

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450401

研究課題名(和文) 旋毛虫感染による宿主の即時型アレルギー抑制機構の解明

研究課題名(英文) Immunological analysis of suppression mechanism of immediate hypersensitivity by infection of *Trichinella pseudospiralis*

研究代表者

長野 功 (Nagano, Isao)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40283296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：旋毛虫感染では宿主の免疫能に大きな影響をおよぼす。今回はマウスにスギ花粉を感作し、旋毛虫感染または旋毛虫分泌タンパク質(Tp53)による宿主の即時型アレルギー反応への影響について検討した。その結果、肺の炎症反応は減弱し、特異的なIgE、IgG2a、IgG2bの産生量は低下した。また、感染マウスまたはTp53投与脾細胞のIL-4、IL-17の産生量も抑制されていた。一方、Tp53は脾細胞のLPS刺激によるNF- $\kappa$ Bシグナル経路を抑制したが、その機構はIKKのリン酸化を抑制して、I $\kappa$ Baのリン酸化および分解を阻止して、NF- $\kappa$ B(p65)の核内移行を阻害することによるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is proposed that *Trichinella* infection or *Trichinella*-derived molecules (Tp53) modulate host's immunity.

In this study, we investigated the effect of *Trichinella* infection or Tp53 on immediate hypersensitivity in mice sensitized with Japanese cedar pollen. As a result, trichinella infection or Tp53 administration attenuated inflammatory reactions in the lungs, and production of specific IgE, IgG2a, IgG2b antibody decreased. In addition, production of IL-4 and IL-17 in infected mouse spleen cells or splenocytes treated with Tp53 was suppressed. And our observation showed that the Tp53 suppressed NF- $\kappa$ B signal pathway of macrophage, as indicated by the results of inhibition of LPS stimulation-induced NF- $\kappa$ B p65 nuclear translocation, phosphorylation of NF- $\kappa$ B signal proteins (IKK, p65 and I $\kappa$ B) and degradation of I $\kappa$ B. The results suggest that the Tp53 protein may modulate host immune response by inhibiting macrophage activation via specifically affecting NF- $\kappa$ B signal pathway.

研究分野：獣医学 寄生虫学

キーワード：旋毛虫 即時型アレルギー 免疫抑制 分泌タンパク質 サイトカイン 組換えタンパク質 スギ花粉

## 1. 研究開始当初の背景

寄生虫感染では宿主の免疫能に大きな影響をおよぼすことが報告されている。我々は旋毛虫感染が宿主の自己免疫性疾患の発症を強力に抑制することが明らかにしてきた。また、我々は、国内外研究者に先駆け、旋毛虫から種々の分泌タンパク質を同定してその詳細を報告してきたが、それらの中で旋毛虫が分泌する分子量 53kDa のタンパク質 (Tp53) は他に相同性のあるタンパク質の報告がなく、その発現は主にナース細胞完成後の筋肉幼虫に限られており、旋毛虫の宿主体内での寄生の維持に重要な役割を担っていることを見出した。また、Tp53 はマクロファージに作用して炎症の活性化をおさえ、IL-6 と IL-17 の増幅ループを制御して免疫抑制に参与していることを明らかにした。一方、Tp53 は脾細胞の IL-4 産生をも抑制するという現象が認められた。IL-4 および IgE が関与する即時型アレルギーの現在の日本での増加は、衛生環境の向上による幼少時の感染症の減少が、原因ではないかとする説がある。以上の結果、推測を基にして、今回は旋毛虫感染および Tp53 の即時型アレルギー反応に対する免疫抑制機構を明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

我々は今までに、旋毛虫感染が即時型アレルギー反応を抑制することを見出した。また、最近、我々は旋毛虫の成虫のみの感染では Th2 型の免疫反応が主体となる一方、筋肉幼虫のみの寄生では Th2 型の免疫反応は抑制されることを報告した。Tp53 は主に筋肉幼虫で発現しており、Tp53 がこの現象に大きく関与している可能性がある。今回の研究では、旋毛虫をマウスに感染後、または Tp53 を直接マウスに接種後に抗原 (スギ花粉等) を感作し、即時型アレルギーの発症が抑制されるかどうかを観察した。同時に処置マウスの血清中の各クラスの免疫グロブリン量、脾細胞またはマクロファージのサイトカイン産生量の解析を行った。また、in vitro 実験系として、正常脾細胞に Tp53 を投与した場合の Th2 関連サイトカインの動態観察、培養細胞を用いて NF-κB などの転写因子の転写活性に与える影響についても検討した。以上の実験から、旋毛虫感染、Tp53 は即時型アレルギー反応を抑制するのか、またその機構はどのようなものかを明らかにした。

## 3. 研究の方法

(1) 組換え 53kDa タンパク質 (Tp53) の作製

大腸菌における組換え Tp53 の作製は、旋毛虫 (*T. pseudospiralis*) の Tp53 をコードする cDNA を pCold-GST 発現ベクターに組み込み発現を行った。また、小麦胚芽無細胞系での Tp53 の組換えタンパク質の作成は pEU-E01-MCS ベクターに Tp53cDNA を組込

み、WEPRO7240G 小麦胚芽発現キットを用いて行った。組換え Tp53 はアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、エンドトキシン除去カラムにて高純度に精製した。

(2) 旋毛虫感染における卵白アルブミン (OVA) によるアレルギー反応の抑制

マウスに旋毛虫 (*T. pseudospiralis*) を感染させ、その後に OVA とアラム (アジュバント) を混合した抗原溶液で感作した。感作 2 週間後、OVA の追加感作を行い、OVA 感作群で能動型皮膚アナフィラキシー反応 (ACA 反応) の測定を行った。すなわち、OVA 抗原溶液を耳組織に皮下注射し、後エバンスブルーを尾の静脈に注射した。30 分後、両耳を切除し、耳組織に浸潤したエバンスブルーの定量を行った。また、旋毛虫感染マウス、OVA 感作マウスにおける各免疫グロブリン量、マウス脾細胞を OVA 等で刺激した場合の産生サイトカイン量の定量を行った。

(3) 旋毛虫感染または旋毛虫分泌タンパク質 (Tp53) 投与におけるスギ花粉アレルギー反応の抑制

マウスにスギ花粉粗抗原を前もって感作し、後に旋毛虫 (*T. pseudospiralis*) を感染させることによるアレルギー反応の抑制について検討した。すなわち、スギ花粉粗抗原をマウスに腹腔内注射して全身感作した後、旋毛虫を感染または大腸菌組換え Tp53 を腹腔内投与し、その 2 週間後に鼻腔内にスギ花粉抗原を投与し感作した。スギ花粉を最初に感作した 5 週間後に、マウスの肺組織の組織学的観察、肺の炎症反応マーカーとして MPO 活性の測定、好酸球数の測定、および各免疫グロブリン量、マウス脾細胞の各抗原刺激に対する産生サイトカイン量の定量を行った。

(4) 旋毛虫分泌タンパク質 (Tp53) の NF-κB シグナル経路に対する影響の解析

NF-κB の結合配列を挿入したルシフェラーゼアッセイ用プラスミドベクターをマウスマクロファージに導入し、小麦胚芽組換え Tp53 を添加し、各 TLR リガンドで刺激して、ルシフェラーゼ活性を測定した。その後、Tp53 の NF-κB シグナル経路の各分子 (IKK, IκBa, NF-κB p65) のリン酸化に対する影響の解析を行った。すなわち、マウスマクロファージを用い、Tp53 を投与し LPS で刺激を行い、その後、ウエスタンブロットにより Tp53 の IKK, IκBa, NF-κB p65 のリン酸化に与える影響を解析した。また、免疫染色により NF-κB の核内移行について検討した。

## 4. 研究成果

(1) 旋毛虫感染における卵白アルブミン (OVA) によるアレルギー反応の抑制

旋毛虫感染によりマウスの能動型皮膚アナフィラキシー反応 (ACA 反応) は減弱した (図 1)。

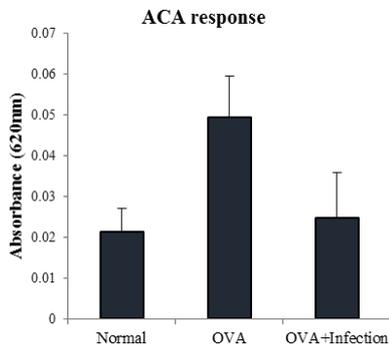


図 1. 旋毛虫感染による皮膚アレルギー反応の抑制

旋毛虫感染により OVA 特異的 IgE 抗体の産生が抑制された(図 2), また、特異的 IgG2a および IgG2b の反応も抑制された(図 3, 4)

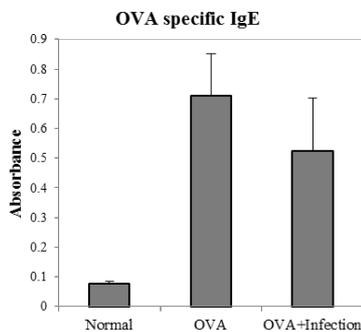


図 2. 旋毛虫感染による OVA 特異的 IgE 抗体産生の抑制

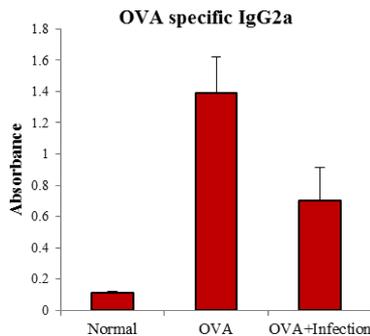


図 3. 旋毛虫感染による OVA 特異的 IgG2a 抗体産生の抑制

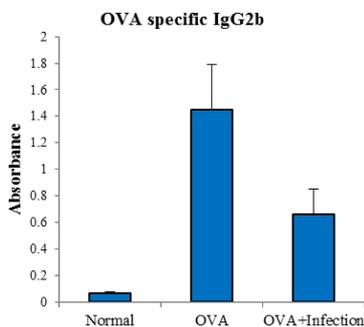


図 4. 旋毛虫感染による OVA 特異的 IgG2b 抗体産生の抑制

旋毛虫感染、または旋毛虫を感染させ OVA 感作したマウス脾細胞を採取し、OVA または旋毛虫 ES タンパク質で刺激を行った。その結果 IFN- $\gamma$  (図 5) および IL-17 (図 6) は旋毛虫に感染させて OVA 感作したマウス脾細胞では旋毛虫未感染のマウス脾細胞に対し、有意に産生量が低下した。

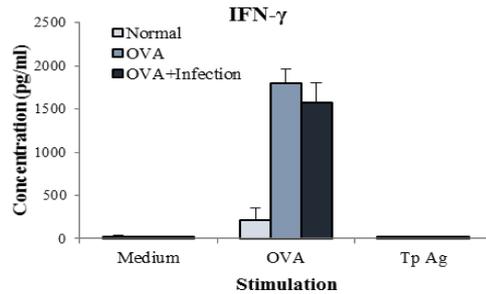


図 5 旋毛虫感染によるマウス脾細胞の IFN- $\gamma$  産生の抑制

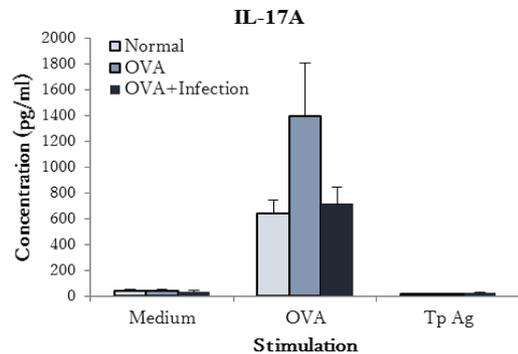


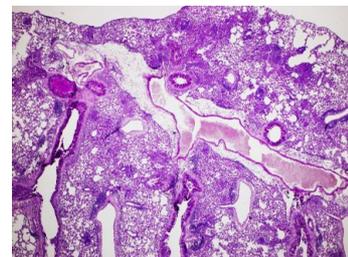
図 6 旋毛虫感染によるマウス脾細胞の IL-17 産生の抑制

(2) 旋毛虫感染または旋毛虫分泌タンパク質 (Tp53) におけるスギ花粉アレルギー反応の抑制

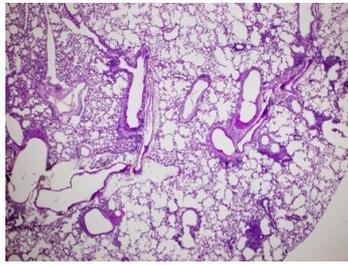
マウスにスギ花粉粗抗原を前もって感作し、後に旋毛虫を感染させることによるアレルギー反応の抑制について検討した。

最初に、マウスの肺組織の組織学的観察を行った。その結果、スギ花粉感作マウスの肺組織にみられる炎症細胞の浸潤、杯細胞の増生は旋毛虫感染または Tp53 投与マウスでは見られなかった(図 7)。

スギ花粉感作のマウスの肺組織



スギ花粉感作後  
旋毛虫感染の  
マウス肺組織



スギ花粉感作後  
Tp53 投与の  
マウス肺組織

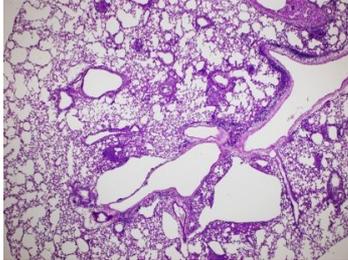


図 7 旋毛虫感染または Tp53 投与におけるスギ花粉症発症の抑制(肺組織のPAS染色)

また、肺組織中のMPO(ミエロペルオキシダーゼ)活性は旋毛虫感染または Tp53 投与マウスにおいて減弱が認められた(図8)。

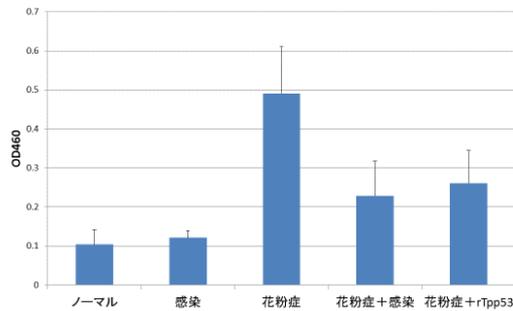


図 8 旋毛虫感染または Tp53 投与における肺 MPO 活性の抑制

また、血液中の好酸球数は旋毛虫感染または Tp53 投与したマウスでは減少した(図9)。

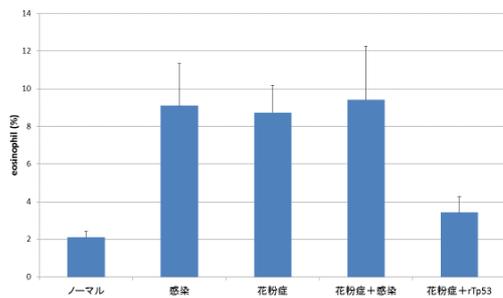


図 9 旋毛虫感染または Tp53 投与における血中好酸球数の減少

旋毛虫感染または Tp53 投与によるスギ花粉の主要抗原である CryJ1 に特異的な各免疫グロブリン量の変化を検討した(図10)。その結果、特異的な IgE、IgG2a、IgG2b の産生量は旋毛虫感染または Tp53 投与によって低下した。

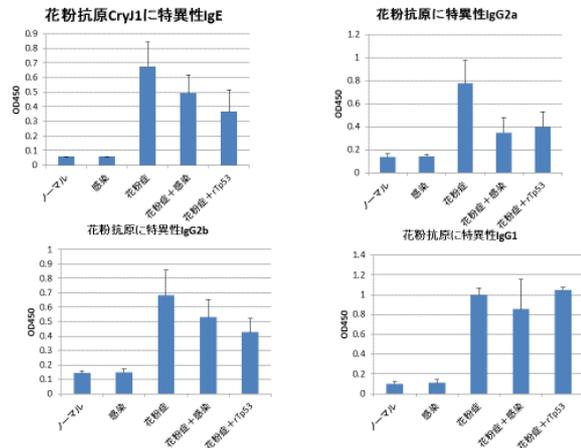


図 10 旋毛虫感染または Tp53 投与による各免疫グロブリンの変化

旋毛虫感染または Tp53 投与マウス脾細胞のサイトカイン産生量を検討した(図11)。脾細胞はスギ花粉粗抗原、CryJ1 または CryJ2 で刺激を行った。その結果、IL-4、IL-17 の脾細胞からの産生は抑制された。

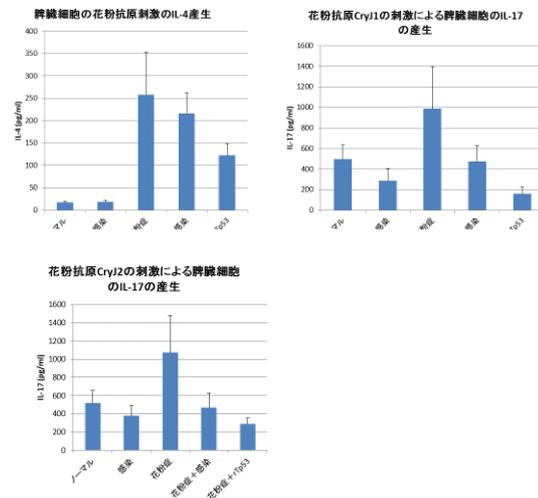


図 11 旋毛虫感染または Tp53 投与による脾細胞のサイトカイン量の抑制

(3) 旋毛虫分泌タンパク質(Tp53)のNF-κBシグナル経路に対する影響の解析

NF-κB の結合配列を挿入したルシフェラーゼアッセイ用ベクターをマウスマクロファージに導入して Tp53 を添加し、各 TLR リガンドで刺激して、ルシフェラーゼ活性を測定した(図12)。その結果、TLR1、2、および4の各リガンド刺激に対する応答に抑制がみられた。

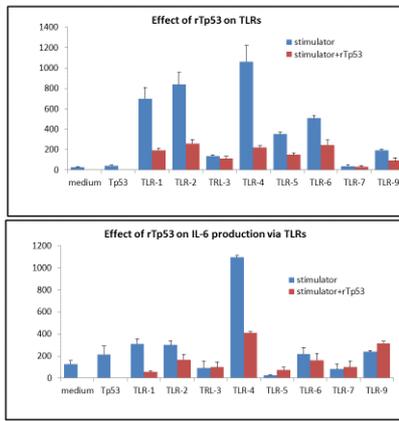


図 12 Tp53 投与マクロファージの各 TLR リガンド刺激における反応

上記の実験と同様に、ルシフェラーゼベクターをマウスマクロファージに導入して Tp53 を添加、LPS で刺激して、ルシフェラーゼ活性を測定した (図 13)。その結果、Tp53 投与により容量依存的に活性は抑制された。

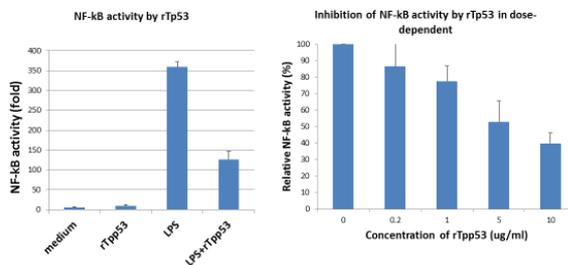


図 13 Tp53 投与マクロファージの NF-κB 活性

NF-κB 活性の抑制機構の解析を目的に NF-κB シグナル経路の各段階における反応を検討した。まず、シグナル経路の各分子のリン酸化に対する Tp53 の影響の解析を行った (図 14)。その結果、Tp53 は LPS 刺激による IKK、IκBα、p65 のリン酸化を抑制した。

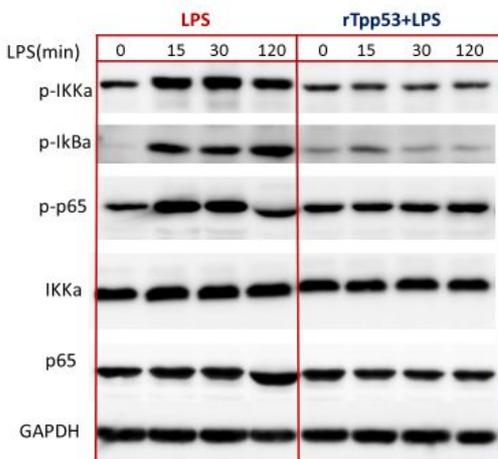


図 14 Tp53 による NF-κB シグナル経路の各分子のリン酸化の抑制

また、リン酸化が抑制された IκBα は Tp53 投与により LPS 刺激による分解も抑制された (図 15)。

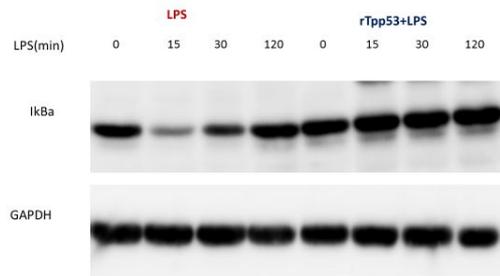


図 15 Tp53 による IκBα 分解の抑制

培養マクロファージを用い、免疫染色を行って NF-κB(p65)の核内移行を検討した (図 16)。その結果、Tp53 はマクロファージの LPS 刺激による、NF-κB(p65)の核内移行を阻害した。

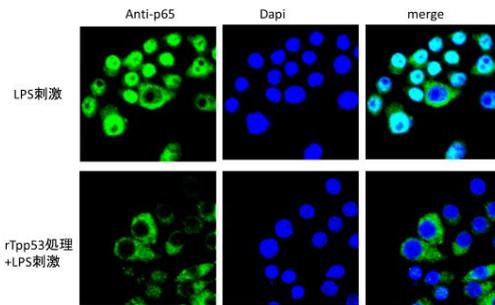


図 16 Tp53 による NF-κB(p65)核内移行の阻害

以上のように Tp53 は NF-κB 活性を抑制するが、それは NF-κB シグナル経路において、IKK のリン酸化を抑制して、IκBα のリン酸化および分解を阻止して、NF-κB(p65)の核内移行を阻害することによるものと考えられた。

また、Tp53 は MAP キナーゼシグナル経路、および Type I IFN シグナル経路には影響は認められなかった (データ未提示)。

## 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 8 件)

1. Cvetkovic J, Sofronic-Milosavljevic Lj, Ilic N1, Gnjatovic M, Nagano I, Gruden-Movsesijan A. Immunomodulatory potential of particular *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components. Int J Parasitol, 46, 833-42, 2016. 査読有

2. Furukawa T, Ishifune C, Tsukumo S, Hozumi K, Maekawa Y, Matsui N, Kaji R, Yasutomo K. Transmission of survival signals through Delta-like 1 on activated CD4<sup>+</sup> T cells. Sci Rep, 33692, 2016. 査読有

3. Kabir A, Honda R P, Kamatari Y O, Endo S,

Fukuoka M, Kuwata K, Effects of ligand binding on the stability of aldo-keto reductases: Implications for stabilizer or destabilizer chaperones. *Protein Sci*, 2132-41, 2016. 査読有

4. Asano K, Wu Z, Srinontong P, Ikeda T, Nagano I, Morita H, Maekawa Y. Non-encapsulated *Trichinella pseudospiralis* infection impairs follicular helper T cell differentiation with subclass-selective decreases in antibody responses. *Infect Immun*, 84, 3550-6, 2016. 査読有

5. Wu Z, Nagano I, Takahashi Y, Maekawa Y. Practical methods for collecting *Trichinella* parasites and their excretory-secretory products. *Parasitol Int*, 16, 30259-8, 2016. 査読有

6. Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Boonjaraspinyo S, Srinontong P, Ratasuwan P, Narong K, Nielsen PS, Maekawa Y. Significance of S100P as a biomarker in diagnosis, prognosis and therapy of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Int J Cancer*, 138, 396-408, 2016. 査読有

7. Wu Z, Boonmars T, Nagano I, Loilome W, Yongvanit P, Khuntikeo N, Nielsen PS, Paorjokul C, Takahashi Y, Maekawa Y. Milk fat globule epidermal growth factor 8 serves a novel biomarker of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. *Tumour Biol*, 35, 1985-95, 2014. 査読有

8. Wu Z, Boonmars T. Molecular mechanism of tumorigenesis and biomarkers of opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. Plenary lecture, RGJ-PhD Congress XV, 2014. 査読無

9. Okumura Y, Yamauchi A, Nagano I, Itoh M, Hagiwara K, Takahashi K, Uezato H, Maeda M, Seishima M. A case of mucocutaneous leishmaniasis diagnosed by serology. *J Dermatol*, 41, 739-42, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Wu Z, Nagano I, Srinontong P, Maekawa Y. *Trichinella pseudospiralis*-derived 53kDa excretory-secretory protein inhibits NF-κB signal pathway of macrophage. The 14th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses, 2016 年 11 月 26 日、相模原市

2. 呉 志良、長野 功、Piyarat Srinontong、前川洋一、*Trichinella pseudospiralis* 由来 53kDa 分泌蛋白 Tpp53 はマクロファージの NF-κB シグナル経路を抑制する、第 72 回日本寄生虫学会西日本支部会、2016 年 10 月 15 日、岐阜市

3. 住吉孝允、高橋翔、呉 志良、Srinontong Piyarat、長野 功、旋毛虫感染によるスギ花粉動物モデルのアレルギー反応の抑制、第 72 回日本寄生虫学会西日本支部会、2016 年 10 月 15 日、岐阜市

4. Cvetkovic J, Sofronic-Milosavljevic L, Ilic N, Gnjatovic M, Nagano I, Gruden-Movsesijan A. 旋毛虫分泌タンパク質による免疫調整機構 (樹状細胞による解析) 第 159 回日本獣医学学会学術集会、2016 年 9 月 8 日、藤沢市

5. 呉 志良、長野 功、Srinontong Piyarat、浅野一信、前川洋一、*Trichinella pseudospiralis* 由来 53kDa 分泌蛋白 Tpp53 はマクロファージの NF-κB シグナル経路を抑制する、第 85 回日本寄生虫学会大会、2016 年 3 月 20 日、宮崎市

6. 浅野一信、旋毛虫感染マウスにおける濾胞性ヘルパー T 細胞分化障害、第 84 回日本寄生虫学会大会、2015 年 3 月 21 日、東京都

〔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 (無)

6. 研究組織

(1)研究代表者

長野 功 (NAGANO ISAO)

岐阜大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40283296

(2)研究分担者

呉 志良 (WU ZHILIANG)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90313874

鎌足雄司 (YUJI KAMATARI)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：70342772

前川洋一 (YOUICHI MAEKAWA)

岐阜大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10294670