコアリング法および四肢の肥厚測定を行い、経時的な関節炎抑制効果を検討した。また、経時採血により血清抗コラーゲン抗体価 (IgG, IgG2a) の推移を評価した。一定期間後にマウスを屠殺し四肢病変の組織学的検査を行った。また四肢の RNA を採取し炎症関連遺伝子の発現を検討した。同時に脾細胞を ConA で刺激培養し、上清中の炎症性サイトカイン (IL-17, TNF $\alpha$ )、Th1 サイトカイン (IFN $\gamma$ ) および Th2 サイトカイン (IL-4・IL-10) を ELISA で測定した。また抗原投与実験においては、可溶性虫卵抗原 (SEA) や可溶性成虫抗原 (SWAP) をマウスに複数回腹腔内投与し、関節炎に対する影響の評価を行った。そのうち発症予防評価ではコラーゲンの免疫前後に投与し、関節炎の induction phase における効果を検討した。さらに別の実験において、発症の徴候が見られ始める時期に投与を開始して同様の評価を行った。これは effector phase における効果をみるものである。

(2) 虫卵による炎症性サイトカインの変化

虫卵を腹腔内投与し、1 週後に脾細胞を T 細胞マイトゲンで刺激培養して感染マウスと同様のサイトカイン変化が起きるか検討した。その際に虫卵の状態が本現象に与える影響を調べるため、生きた虫卵・凍結融解虫卵・凍結融解後さらに破砕した虫卵などを比較した。

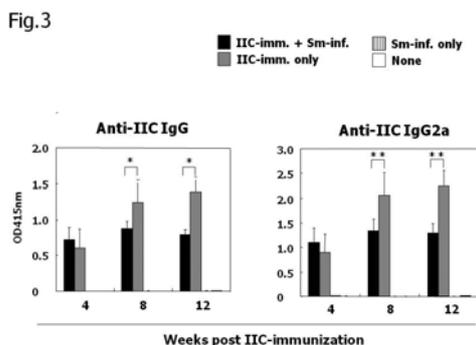
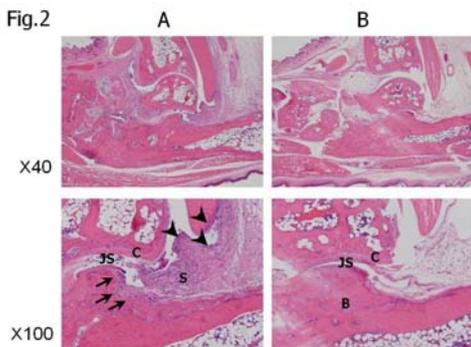
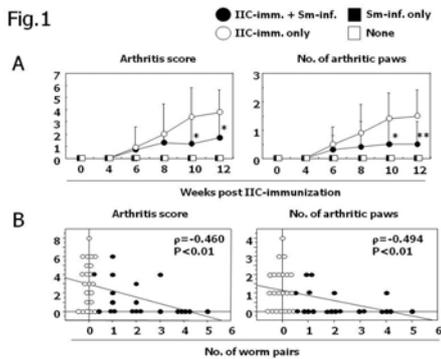
(3) エフェクター細胞の同定

制御性 T 細胞を除去するために抗 CD25 抗体を投与したマウスで、虫卵投与の影響を検討した。さらに、チオグリコレートで誘導した腹腔滲出マクロファージをそのまま、あるいは虫卵抗原等で処理したのちレシピエントマウスへ移入し、脾細胞のサイトカイン応答を対照群と比較した。

#### 4. 研究成果

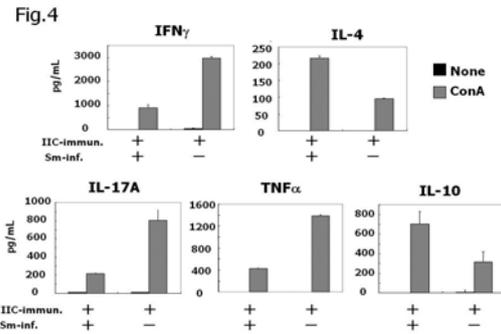
(1) 住血吸虫の感染や抗原の投与がマウスコラーゲン関節炎に与える影響

マンソン住血吸虫感染によって、関節炎の指標は有意に低下した (Fig.1A)。灌流によって回収された虫体ペア数と、関節炎指標は逆相関の関係にあった (Fig.1B)。炎症局所である足肢の組織学的解析を行った結果、非感染の関節炎惹起マウスでは白血球の浸潤および滑膜増生に伴う骨破壊の像がみられたが、感染したマウスではこれらの現象が抑制されていた (Fig.2)。

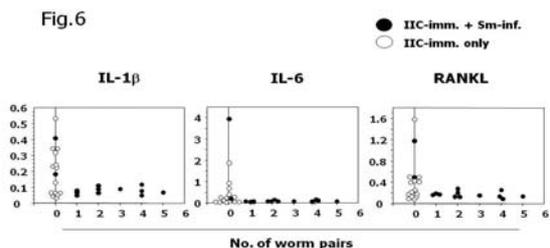
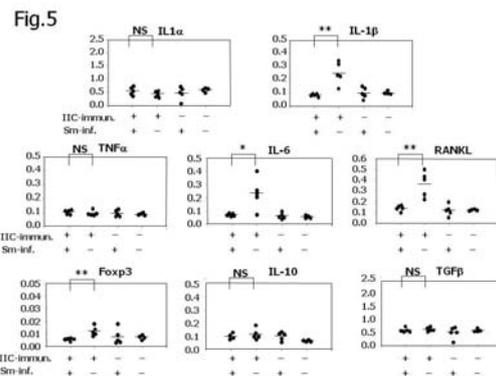


抗コラーゲン抗体 (IgG, IgG2a) 値は、非感染群においては徐々に上昇したが、感染群においてはこの上昇は見られなかった (Fig.3)。感染群においては、ConA 刺激脾細胞からの Th1 サイトカインや炎症性 Th 1

サイトカイン産生の低下と、Th2 サイトカイン産生の上昇が観察された (Fig.4)。なお、感染の代わりに抗原投与を行った場合、関節炎の有意な予防効果は観察されなかった (図示せず)。



次に関節炎発症マウスの足肢における炎症メディエーター遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR で検討した。コラーゲンを免疫して関節炎を惹起したマウスでは無処置マウスに比べ IL-1 $\beta$ 、IL-6、RANKL の発現が上昇していたが、この上昇はいずれも住血吸虫の感染によってほぼ完全に抑制されていた (Fig.5)。一方、抗炎症方向への指標である IL-10、TGF $\beta$  および制御性 T 細胞 (Treg) の転写因子 Foxp3 については、住血吸虫感染による発現上昇は観察されなかった。また、上記炎症メディエーター (IL-1 $\beta$ 、IL-6、RANKL) 発現抑制は、1 ペアの住血吸虫感染で十分であることも判明した (Fig.6)。



以上の結果から、感染マウスにおいて脾細胞のサイトカイン産生能が「抗炎症型」に変化しているとともに、実際に末梢においても炎症性サイトカインの発現が抑制されていることが示された。

(2) 虫卵による炎症性サイトカインの変化  
(結果は図示せず)

関節炎実験の結果を踏まえ、さらに我々は T 細胞由来の炎症性サイトカイン (特に IL-17) の産生抑制機構について解析を試みた。まず感染後の脾細胞サイトカイン産生の経時的変化を調べたところ、IL-17 産生は 6 週から 8 週にかけて劇的な低下を示し、他のサイトカイン産生の変化 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  産生の低下、IL-10, IL-4 産生の上昇) と一致した。この時期は組織内への虫卵の蓄積が起こる時期であるので、虫卵が原因である可能性が高いと考えられた。そこで虫卵投与によるサイトカイン変化の誘導を試みた。新鮮虫卵を 1 回腹腔内投与することにより、脾細胞において感染マウスと同様のサイトカイン産生能の変化が誘導された。虫卵を凍結融解したり、さらに破碎したりする処理によって、新鮮虫卵に比べ IL-17 産生抑制効果は減弱・消失した。

(3) エフェクター細胞の同定

(結果は図示せず)

次に、本現象に関与する細胞を同定するため抗体投与および細胞移入実験を行った。まず抗 CD25 抗体を投与したマウスにおいて脾細胞のサイトカイン産生能を測定した。その結果、抗体投与群においても対照群と同様の IL-17 産生能低下がみられ、本現象における Treg の関与は小さいと考えられた。また、チオグリコレート誘導マクロファージを新鮮虫卵と共に、または虫卵の培養上清 (ES) を添加して 4 日間培養したのち、正常マウスに腹腔内移入した。その結果、虫卵で処理したマクロファージを移入したマウスにおいてはいずれも、無処理マクロファージ移入マウスに比べ脾臓 T 細胞の IL-17・IFN $\gamma$  産生能の若干の低下がみられた。以上の結果から、住血吸虫卵によるサイトカイン産生能の変化においては、少なくともその一部にはマクロファージが関与している可能性があると考えられた。

[得られた成果の位置づけとインパクト]

本研究によって、「T 細胞からの IL-17 産生の抑制」が住血吸虫により生じることが初めて示された。従来 of 諸説 (Th1 応答の低下、IL-10 の誘導など) に加え、近年

特に注目を集めている炎症性 T 細胞である Th17 細胞の応答低下が寄生虫の抗炎症効果に関与している可能性が示唆された。また、RA のような自己免疫性関節炎における骨破壊は臨床上最も重大な問題の一つであるが、破骨細胞の分化を誘導する ODF / RANKL はその中でも鍵となる分子である。住血吸虫感染マウスの足肢においてこの分子の発現上昇がほぼ完全に抑制されたことは、将来的に寄生虫由来物質を用いて関節炎の骨破壊を制御できる可能性を示唆するものである。

[今後の展望]

住血吸虫の抗炎症効果に関与する細胞や受容体など、さらに詳細な機構を明らかにすることにより寄生虫の抗炎症作用の評価系を確立する。将来的にはその評価系で様々な蠕虫抗原や分泌物質のスクリーニングを行うことにより、有用な抗炎症物質を同定する方向に研究を展開していきたい。

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 Kumagai T, Osada Y, Ohta N, Kanazawa T. Peroxiredoxin-1 from *Schistosoma japonicum* functions as a scavenger against hydrogen peroxide but not nitric oxide. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 Mar;164(1):26-31. (査読あり)
- ② Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *Int J Parasitol*. 2009 Mar;39(4):457-64. (査読あり)
- ③ Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okuzawa E, Kanazawa T. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. *Parasitol Int*. 2006 Sep;55(3):213-8. (査読あり)
- ④ Kumagai T, Osada Y, Kanazawa T. 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma japonicum*: the expression profile and

localization in the life cycle. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Oct;149(2):135-43. (査読あり)

[学会発表] (計 7件)

- ① 長田良雄、井上嘉乃、米本知世、金澤保. 住血吸虫卵の炎症性Thサイトカイン産生に対する影響. 第78回日本寄生虫学会大会. 東京 (2009年3月27日)
- ② 長田良雄. 蠕虫抗原の免疫調節活性評価. 第2回蠕虫研究会. 宮崎 (2008年11月8日)
- ③ Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. Schistosome infection suppresses collagen - induced arthritis in mice. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Cheju, Korea (29th/Sep.-3rd Oct./2008)
- ④ 長田良雄、熊谷貴、清水少一、金澤保. 寄生虫感染によるマウス関節炎の抑制. 第29回日本炎症・再生医学会. 東京 (2008年7月9日)
- ⑤ 長田良雄、金澤保. 住血吸虫感染による関節炎予防効果 -炎症性サイトカインの解析. 第77回日本寄生虫学会大会. 長崎 (2008年4月4日)
- ⑥ Osada Y, Kumagai T, Okuzawa A, Hamada A and Kanazawa T. Schistosome infection suppresses collagen-induced arthritis in mice. Forty-first Joint Conference on Parasitic Diseases US-Japan Cooperative Medical Science Program. 東京 (2007年2月3日)
- ⑦ 長田良雄、熊谷貴、奥沢英一、濱田篤郎、金澤保. マウス関節炎に対する住血吸虫抗原投与の影響. 第75回日本寄生虫学会大会. 弘前 (2006年5月19日)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 良雄 (OSADA YOSHIO)  
産業医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80282515

### (2) 研究分担者

熊谷 貴 (KUMAGAI TAKASHI)

(2006-2007年度)

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：40369054

### (3) 連携研究者

熊谷 貴 (KUMAGAI TAKASHI)

(2008年度)

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：40369054