

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590488

研究課題名(和文)腸間膜NH細胞によるTh2非依存性*N. brasiliensis*感染排除機構の解析

研究課題名(英文)Th2 independent NB expulsion by natural helper cells

研究代表者

本間 季里 (HONMA, Kiri)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：70307940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子IRF4はT細胞に対する働きの一つに、Th2の分化を促すことがあげられる。すなわち、IRF4がないとTh2に分化しない。蠕虫の一種である*Nippostrongylus brasiliensis*(NB)は、感染すると生体内にTh2が誘導され、それによってNBが排除されることが知られている。ところが、Th2が誘導されないIRF4遺伝子欠損マウス(IRF4 KO)においてもNBは排除された。このメカニズムは自然リンパ球、とりわけIL5やIL13を強く産生するグループ2の自然リンパ球(ILC2)によるもので、サイトカイン産生をIRF4が直接制御していることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Interferon regulatory factor 4 (IRF4) is the development of Th2. In IRF4-deficient mice (IRF4 KO), Th2 development does not occur. *Nippostrongylus brasiliensis* (NB) is one of parasite and is eliminated by antigen-specific Th2, which is generated during infection. However, Th2 independent NB elimination was found in IRF4 KO. This study indicated that group2 innate lymphocytes (ILC2) played the crucial role in Th2 independent NB expulsion and IRF4 directly regulated the Th2 cytokine production, such as IL5 or IL13 although IRF4 was dispensable of ILC2 development.

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：Th2 自然リンパ球 蠕虫 腸管免疫 サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

*Nippostrongylus brasiliensis* (NB)は、抗原特異的 Th2 が誘導されると腸管の杯細胞が過形成を起こし、それにより、排除されることが知られている。Interferon regulatory factor-4 (IRF4) は、転写因子の一つで免疫担当細胞において様々な分化、機能面で重要な働きをしているが、Th2 分化においても鍵となる転写因子であることがわかっている。すなわち、IRF4 遺伝子欠損マウス (IRF4 KO) 由来の T 細胞は Th2 に分化できない。ところが、IRF4 KO に NB を感染させると、野生型 (WT) マウスに比べて遅延しているものの NB は完全に排除された。このことは、IRF4 KO では Th2 非依存的 NB 排除機構が働いていることを示している。

### 2. 研究の目的

IRF4 KO における Th2 非依存的 NB 排除機構のメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

**マウス:** C57BL/6 (B6) および BALB/c バックグラウンドの IRF4 KO、B6 バックグラウンドの Rag2 遺伝子欠損マウス (Rag2 KO)、IRF4 KO と Rag2 KO を掛けあわせた Rag2/IRF4 double knockout マウス (DKO) を使用した。

**NB 感染実験:** マウスの尾部に 500 隻の NB の小虫を皮内注射することにより感染させた。経時的にマウスの小腸内の成虫数を数えた。一部の実験では、DKO マウスに PC61 (抗 CD25 抗体) を感染の 2 週間前から週 2 回ずつ腹腔内投与し、NB 感染実験を行った。また、IL5 の中和実験においては、IRF4 KO に感染 2 週間より週 2 回、抗 IL5 抗体を腹腔内投与し感染実験を行った。

**ILC2 の精製とサイトカイン産生:** マウスの腸間膜を取り出し、コラゲナーゼ 1 で処理した後、Lin marker、抗 CD25 抗体、7AAD で染色し、7AAD<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を ILC2 として FACS Aria II で精製した。精製度は 95% 以上だった。これらの細胞を PMA および ionomycin、IL25/IL33/IL2 で刺激した後、培養上清中の IL5 を ELISA 法で測定した。細胞内サイトカイン染色でサイトカイン産生を解析するときは、腸間膜細胞を採取後、刺激を行い、Lin marker、抗 CD25 抗体、抗 T1/ST2 抗体で表面を染色した。その後、細胞内染色にてサイトカインを染色し、Lin<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>T1/ST2<sup>+</sup>細胞を ILC2 として検出し、サイトカイン産生を解析した。

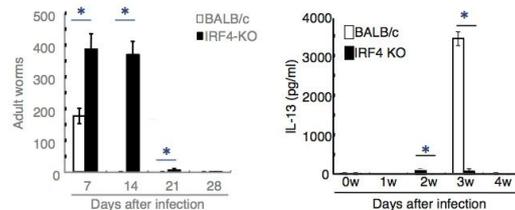
**siRNA 導入実験:** 精製した ILC2 に Nucleofector にて 100pmol の IRF4 特異的あるいはコントロール siRNA を導入し、刺激を加えた。PMA/ionomycin あるいは IL25/IL33/IL2 にて刺激を加え、上清中の IL5

産生を ELISA 法にて測定した。IRF4 発現はウェスタンブロット法でタンパク量を比較した。

### 4. 研究成果

#### Th2 非依存的 NB 排除が存在する:

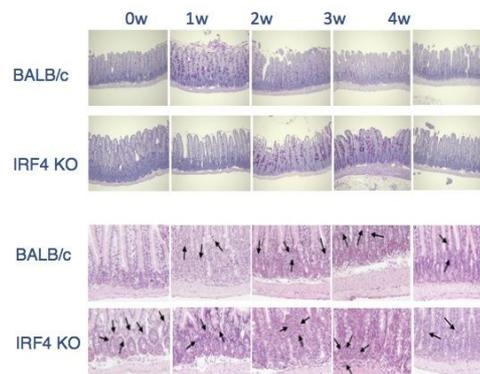
IRF4 KO および BALB/c マウスに NB を感染させて経時的に小腸内の NB 数をカウントしたところ、WT では感染 2 週以内に完全に NB が排除されたが IRF4 KO では NB は排除されなかった。しかし、感染 3 週になると IRF4 KO でも NB はほぼ完全に排虫されていることが判明した (下図左)。



脾臓細胞の CD4 T 細胞を NB 粗抗原で刺激したところ、IRF4 KO では IL4 および IL13 の産生は認められず、これまでとおり Th2 分化はないことが判明したが、腸管局所のパイエル板での Th2 分化について解析したところ、パイエル板細胞を NB 粗抗原で刺激しても野生型とは異なり、抗原特異的 IL13 産生は認められなかった。以上のことから、IRF4 KO で認められた NB 排除は Th2 非依存的であることが明らかとなった (上図右)。

この時の小腸組織像を観察したところ、排虫の時期に一致して杯細胞の過形成が認められ、時期の違いはあるものの、WT も IRF4 KO も最終的には杯細胞の過形成が排虫のメカニズムと考えられた (下図上段)。

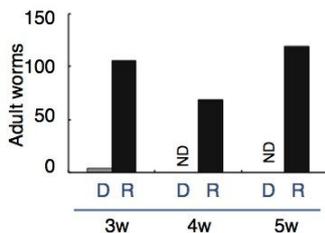
一方、HE 染色では、WT では小腸粘膜下層に様々な細胞の浸潤が認められたのに対して、IRF4 KO では激しい好酸球の浸潤が主体であった (下図下段。矢印は好酸球の集積を示す)。



#### Th2 非依存的 NB 排除は自然リンパ球が関与している:

Th2 非依存的 NB 排除が獲得免疫によるものか自然免疫によるものか解析する目的で、

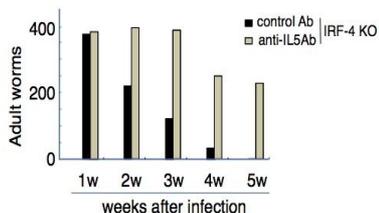
IRF4 と Rag2 のどちらも欠損した DKO を作成し感染実験を行った。下図のように Rag2 KO では感染 5 週まで小腸内に成虫は存在したが、DKO では感染 3 週で既に殆ど排中は完了し、4 週以降は全く NB は検出されなかった。このことから IRF4 KO における Th2 非依存的 NB 排除は自然免疫によるものであることが明らかとなった。



**IRF4 KO における Th2 非依存的 NB 排除には IL5 と小腸に浸潤する好酸球が関与している：**

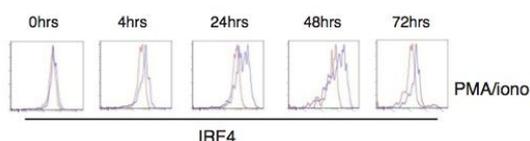
NB 感染時に IRF4 KO の小腸には著明な好酸球浸潤が認められたことから、NB 排除における好酸球の役割を解明する目的で、IRF4 KO に抗 IL5 抗体を投与し IL5 の中和実験を行った。感染 2 週前より週 2 回、腹腔内に抗 IL5 抗体を投与し、NB 数を経時的にカウントした。下図のようにコントロール抗体を投与した群に比べ抗 IL5 抗体投与群において NB の排除に著しい遅延が認められた。また、小腸組織を HE 染色したところ、抗 IL5 抗体投与群では好酸球の浸潤が抑制されただけでなく、杯細胞の過形成も認められなかった。

以上の結果から、IRF4 KO における Th2 非依存的 NB 排除は IL5 を産生する自然免疫系の細胞が重要な働きをしていることが示唆された。



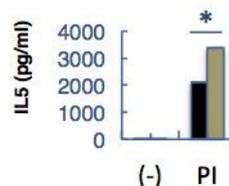
**ILC2 の分化には IRF4 は必須ではない**

そこで、本研究代表者は ILC2 に着目した。Lin<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T1/ST2<sup>+</sup>細胞を ILC2 として解析したところ、個体差はあるものの IRF4 KO においても ILC2 は野生型と遜色なく存在することが判明した。また、未刺激の ILC2 には IRF4 は発現していないが、刺激に伴い IRF4 の発現が認められた。また、この刺激に伴う IRF4 発現はマイトジェン刺激だけでなく IL25/IL2 刺激でも同様であった。

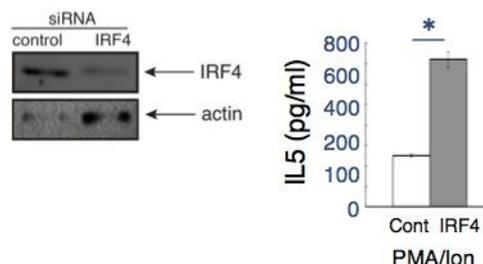


**IRF4 が直接 ILC2 からのサイトカイン産生を負に制御している：**

野生型および IRF4 KO の ILC2 細胞をソーティングで精製し、PMA/ionomycin 刺激を行ったところ、野生型に比べ IRF4 KO では IL5 産生が亢進していた(黒バー；野生型、グレーバー；IRF4 KO)。



IRF4 が直接、ILC2 からの Th2 サイトカイン産生を調節しているのか確認する目的で、野生型マウスから ILC2 細胞をソーティングで精製した後、IRF4 特異的 siRNA あるいはコントロール siRNA を導入し刺激を行った。IRF4 の発現量はウェスタンブロット法にて解析した。IRF4 特異的 siRNA の導入で IRF4 の発現は減少し、このときの IL5 産生量はコントロール siRNA 導入時に比べて著しく上昇した。これは野生型および IRF4 KO における ILC2 からの Th2 サイトカイン産生の結果と一致しており、このことから IRF4 は ILC2 のサイトカイン産生を直接、負に制御してい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 7 件)

### 1. Akbari Masoud, Kiri Honma,

Daisuke Kimura, Mana

Miyakoda, Kazumi Kimura,

Toshifumi Matsuyama,

Katsuyuki Yui. IRF4 in dendritic

cells inhibits IL-12 production

and controls Th1 immune

responses against *Leishmania*

major. *J. Immuno.* 192:

2271-2279, 2014 5.520(査読あり)

2. Kazumi Kimura, Daisuke Kimura, Yoshifumi Matsushima, Mana Miyakoda, Kiri Honma, Masao Yuda, and Katsuyuki Yui. CD8<sup>+</sup> T cells specific for a malaria cytoplasmic antigen form clusters around infected hepatocytes and are protective at the liver stage of infection. **Infection and Immunity**, 81: 3825-3834, 2013 ( 査読あり )
  3. Taiga Tamiya, Kenji Ichiyama, Hitoshi Kotani, Tomohiro Fukaya, Takashi Sekiya, Takashi Shichita, Kiri Honma, Katsuyuki Yui, Toshifumi Matsuyama, Takako Nakao, Satoru Fukuyama, Hiromasa Inoue, Masatoshi Nomura, Akihiko Yoshimura. Smad2/3 and IRF4 Play a Cooperative Role in IL-9-Producing T Cell Induction. **J. Immunol.**, 191: 2360-2371, 2013 ( 査読あり )
  4. Rika Kamei, Mana Miyakoda, Takahiko Tamura, Daisuke Kimura, Kiri Honma, Kazumi Kimura, Katsuyuki Yui. Accumulation of major histocompatibility complex class II.CD11c non lymphoid cells in the spleen during infection with Plasmodium yoelii is lymphocyte dependent. **Microbiology and Immunology**, 57: 213-223, 2013 ( 査読あり )
  5. Lam Quoc Bao, Nguyen Tien Huy, Mihoko Kikuchi, Tetsuo Yanagi, Masachika Senba, Mohammed Nasir Shuaibu, Kiri Honma, Katsuyuki Yui, Kenji Hirayama. CD19 (+) B cells Confer Protection Against Experimental Cerebral Malaria In Semi-immune Rodent Model. **PLoSOne**, 8: e64836, 2013 ( 査読あり )
  6. Mana Miyakoda, Daisuke Kimura, Kiri Honma, Kazumi Kimura, Masao Yuda, Katsuyuki Yui. Development of memory CD8<sup>+</sup> T cells and their recall responses during blood-stage infection with Plasmodium berghei ANKA. **Journal of Immunology**, 189:4396-4404, 2012 ( 査読あり )
  7. Shindo H., Yasui K., Yamamoto K., Honma K., Yui K., Kohno T., Yuhua Ma Y., Jiew CK., Kubo Y., Aihara H., Ito T., Nagayasu T., Matsuyama T., Hayashi H. Interferon regulatory factor-4 activates IL-2 and IL-4 promoters in cooperation with c-Rel. **Cytokine**, 56: 564-572, 2011 ( 査読あり )
- [ 学会発表 ] ( 計 19 件 )
1. KIMURA Daisuke, MIYAKODA Mana, KIMURA Kazumi, HONMA Kiri, HARA Hiromitsu, HORI Shohei, YOSHIDA Hiroki, YUI Katsuyuki. IL-27 is produced by CD4<sup>+</sup> T cells during infection with malaria parasites and inhibits protective immune responses. **第42回日本免疫学会総会・学術集会記録**, 2013 ( 千葉 )
  2. Miyakoda M., Honma K., Kimura D., Kimura K., Matsuyama T., Yui K. IRF4 is critical for proliferation and

- effector differentiation of CD8+ T cells. 第42回日本免疫学会総会・学術集会記録、2013(千葉)
3. Takeshi Machida, Natsumi Sakamoto, Kiri Honma, Toshifumi Matsuyama, Katsuyuki Yui, Hideharu Sekine. **IFN- $\gamma$ -receptor-1 is expressed abundantly on splenic B cells of lupus-prone MRL/lpr mice and is involved in peripheral B-cell survival/maintenance and autoantibody production**第42回日本免疫学会総会・学術集会記録、2013(千葉)
  4. Masoud Akbari, Kiri Honma, Daisuke Kiimura, Mana Miyakoda, Kazumi Kimura, Toshifumi Matsuyama, Katsuyuki Yui. The role of IRF4 expressed in DCs during protective immune responses against *Leishmania major*第81回日本寄生虫学会大会 : p.75, 2012(神戸)
  5. 本間季里, 木村大輔, 木村一美, 都田真奈, 茂呂和世, 小安重夫, 松山俊文, 由井克之: Th2 細胞非依存的 *N. brasiliensis* 感染排除機構の解析-ナチュラルヘルパー細胞の解析. 第 81 回日本寄生虫学会大会 : p.71, 2012(神戸)
  6. 木村大輔, 都田真奈, 本間季里, 木村一美, 原博満, 吉田裕樹, 由井克之: マラリア原虫感染によって引き起こされる CD4+ T 細胞の IL-2 産生抑制機序の解析. 第 81 回日本寄生虫学会大会 : p.74, 2012(神戸)
  7. Masoud Akbari, Kiri Honma, Daisuke Kimura, Mana Miyakoda, Takahiko Tamura, Kazumi Kimura, Toshifumi Matsuyama, Ulf Klein, Katsuyuki Yui : The critical role of IRF4 expressed in skin dendritic cells for the induction of protective immune responses against infection with *Leishmania major*. 第 81 回日本寄生虫学会大会 : p.58, 2012(神戸)
  8. 都田真奈, 木村大輔, 本間季里, 木村一美, 油田正夫, 由井克之: マラリア原虫感染中にみられる抗原特異的記憶 CD8+ T 細胞の二次応答の抑制. 第 81 回日本寄生虫学会大会 : p.74, 2012(神戸)
  9. 木村一美, 木村大輔, 都田真奈, 本間季里, 田村隆彦, 油田正夫, 由井克之: マラリア肝細胞期における抗原提示機構の解析. 第 81 回日本寄生虫学会大会 : p.75, 2012(神戸)
  10. 木村大輔, 都田真奈, 本間季里, 木村一美, 原博満, 吉田裕樹, 由井克之. マラリア原虫特異的 CD4T 細胞は EB13 陽性サイトカイン介して他の CD4T 細胞の IL-2 産生を抑制する第 82 回日本寄生虫学会大会 : p.75, 2012(神戸)
  11. 本間季里, 木村大輔, 木村一美, 成毛有紀, 都田真奈, 蔵重智美, 中島正洋, 松山俊文, 由井克之: Th2 非依存的な *N. brasiliensis* 感染排除機構の解析-小腸に浸潤している好酸球の解析. 第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会 : p. 88, 2011(東京)
  12. 都田真奈, 木村大輔, 本間季里, 木村一美, 油田正夫, 由井克之: マラリア原虫感染における特異的記憶 CD8+T細胞の分化. 第80回日本寄生虫学会大会・第22回日本臨床寄生虫学会大会 : p. 95, 2011(東

- 京)
13. 木村一美、木村大輔、都田真奈、本間季里、田村隆彦、油田正夫、由井克之：モデル抗原組換えマラリア原虫を用いた肝細胞期防御免疫応答の解析。第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会：p. 95, 2011 (東京)
  14. 木村大輔、都田真奈、本間季里、木村一美、油田正夫、由井克之：マラリア原虫感染により誘導される CD4<sup>+</sup>T 細胞は IL-2 産生抑制性の新規サイトカインを発現する。第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会：p. 95, 2011 (東京)
  15. 木村 大輔、都田 真奈、本間 季里、木村 一美、由井 克之：**マラリア原虫感染によって誘導される制御性 CD4<sup>+</sup>T 細胞は液性因子によって IL-2 産生を抑制する。** 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会記録：p. 207, 2011 (千葉)
  16. KIMURA Kazumi、KIMURA Daisuke、MIYAKODA Mana、HONMA Kiri、TAMURA Takahiko、YUI Katsuyuki：**モデル抗原組換えマラリア原虫を用いた肝細胞期防御免疫応答の解析。** 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会記録：p. 49, 2011 (千葉)
  17. Kiri Honma、Daisuke Kimura、Kazumi Kimura、Mana Miyakoda、Kazuyo Moro、Shigeo Koyasu、Toshifumi Matsuyama、Katsuyuki Yui：IRF4 negatively regulates Th2-type cytokine production in natural helper cells. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会記録：p. 81, 2011 (千葉)
  18. Machida Takeshi、Honma Kiri、Matsuyama Toshifumi、Yui Katsuyuki、Ruiz Phil、Fujita

Teizo、Gilkeson Gary、Sekine Hideharu：IRF-4 欠損 MRL/lpr マウスは Th1 過剰応答を起こし複数の組織に肉芽腫性病変を発症する。第 40 回日本免疫学会総会・学術集会記録：p. 84, 2011 (千葉)

〔図書〕(計 2 件)

1. 寄生虫学研究：材料と方法 2012 年版、(宇賀昭二、丸山治彦編、三恵社、名古屋) pp81-83、2012
2. カラー版ミムス微生物学 監訳 中込治 西村書店、pp69-106、2012

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間季里 (HONMA, Kiri)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：70307940

(2) 研究分担者：なし

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし

( )

研究者番号：