

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658238

研究課題名(和文)リーシュマニア原虫感染防御における微小環境の影響に着目したTh1細胞活性化の解析

研究課題名(英文)Analyses on Th1 activation for the control of Leishmania infection in immunized mice focused on the microenvironment of lymph nodes

研究代表者

松本 安喜(Matsumoto, Yasunobu)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90251420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：BALB/cマウスへのLeish111f経鼻投与により、リーシュマニア原虫の尾根部への感染は発症防御されるが、足蹠部感染は防御されない。PKH26染色原虫を非免疫マウスの尾根部および足蹠部に接種すると、足蹠部所属リンパ節に、尾根部所属リンパ節より多くの原虫貪食細胞が移入した。さらに、脾細胞のin vitro培養において、培養に添加する原虫量の増加に伴いIL-4が産生された。以上のことから、足蹠部感染時には過剰な抗原提示が膝窩リンパ節で起こるためTh2型免疫反応が惹起されやすく、免疫マウスにおいても、発症が防御しにくい可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intranasal immunization of Leish111f provides the control of Leishmaniasis at the tail-base, but not at foot pad. When PKH26-labeled Leishmania major promastigotes were injected at the tail-base or foot pad, more parasite-phagocytosed cells migrated to popliteal lymph nodes (the draining lymph node of foot pad) compared to inguinal lymph nodes (the draining lymph nodes of the tail base). IL-4 was produced in splenocyte in vitro culture when increased numbers of Leishmania promastigotes were added to the wells. These findings indicate that Th2 type immune responses are evoked in popliteal lymph nodes due to excess amount of leishmanial antigen presentation even in the immunized mice in foot pad infection of Leishmania parasites, resulting in the lesion development.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：Leishmania major 経鼻免疫 尾根部感染 足蹠部感染 所属リンパ節 蛍光標識原虫 TSA Leish111f

## 1. 研究開始当初の背景

1) 薬剤耐性原虫出現や治療コスト等の問題から、リーシュマニア症に対する有効で安価なワクチンの開発が望まれている。また、粘膜免疫法は、非侵襲的で注射に代わる免疫方法として注目されている。特に、インフルエンザウイルスに対しては、経鼻免疫法により、皮下免疫法では認められない異なる血清型ウイルスに対する交叉防御免疫を付与できることが明らかにされた (J. Infect. Dis., 2007, 196: 1313-1320)。また近年、HIV 感染において、腸管における CD4 陽性 T 細胞の機能が予後と関連することが報告され、腸管免疫の全身感染に対する影響についても注目されるようになってきた (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102: 9860-9865)。我々は、粘膜免疫法の寄生虫感染症に対する防御効果について研究しており、これまでに経鼻免疫法のマラリア伝播阻止 (Vaccine 2003, 21: 3143-3148) およびブタ回虫感染防御 (Infect. Immunol. 2003, 71: 5314-5323; J. Infect. Dis., 2004, 190: 1812-1820) における有効性について明らかにしてきた。さらに、我々は、現在臨床試験が行われているリーシュマニア症ワクチン候補分子である Leish-111f を用いて、経鼻免疫法により、Th1 型免疫反応を誘導し、リーシュマニア症に対し発症防御できることを示した (Vaccine 2010, 28: 2207-2213)。その後の研究により、我々の系では、経鼻免疫法の方が皮下注射免疫法より防御効果が高いこと、および経鼻免疫による防御効果はリーシュマニア原虫の感染部位により異なることが示された (第 147 回および第 148 回日本獣医学会において報告)。また、リーシュマニア原虫感染部位により、同じマウス株においても病変の進行が異なることが知られている (IAI 2000, 68: 6561-6566, IAI 2003, 71: 6830-6834)。同程度の Th1 反応が誘導されているにも関わらず、免疫部位や感染部位により発症防御効果に違いがある機構を明らかにする目的で、免疫部位の違いに伴う免疫抗原に対する反応性の比較、および免疫・感染動物の感染部位における解剖学的特徴の解析を行うことを計画した。

2) 本研究は、経鼻免疫投与・非投与マウスにおける原虫感染後の感染部位およびその所属リンパ節における原虫の動態と組織マクロファージや樹状細胞のリンパ節への移動を蛍光ラベルした原虫を用いて観察し、原虫、原虫感染マクロファージ、原虫抗原提示樹状細胞などの数と移動するタイミングを免疫により病変を形成しない尾根部感染と形成する足蹠部感染の間で比較する。また、可能であれば、それぞれの感染時にリンパ節へ移入してきた抗原提示細胞およびリンパ節へ侵入した原虫を貪食したリンパ節内樹状細胞による Th1/Th2 細胞活性化能を比較する、

などにより、原虫および原虫抗原を提示する樹状細胞のリンパ節内への移入動態が、宿主の Th1/Th2 バランスに影響するかどうかを明らかにする。

3) 一般に、ワクチンモデルは、安定して効果のみられる感染モデルを確立するので、確立された感染方法以外の感染方法が検討されることは少ない。仮に研究されていても、病態の変化を報告しているに過ぎない。本研究の特徴である、同一免疫接種を行った動物の異なる部位に感染を受けた場合に免疫動態を感染部位周辺の微小環境において研究することは、ワクチンの実際の使用時における効果の予測に非常に参考となる結果を得ることができ、意義深いと考えられる。また、経鼻免疫により、Th1 が効果的に誘導されるという系は、我々の感染モデル以外ではほとんど見当たらない。細胞性免疫に特化して、粘膜免疫の有効性を検討しているところが、本研究の特徴でもある。薬剤耐性微生物の出現や、治療コストの問題から、有効な治療法を利用できない国々において、痛みを伴わない、粘膜投与型ワクチンへの期待は高い。本研究の結果として、経鼻免疫法と皮下免疫法の効果の違いを、分子レベルで明らかにすることができれば、実際の臨床使用に向けて、安全で有効な粘膜免疫法を確立するための新たな指標を定めることができると考える。

4) リーシュマニア症などの原虫感染症では、症状が改善しても、原虫が体内から消失するわけではなく、少数の原虫が体内に存在し、原虫抵抗性を有する Th1 細胞を持続的に活性化することにより、病変形成を抑えているという特徴を持つ。本研究では、同様に免疫したマウスに対し、異所性に感染させるので、治癒する場合もしない場合も、免疫反応に共通点も多くなることが予想される。しかし、免疫マウスでは、尾根部においては感染防御効果を持つ Th1 細胞が全身をめぐっているため、それらの再活性化を促す感染局所の微小環境における抗原提示の場において、足蹠部感染では変化があることが予想されるが、それを示すデータを得るには、経時的に抗原提示能を検討する必要がある。このように、本研究は、生体反応を制御する機構の一端を明らかにすることを目的としており、得られる結果は、獣医領域のみならず、ヒトの医療においても重要な知見になると思われる。また、現状のワクチンは、人のポリオワクチンや、鶏のニューカッスル病ワクチンなどの経口ワクチンを除くと、ほとんどが皮下または筋肉内投与型の注射により接種されるが、室温保存が可能な、安価で非侵襲性の粘膜免疫法、あるいは経皮免疫法が確立されれば、現在、財政的理由でワクチン接種ができていない地域や、流行地における感染症対策に有効な手段となることが期待される。

5)本免疫系の特徴は、経鼻投与型免疫により Th1 反応を誘導し、尾根部と足臑部において認められる異なる防御効果を解析するため、蛍光標識した原虫を感染させる系を計画している。一般に、原虫の蛍光標識には、EGFP 遺伝子を導入した原虫を用いるが、この場合、EGFP は、原虫が死滅すると速やかに蛍光が消失するため、原虫を貪食して消化し、抗原提示をしている細胞を検出することが不可能であった。本研究では、PKH26 や CFSE により原虫を染色し、これをマクロファージや DC が貪食することにより、たとえ原虫が細胞内で消化されても、色素が貪食細胞内に留まり、蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメーターを用いて検出・解析することが可能となると期待される。In vitro における原虫のマクロファージによる貪食試験では、良好に貪食マクロファージを染色することができた。原虫などの染色にこれらの蛍光色素が用いられることはあったが、貪食後の細胞を染色するという発想に基づく論文は、少なくともみられなかった。色素による染色は、EGFP などの蛍光蛋白を発現させる遺伝子導入微生物の利用よりかなり古くから使われる方法であるが、本研究のように新たな発想で利用することも可能である。このような新しい方法論を、古典的なギムザ染色や EGFP 発現原虫と併用して解析することにより、原虫の活動と免疫細胞の動態や活性化状態を観察することが可能となり、in vivo における免疫反応を研究する新しい方法を提案することができると考える。

## 2. 研究の目的

我々は、これまでに世界的に重要な人獣共通感染症であるリーシュマニア症をモデル疾患として、粘膜免疫法の有効性を、従来法である皮下免疫法と比較しつつ、免疫学的に検証してきた。近年我々は、BALB/c マウスにおいて、経鼻免疫により発症防御的 Th1 が誘導された場合、尾根部へのリーシュマニア原虫感染に対しては、完全に発症を防御するのに対し、足臑部感染では、ほとんど発症防御されないことを見出した。本研究の目的は、感染部位の微小環境が、防御免疫誘導に影響しているかどうかを、解剖学的に、および免疫学的に検証することである。

## 3. 研究の方法

1) リーシュマニア原虫蛍光色素標識の最適化：まず、原虫を PKH26 で染色する。10% FCS-199 培地で培養していた原虫を PKH26 と混合後、10 分間室温で静置する。染色された原虫を、10%FCS-199 培地で懸濁し、実験に使用する。

2) 非免疫マウスにおける尾根部および足臑部への蛍光標識原虫の感染と蛍光標識原虫貪食抗原提示細胞の所属リンパ節への移行の観察：1)で作製した蛍光色素標識原虫(*L. major* PM2 株 (MHOM/UZ/91/PM2) または Friedlin 株 (MHOM/IL/81/Friedlin)) と、既に作製された EGFP 遺伝子導入 *L. major* PM2 株をマウスの尾根部または足臑部に感染させ、経時的に所属リンパ節である鼠径または膝窩リンパ節を回収する。回収した感染組織中の標識原虫を組織ごと倒立蛍光顕微鏡で観察し、感染組織から所属リンパ節までの原虫移入の動態を把握する。

3) フローサイトメーターを用いた膝窩リンパ節および鼠径リンパ節への移入原虫貪食細胞および樹状細胞の計量：リンパ節へ移行した原虫貪食細胞を、CD11b, CD11c, MHC class II などに対する抗体で染色した後、フローサイトメーターにより解析・分類する。

4) in vitro における原虫感染脾細胞におけるサイトカイン産生：Leish-111f またはその構成成分をコレラ毒素とともに経鼻免疫したマウスまたは非免疫マウスの脾細胞を回収し、96 ウェルプレート内で *L. major* 原虫または原虫可溶性抗原 (SLA) とともに 72 時間培養し、上清中の IFN および IL-4 をサイトカイン ELISA により測定した。

5) 尾根部および足臑部感染マウス所属リンパ節におけるサイトカイン mRNA の経時的変化：Leish-111f またはその構成成分をコレラ毒素とともに経鼻免疫したマウスに *L. major* 原虫を尾根部または足臑部に感染させ、経時的に所属リンパ節を回収、mRNA を抽出し、Real time RT-PCR により、IFN および IL-4 mRNA 量の推移を計測する。

## 4. 研究成果

1) リーシュマニア原虫蛍光色素標識の最適化：10%FCS-199 培地で維持培養した原虫 (*Leishmania major* PM2 株および Friedlin 株) を PKH26 と混合後、10 分から 30 分室温で静置すると、ほぼすべての原虫が染色されることが分かった。

2) 非免疫マウスにおける尾根部および足臑部への蛍光標識原虫の感染と蛍光標識原虫貪食抗原提示細胞の所属リンパ節への移行の観察：1)で作製した蛍光色素標識原虫と、既に作製された EGFP 遺伝子導入 *L. major* PM2 株を無処置マウスの尾根部および足臑部へ接種し、経時的に所属リンパ節を回収し、移入している原虫を蛍光観察した。EGFP 原虫は、原虫が破壊されると蛍光を発しなくなるため、貪食されていない原虫が、貪食されたが、

マクロファージ内で感染維持されている原虫が観察される。足蹠部接種の場合、所属リンパ節である膝窩リンパ節には、どの観察時間においても、量の多寡はあれ、原虫が観察された。一方、尾根部接種時の所属リンパ節である、鼠径リンパ節では、原虫が観察できないこともあり、観察できた時も、膝窩リンパ節に比べ、数が少なくなっていた。PKH26は、染めた原虫のみならず、原虫を貪食し、分解した細胞をも赤く染めるため、観察された蛍光は、原虫と、原虫を貪食した細胞を表していると考えられる。PKH26染色原虫を感染させた場合、足蹠部接種マウスの膝窩リンパ節では、常に大量の赤い細胞が、リンパ節全体、特にT細胞領域と思われる部分に分布していた。一方、尾根部接種の鼠径リンパ節では、1～3時間ではほとんど細胞が観察されず、6時間以降、細胞が観察され始めてからも、輸出リンパ管付近と思われるくぼみのみに観察され、週単位の時間がたったあとでも、この状態は変わらなかった。

3) フローサイトメーターを用いた膝窩リンパ節および鼠径リンパ節への移入原虫貪食細胞および樹状細胞の計量：初めに、非免疫マウスへ蛍光染色原虫を接種し、所属リンパ節の凍結切片の観察から、リンパ節に移入している原虫貪食細胞は、T細胞および樹状細胞(DC)が分布する傍皮質領域に認められた。また、これらのリンパ節より調整した細胞をCD11bおよびCD11c抗体で染色し、フローサイトメーターにより解析したところ、貪食細胞の3割から5割がDCであること、および、総リンパ節細胞に占める原虫貪食DCの割合は、膝窩リンパ節の方が鼠径リンパ節より3から5倍多いことが示された。また、脾臓由来DCに異なる数の原虫を貪食させ、脾細胞と反応させると、添加した原虫量に依存して、IL-4産生が認められた。

4) in vitro における原虫感染脾細胞におけるサイトカイン産生：TSAにコレラ毒素アジュバントを加え、経鼻免疫したマウス(TSA+CT)の脾細胞に異なる数の原虫を添加した場合、 $10^5$ - $10^6$ の原虫を添加した場合にIL-4およびIFNの産生が認められた。一方、非免疫マウスの脾細胞では、 $4 \times 10^6$ の原虫を添加した際にIL-4産生が認められる個体があった。また、原虫の可溶性抗原(SLA)を添加した場合は、 $10^6$ 原虫相当を投与した際にIL-4産生が認められたことから、原虫をそのまま添加した方が、SLAを添加するよりもTh細胞の再活性化効果が高いことが示唆された。

5) 尾根部および足蹠部感染マウス所属リンパ節におけるサイトカイン mRNA の経時的変化：感染後の所属リンパ節におけるサイトカインの産生動態をreal time RT-PCRにより解析した。IFN mRNAは、病変が消失する尾根部感染免疫マウスの鼠径リンパ節におい

て、感染後16時間に高値を示した後48時間以降は低値であった。それに対し、非免疫マウスおよび免疫マウス足蹠部感染マウスの所属リンパ節では、48時間およびそれ以降にも若干の産生が認められ、病変の進行が認められる場合の方が脾細胞の抗原刺激に対するIFN産生の持続が認められるというこれまでの知見に相関する結果であった。一方IL-4 mRNAは、48時間以降に上昇する傾向がすべての群のリンパ節で認められた。

6) 考察：in vitroの刺激試験により、原虫抗原量が増すとIL-4産生が増えることが示唆された。足蹠部感染時には、過剰な抗原提示が膝窩リンパ節で起こるため、Th2型免疫反応が惹起されやすく、そのため免疫マウスにおいても発症が抑えられなかった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 0件)

[学会発表](計 1件)

磯村開、岩崎雄亮、綱嶋るみ、杉浦勝明、松本安喜、尾根部および足蹠部へのリーシュマニア接種時の所属リンパ節における原虫貪食細胞数の違い、第155回日本獣医学会、2013年3月28日、東京大学駒場キャンパス(日本獣医寄生虫学会ポスター賞受賞)

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 安喜 (MATSUMOTO, Yasunobu)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：90251420