

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790402

研究課題名(和文)住血吸虫性肝障害発症プロセスにおける、肝臓特異的免疫細胞の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the unique hepatic T cell population induced during *Schistosoma mansoni* infection in mice

研究代表者

安達 圭志 (ADACHI, Keishi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40598611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯地方を中心に深刻な問題となっている住血吸虫感染症の病態の主体をなす肝障害の発症機構を明らかにし、重篤化防御への基礎的知見を得ることを目指した。

その結果、1) 非常に特異なサイトカイン産生能を有するCD4陽性T細胞、すなわち、IFN- γ とIL-13、IFN- γ とIL-4、あるいはIFN- γ 、IL-13、IL-4の3つを同時に産生する細胞が、肝臓特異的に誘導されること、2) その増殖にはIL-18が関与していること、を発見した。

上記のようなT細胞はこれまで報告がなされておらず、新たなT細胞サブセットの発見である可能性がある。これは、免疫学的、T細胞生物学的に重要な意義を有している。

研究成果の概要(英文)：In schistosomiasis, serious hepatic disorders are induced in the host. A liver possesses unusual immune systems composed of the specialized cells different from those of other immune competent organs or tissues. The goal of my project was to elucidate the mechanisms underlying the hepatic disorders induced after *Schistosoma mansoni* infection.

We demonstrated several characteristic immune responses in the *Schistosoma mansoni*-infected mice; 1) the unique T cell populations which were doubly positive for IFN- γ and IL-13 and for IFN- γ and IL-4, and were triply positive for IFN- γ , IL-13 and IL-4 were induced in the livers, 2) IL-18 produced during the infection play a major role in the expansion of the unique hepatic T cell populations.

Those conventional T cell populations described above has not been reported, indicating the involvement of liver-intrinsic immune environments in the hepatic disorders, and the importance of the unique hepatic T cells in immunology and in T cell biology.

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：肝臓 T細胞 住血吸虫 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 住血吸虫症は、全世界で2億人以上が罹患している。我が国も、かつては日本住血吸虫の常在地であり、多くの命が日本住血吸虫症によって失われた。マンソン住血吸虫症は、アフリカの広範な地域において風土病として猛威をふるっており、報告があるだけでも約1億人が罹患している。肝硬変等で死に至ることによる人的被害はもとより、死に至らない場合でも、罹患者の経済活動は著しく低下する。本疾患による経済的被害は深刻であり、途上国の貧困を増長し、アフリカの発展を妨げる一因ともなっている。その結果、住血吸虫症の対策は遅々として進まず、負の連鎖に陥っている。したがって、住血吸虫症に関する研究成果を生かしてその対策を講ずることは、途上国の自立的、持続的成長に貢献し得るものであり、経済面だけではない国際貢献が叫ばれて久しい今日においては、途上国のみならず、延いては我が国の国益にも適うものである。しかしながら、"Neglected Tropical Disease" である住血吸虫症に関する免疫生化学的な知見の蓄積は致命的に不足しており、これが病態の理解ならびに制御法開発の阻害要因となっている。

(2) 経皮的に宿主体内に侵入したセルカリアは、宿主体内で成虫へ成長し、好寄生部位である肝門脈内で虫卵を産出するようになる。虫卵の一部は、腸管腔内へ移送され、糞便と共に宿主体外に排出されて、生活環の次のステージへ移行する。しかし、多くの虫卵は血流により肝臓内へ輸送され、肝臓内の細血管に塞栓を起こし、周囲の肝実質細胞の壊死を引き起こす。さらに、虫卵や虫卵から分泌される液性因子は、様々な免疫細胞の遊走を伴った激しい免疫反応を惹起する。その結果、肝逸脱酵素上昇を伴う、塞栓を引き起こした虫卵を中心とした肝実質細胞の傷害、線維化、肉芽腫形成等が誘導され、最終的には肝硬変・門脈圧の亢進とそれに続く致命的症状が引き起こされる。

(3) 肝臓は、他の免疫系臓器とは異なる非常にユニークな臓器特異的な免疫細胞からなる免疫システムを構築している。また、血流に加え腸管由来の抗原が恒常的に流入し、比較的長時間、臓器内に留まる。にも関わらず、定常状態では免疫反応は抑制されており、肝リンパ球の多くは、'activated yet resting' な表現型を示し、いわば抑制の“籠(たが)”がかかった状態にある。しかしながら、この

抑制の“籠”の分子生物学的なメカニズムについては、未知の部分が多い。一方で、ウイルス等の病原体が肝臓内に侵入すると、肝臓内のT細胞は、エフェクター細胞として機能し始め、激しい免疫反応が惹起され、肝障害が誘導される。すなわち、何らかのメカニズムにより抑制の“籠”が外されるのであるが、そのメカニズムもまた、不明なことが多い。

2. 研究の目的

住血吸虫症の重症化において、T細胞が決定的な役割を担っていることが、遺伝子改変マウスを用いた系で報告されている。しかし、肝臓は、その臓器内免疫系のユニークさ故に、解析し辛い臓器であり、住血吸虫感染後、肝臓内T細胞が、「いつ」「どのように」肝臓内で質的变化を起こし、その機能を発揮するのかが不明であり、エフェクター細胞の同定には、未だ至っていなかった。

セルカリア感染後、T細胞をはじめとする宿主のsystemicな免疫系は、劇的にその機能を変化させる。例えば、感染初期には、systemicな免疫系はTh1優位であるが、感染後期になるとTh2優位な状態へ変化する。病変自体は、Th2優位期に顕著になるため、住血吸虫症に関する研究の殆どは、Th2優位期に関するものであった。一方、病態の中心である肝臓の、臓器特異的免疫反応については、未知の部分が多い。特に、自然感染での病態形成・制御に直接関わる肝臓内T細胞の、“抑制の籠が嵌められた状態”から、肝障害誘導性細胞(あるいはエフェクター細胞)へと分化していく過程での、機能的・質的变化が、いかなるメカニズムによってコントロールされているかについては、未だ不明のままであった。

そこで、申請者のこれまでの肝臓免疫系に関する研究経験を生かし、リンパ球、肝実質細胞等、肝臓内の各細胞分画を単離する技術を用いて、特異な性質を有する肝臓内T細胞とその他の細胞集団との相互作用に注目して解析を行い、肝障害に直接関わるエフェクター細胞集団の同定と、細胞傷害機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) マンソン住血吸虫を用いた研究では、大量のセルカリア(100隻以上)をマウスに接種する急性感染モデルが、多くの場合で採用されている。しかし、本研究計画では、より自然感染の状態に近づけるために、ごく少数

(25 隻)のセルカリアをマウスに感染させることとし、単性感染に陥ることなく、安定して感染を成立させる系を確立した。

(2) 上記を踏まえ、マンソン住血吸虫セルカリアを人為的に経皮感染させたマウスを用いて、住血吸虫症の病態、特に肝障害を中心に、その表現型・重症度や、病態形成、あるいは防御に関わる因子を解析するべく、経時的に感染マウスからサンプリングし、個体、組織、細胞、遺伝子、分子、各レベルにおいて、種々の免疫学的実験を行なった。特に、ノックアウトマウス等の遺伝子改変マウスや、抗体・薬剤投与等の処置を施したマウスを用いて、コントロールマウス群と比較・解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 平成 24 年度は、感染後の初期 Th1 優位期と後期 Th2 優位期の間のフェーズ移行期に、次のような特異な反応が認められることを発見した。

血清中の IL-18 レベルが上昇する。

血中 IL-18 レベルの上昇と時間的に同期して、非常にユニークなサイトカイン産生能を有する CD4 陽性 T 細胞、すなわち、IFN- γ と IL-13、あるいは、IFN- γ と IL-4 を同時に産生する細胞が、肝臓特異的に誘導されること(図 1)。

そして、このユニークな肝 T 細胞集団は、以下のような特徴を持つことも発見した。

NK マーカーのひとつである DX5 の陽性集団と陰性集団に分けられること。

TCR 陰性であること。

IL-4、IL-13 と同じ Th2 サイトカインである IL-5 の産生は殆ど認められず、Th2 サイトカインの選択的産生性を持つこと。

IFN- γ 、IL-13、IL-4、これら 3 つのサイトカインを同時に産生する細胞集団も含んでいること。

(2) 平成 25 年度は、上記の成果を踏まえ、ユニークな肝 T 細胞の増殖因子、細胞表面マーカーや転写因子等を詳細に検討した。その結果、

炎症性サイトカインのひとつである IL-18 が、その増殖に深く関与していること(次ページ 図 2)。

感染初期から、肝臓内では IL-18 が高いレベルで産生されていること。

ユニークな肝 T 細胞には IL-18 レセプターが発現しており、直接 IL-18 が作用する可能性があること。

iNKT 細胞や Follicular helper T 細胞とは別種の細胞集団から構成されていること。

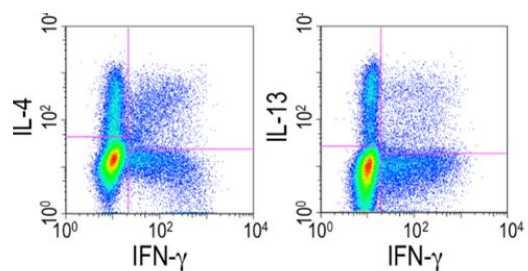
特異なサイトカイン産生能を示すある種の T 細胞や NKT 細胞において、特徴的に発現している転写因子 PLZF の役割は、この肝 T 細胞集団においては小さいこと。

従来、一細胞内では同時には発現しないと考えられてきた Th1 系サイトカインの産生を支配する転写因子 T-bet と、Th2 系サイトカインの産生を支配する転写因子 GATA3 が、ユニークな肝 T 細胞内では共存していること。

などを明らかにした。

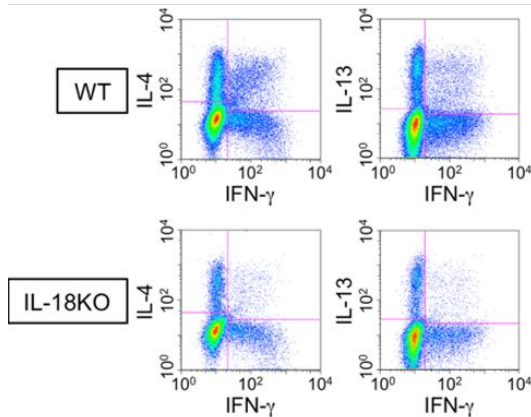
上記のようなユニークなサイトカイン産生能を有する T 細胞集団が、肝臓特異的に誘導されていることを考えると、病態形成における肝臓の免疫臓器・免疫環境としての重要性が示唆されている。また、申請者が今回明らかにしたような特徴を示す T 細胞はこれまで報告がなされておらず、新たな T 細胞サブセットの発見である可能性がある。これは、住血吸虫症の理解を深めるのみならず、免疫学的、T 細胞生物学的に重要な意義を有している。

図 1



マンソン住血吸虫感染マウスの肝臓からリンパ球を分離して活性化し、細胞内のサイトカインをフローサイトメーターで解析した。

図2



野生型マウス(WT)、IL-18 欠損マウス(IL-18KO)、それぞれにマンソン住血吸虫を感染させ、肝臓からリンパ球を分離した。活性化後、細胞内のサイトカインをフローサイトメーターで解析した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Keishi Adachi, Risa Nakamura, Yoshio Osada, Masachika Senba, Koji Tamada, Shinjiro Hamano (2014)

Involvement of IL-18 in the Expansion of Unique Hepatic T Cells with Unconventional Cytokine Profiles during *Schistosoma mansoni* Infection.

PLoS One. 9:e96042.

doi: 10.1371/journal.pone.0096042.

査読有

Keishi Adachi, Yoshio Osada, Risa Nakamura, Koji Tamada, Shinjiro Hamano (2013)

Unique T Cells with Unconventional Cytokine Profiles Induced in the Livers of Mice during *Schistosoma mansoni* Infection

PLoS One. 8:e82698.

doi: 10.1371/journal.pone.0082698.

査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

Keishi Adachi, Yoshio Osada, Risa Nakamura, Koji Tamada, Shinjiro Hamano

マンソン住血吸虫感染時にマウスの肝臓内で増加する、ユニークなサイトカイン産生能を有する T 細胞集団について

第 54 回日本熱帯医学会大会、2013 年 10 月 04 日～2013 年 10 月 05 日、長崎県長崎市(長崎ブリックホール)

Keishi Adachi, Shinjiro Hamano

マンソン住血吸虫感染マウスの肝臓内に認められる、ユニークな T 細胞集団の解析

第 82 回日本寄生虫学会大会、2013 年 03 月 29 日～31 日、東京都文京区(東京医科歯科大学)

Keishi Adachi, Shinjiro Hamano

Analysis of the unique hepatic T cell population induced during *Schistosoma mansoni* infection in mice

The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Disease、2012 年 12 月 10 日～12 日、長崎県長崎市(長崎大学良順会館)

Keishi Adachi, Shinjiro Hamano

Analysis of the unique hepatic T cell population induced during *Schistosoma mansoni* infection in mice

第 41 回日本免疫学会学術集会、2012 年 12 月 05 日～07 日、兵庫県神戸市(神戸国際会議場)

安達 圭志、濱野 真二郎(発表は濱野)

マンソン住血吸虫感染が誘導するユニークな肝臓内免疫反応について

第 65 回日本寄生虫学会・第 62 回日本衛生動物学会南日本支部合同大会、2012 年 11 月 10 日～11 日、長崎県長崎市(長崎大学医学部ポンベ会館)

Keishi Adachi, Shinjiro Hamano

Analysis of the unique hepatic T cell population induced during *Schistosoma mansoni* infection in mice

第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム、2012 年 10 月 12 日～13 日、群馬県前橋市(群馬大学医学部刀城会館)

安達 圭志、濱野 真二郎

マンソン住血吸虫感染マウスの肝臓に誘導される、ユニークな T 細胞について

第 6 回蠕虫研究会、2012 年 07 月 27 日～28 日、宮崎県宮崎市(青島サンクマール)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

安達 圭志 (ADACHI, Keishi)

(2012年12月まで)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

(2012年12月以降)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40598611