

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670226

研究課題名(和文) 寄生虫による免疫変調への腸内細菌の関与と炎症性疾患治療への応用

研究課題名(英文) Effects of intestinal microbites on immune modulation during helminthic infections and its application to prevention of inflammatory disorders

研究代表者

久枝 一 (Hisaeda, Hajime)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50243689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腸管寄生虫と腸内細菌の相互作用を解析した。腸管内寄生性線虫、*Heligmosomoides polygyrus* (Hp) をマウスに感染させても、腸内細菌叢にほとんど変化は見られなかった。また、抗生物質を投与し腸内細菌を減じたマウスでのHpの感染動態に変化は見られなかったことから、Hpと腸内細菌の関連性は希薄であることが示された。

予想外に、赤血球寄生性のマラリア原虫をマウスに感染させると、腸管症状を伴う腸内細菌叢の変化が見られ、免疫変調が認められる致死性マラリアにおいて顕著であった。マラリア患者でも免疫抑制が見られ、マラリアにおける免疫変調に腸内細菌が関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although intestinal parasites are known to suppress immunity, it is still unknown how they modulate systemic immunity from the intestines. In this research, interactions between intestinal parasites and microbiota reported to influence immune systems were analyzed. Infection of mice with a rodent intestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus* (Hp), did not alter the microbiota. The reduction of microbiota in mice treated with antibiotics did not affect the course of infection with Hp. These results indicate little interactions between Hp and microbiota.

Unexpectedly, mice infected with malaria parasites that infect red blood cells exhibited remarkable changes in microbiota in association with intestinal symptoms. The degree of alteration in microbiota was greater in mice infected with the malaria parasites causing lethal infection and immune suppression. Our results suggest that intestinal microbiota is involved in immune modulation observed in malaria.

研究分野：免疫学、寄生虫学

キーワード：腸管寄生性線虫 免疫制御 腸内細菌 マラリア

## 1. 研究開始当初の背景

寄生虫は他の病原体と異なり唯一 Th2 を誘導する。Th2 だけでなく、制御性 T 細胞や alternatively activated macrophages (AAM) 等、抑制性の免疫応答を誘導する。これらの免疫変調は、寄生虫が宿主免疫系による排除を逃れるための強力な免疫抑制であると想定されている。実際に申請者らも、腸管寄生虫がある種の感染に対する免疫応答を抑制することを報告してきた。一方で、寄生虫による免疫変調はアレルギーなど不利益な免疫応答をも抑えていることが示唆されている。しかしながら、寄生虫が如何にしてこのような特殊な免疫応答を誘導するのかは不明である。

近年、腸内環境、とくに腸内細菌が全身の免疫応答に影響を与え、種々の炎症病態に関与していることが報告されてきた。例えば、アレルギー患者ではビフィズス菌など、いわゆる善玉菌が減少し、クロストリジウムなどの悪玉菌が増えていることが知られてきた。このように、腸内細菌もまた免疫応答の制御に深く関与していることが示唆される。多くの寄生虫は腸管に寄生することから、腸内細菌と直接的に接触することは容易に想像できるが、腸管寄生虫と腸内細菌の相互作用はよく分かっていない。本研究では腸管寄生虫による免疫変調に腸内細菌が関与する、さらにいえば、寄生虫が腸内環境を整えアレルギーを抑制する、との仮説に至った。

## 2. 研究の目的

腸管寄生虫による免疫変調への腸内細菌の関与を実証することを目的に、マウス腸管寄生虫モデルを用いて以下のように研究を進める。

腸管寄生虫感染の免疫応答変調の実体を明らかにするとともに、腸内細菌叢への影響を詳細に解析することで、寄生虫感染によって起こる免疫学的・細菌学的現象をとらまえる。腸内細菌のこれらの現象に対する影響を、抗生物質を投与し腸内細菌を減じたマウスでの寄生虫感染時の応答を解析することで明確にする。

## 3. 研究の方法

マウス腸管寄生虫モデルを用いて、腸管寄生虫による免疫変調への腸内細菌の関与を実証する。

1. 寄生虫感染時の腸内細菌叢の変調を、糞便 DNA を用いた腸内細菌定量により検討する。

2. 寄生虫感染時の免疫応答を抗生物質投与の有無で比較し、腸内細菌の関与を明確にする。

3. 衛生仮説の裏付けを念頭に入れ、寄生虫感染マウスに種々の炎症を惹起し寄生虫による炎症

抑制効果を確認、抗生物質の有無での炎症抑制効果を比較し、腸内細菌の影響を検討する。

## 4. 研究成果

### 寄生虫感染の腸内細菌への影響

本研究ではマウス腸管寄生虫 *Heligmosomoides polygyrus* (Hp) の感染モデルを用いる。Hp の感染は感染マウスの糞便中の虫卵を培養し、感染型の第三期幼虫に発育させ 200 隻を、ゾンデを用いて経口感染させた。糞便重量あたりの細菌数を好気的および嫌气的培養下で概算したところ、感染マウスでも非感染マウスと量的な変化は見られなかった。糞便より DNA を抽出し PCR 法にて細菌の 16S rRNA を増幅し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析により行った詳細な菌種の半定量でも、Hp を感染させたマウスでも感染前と大差のないことが明らかとなった。

### 腸内細菌の寄生虫感染への影響

腸内細菌叢の Hp 感染への影響を見るために、飲水にてアンピシリン、ストレプトマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾールの抗生物質カクテルを経口投与したマウスに Hp を感染させた。Hp の感染動態を、糞便中の虫卵数を経時的に計測すること、感染後 21 日目に小腸内の成虫数を測定することで検討した。抗生物質投与マウ

スにおいても、成虫体数も虫卵数も対照群と変化ないことから、腸内細菌が Hp の発育に影響を与えないことが分かった。

以上の結果は、Hp 感染と腸内細菌叢にはあまり関連がないことを示しており、当初の計画を若干変更し、腸管寄生性ではないがその患者では腸管症状も認められる、血液寄生性のマラリア原虫と腸内細菌の関連性を検討することとした。

#### マラリア感染の腸内細菌への影響

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA(以下 PbA)の感染赤血球を C57BL/6, BALB/c マウスに腹腔内接種し感染させた。C57BL/6 マウスでは、感染後 8 日目までにほとんどのマウスが神経症状を呈し脳マラリアにより死亡する。この時期には、血中の原虫感染赤血球率は 10%以下と低く、免疫系の過活性化が脳マラリアの発症の原因とされる。このマウスでは、脳マラリアの発症時期に合わせて、腸管、主に小腸粘膜の剥離や血管の閉塞という病理所見が認められた。さらに、予想外に腸内細菌叢が顕著に変化していた。一方、BALB/c マウスでは、脳マラリアは認められず、感染後 30 日までに原虫は著しく増加し、最終的に重度の貧血を伴い死に至る。これらのマウスでは、腸管の病理学的変化は認めず、腸内細菌叢の変化もわずかであった。

以上の結果は、脳マラリアを発症するマウスでは、腸内病変を伴い腸内細菌叢が変化することを明確に示しており、マラリアにおける病理変化に腸内細菌が関わっていることを示唆する。

#### 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、いずれも査読あり)

Imai T, Ishida H, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Suzuki T, Shimokawa C, and Hisaeda H: CD8<sup>+</sup> T

cell activation by murine erythroblasts infected with malaria parasites. **Sci. Rep.** 3: 1572, 2013. doi: 10.1038/srep01572.

Duan X, Imai T, Chou B, Tu L, Himeno K, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, and Hisaeda H: Resistance to malaria by enhanced phagocytosis of erythrocytes in LMP7-deficient mice. **PLoS One** 8: e59633, 2013.

doi: 10.1371/journal.pone.0059633.

Ishida H, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Yoshimura A, Iwakura Y, Okada H, Suzuki T, Shimokawa C, and Hisaeda H: IL-23 protection against *Plasmodium berghei* infection in mice is partially dependent on IL-17 from macrophages. **Eur. J. Immunol.** 43: 2696-2706, 2013.

doi: 10.1002/eji.201343493.

Shimokawa C, Culleton R, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Kobayashi S, Hisaeda H, and Hamano S: Species-specific immunity induced by infection with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba moshkovskii* in mice. **PLoS One** 8: e82025, 2013.

doi: 10.1371/journal.pone.0082025.

Honma H, Hirai M, Nakamura S, Hakimi H, Kawazu SI, Palacpac NM, Hisaeda H, Matsuoka H, Kawai S, Endo H, Yasunaga T, Ohashi J, Mita T, Horii T, Furusawa M, and Tanabe K. Generation of Rodent Malaria Parasites with a High Mutation Rate by Destructing Proofreading Activity of DNA Polymerase  $\delta$ . **DNA Res.** 21: 439-446, 2014.

doi: 10.1093/dnares/dsu009.

Imai T, Iwawaki T, Akai R, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Okada H, and Hisaeda H: Evaluating experimental cerebral malaria using oxidative stress indicator OKD48 mice. **Int. J. Parasitol.** 44: 681-685, 2014.

doi: 10.1016/j.ijpara.2014.06.002.

Imai T, Ishida H, Suzue K, Taniguchi T, Okada H, Shimokawa C, and Hisaeda H: Cytotoxic activities of CD8<sup>+</sup> T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. **Elife** 4, doi: 10.7554/eLife.04232 2015.

〔学会発表〕(計7件)

久枝 一、マラリア病態を決定する宿主病原体相互関係の解明、第36回分子生物学会、神戸、2013年12月

谷口委代、久枝 一、他8名、ネズミマラリアにおける腸内細菌叢の劇的な変化、第83回日本寄生虫学会、松山、2014年3月

谷口委代、久枝 一、他8名、ネズミマラリアにおける腸管病変と腸内細菌叢の変化、第84回日本寄生虫学会、三鷹、2015年3月

〔図書〕(計1件)

久枝 一、南山堂、戸田新細菌学、2014、772-785

〔産業財産権〕 該当なし

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.med.gunma-u.ac.jp/med-organization/envmed/envmed-defense/157.html/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久枝 一 (HISAEDA Hajime)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50243689

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者 いずれも該当なし