

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担課題：日本住血吸虫症の病態発現分子解析

分担研究者 太田伸生

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科国際環境寄生虫病学分野）

研究協力者 熊谷 貴、関 丈典（同上）

### 研究要旨

日本住血吸虫(Sj)感染宿主の病理発現機序は未だ未解明の点が多いため、本年度はマウスの系を用いて肉芽腫性炎症誘導に関わるイニシエーション機構と調節について検討した。マウスマクロファージを *in vitro* で虫卵抗原(SEA)により刺激すると IL-13 の発現が特異的に上昇し、その刺激を受けたマクロファージがさらに IL-6 などの炎症性サイトカインや IL-10 などの抑制性サイトカインの mRNA 発現を誘導する事が明らかになった。この場合の IL-13 の関与を確認するために、IL-13 ノックアウトマウスを用いて同様の観察を試みたところ、ノックアウトマウスでは IL-6 の発現上昇が低下しており、肉芽腫性炎症発現に必要な初期応答として、SEA によるマクロファージからの IL-13 産生が重要な調節を担う事が示唆された。日本住血吸虫感染宿主の肝臓病変は、炎症と線維化の異なったステップからなると考えてよいが、今回の観察から、炎症のトリガーや線維化に虫卵抗原刺激によるマクロファージの活性化が関与しているということが示唆され、新規の治療・予防戦略への情報となるものと考えられた

### A. 研究目的

日本住血吸虫(Sj) は宿主の門脈や腸間膜静脈に寄生し、そこで産卵された虫卵は肝臓に蓄積し線維化を伴う虫卵性肉芽腫性炎症を誘導する。この Sj 虫卵抗原は Th2 サイトカインである IL-4 や IL-13 の産生を誘導し、この Th2 サイトカインが Sj に感染したヒトの肝臓で見られる線維化に関与していると考えられている。これまで分担研究者らは IL-4<sup>-/-</sup>IL-13<sup>-/-</sup>(DKO) マウスを用いた Sj 感染実験により、感染 6 週後において IL-4/IL-13 が過剰な炎症性サイトカインの誘導や過剰な好中球浸潤を伴う肉芽腫性炎症の悪化を抑制している事を

明らかにしてきた。また、感染 8 週後において線維化が見られなかった事を確認した。マンソン住血吸虫感染マウスにおいても IL-13 が線維化を誘導する事より、日本住血吸虫症においても Th2 応答、特に IL-13 が虫卵性肉芽腫炎症でみられる肉芽腫性炎症を誘導する事が示唆されている。

しかしながら、IL-13 は線維化に関与していると考えられるものの、その産生細胞や線維化のメカニズムは不明である。少なくとも、虫卵抗原が肉芽腫性炎症でみられる線維化誘導の抗原であることは間違いないので、虫卵抗原が宿主免疫担当細胞と最初に遭遇する場として、宿主のマクロフ

マクロファージについて焦点を絞ることとした。

本年度は、日本住血吸虫症の病態形成における宿主免疫担当細胞の初期応答として、マクロファージが担う機能について解析することとした。

## B. 研究方法

1. マウスマクロファージの SEA による in vitro 刺激: 6~10 週齢の BALB/c マウス(雄)の骨髄細胞を回収し、M-CSF(10  $\mu$ g/ml)を含む RPMI(10%FCS)中で培養する事により、骨髄由来マクロファージを作製した。

$5 \times 10^5$  cells/ml のマクロファージは RPMI 1640(10%FCS)中にて 25 $\mu$ g/ml の日本住血吸虫 SEA (SjSEA)と 24 時間、37°C で CO<sub>2</sub> インキュベータにて培養し、マクロファージから回収した RNA から各種サイトカイン遺伝子発現を測定した。

2. 日本住血吸虫虫卵抗原 (SEA): 山梨株の日本住血吸虫感染マウスの肝臓から回収した虫卵から可溶性粗抗原を抽出して用いた。

3. サイトカインアッセイ: SEA 刺激したマクロファージより RNA 回収して、サイトカインの mRNA 発現量を (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13) をリアルタイム PCR で測定した。

4. IL-13 ノックアウトマウス: IL-13 ノックアウト(KO)マウスは星野友昭博士(久留米大学)より供与されたものを用いた。上記と同様の試験に用いて、ワイルドタイプの結果と比較した。

倫理面への配慮: 本研究は東京医科歯科大学の動物実験委員会による承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### 1. In vitro での SEA 刺激によるマウスマクロファージのサイトカイン産生

マウスのマクロファージは in vitro の SEA 刺激により、活性化され、いくつかのサイトカイン遺伝子発現上昇が確認された。線維化に關与すると考えられる IL-13 mRNA 発現増加が見られた。一方、IL-4 mRNA の発現上昇は見られなかった (図 1)。

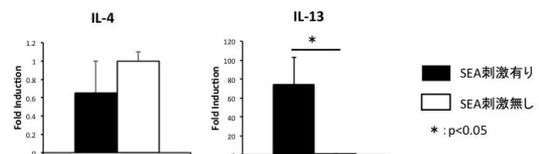


図1 SEA刺激マクロファージにおけるTh2サイトカインmRNA発現

### 2. IL-13 産生マクロファージによるサイトカインmRNA 発現調整

次に活性化マクロファージの炎症調節機能に関する検討のために、抑制性サイトカインおよび炎症性サイトカイン遺伝子の発現を検討した。

抑制性サイトカインである IL-10 は、日本住血吸虫症患者において線維化抑制に關与していると考えられている。SEA 刺激により WT 由来マクロファージにおける IL-10 の mRNA 発現量は増加したが、SEA 刺激を受けた IL-13KO マウス由来マクロファージとの間で有意な差はみられなかった。

一方で炎症性サイトカインである IL-6 は重度の線維化を呈する日本住血吸虫症患者において高い値を示している事が知られている。

SEA 刺激 WT 由来マクロファージでは、

無刺激のものとは比べて IL-6 の mRNA 発現量は有意に増加していた。さらに SEA 刺激 WT と IL-13 由来マクロファージにおける IL-6 の mRNA 発現量を比較したところ IL-13KO マウスでは IL-6 の mRNA 発現量が有意に低下していた(図 2)。

この結果より、マクロファージは SEA 刺激により IL-13 産生が誘導される事が示唆され、IL-13 がマクロファージを刺激する事により IL-6 の産生を誘導し、日本住血吸虫症における線維化に関与している事が示唆された。

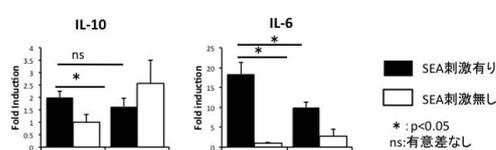


図2 SEA刺激マクロファージ由来IL-13の各種サイトカインmRNA発現に及ぼす影響

#### D. 考察と結論

これまで、分担研究者らは IL-4/IL-13 が日本住血吸虫感染マウスにおける肉芽腫性炎症の悪化を抑制する事を明らかにしてきた。しかしながら、今回は日本住血吸虫症においては、IL-13 が虫卵抗原刺激マクロファージからの炎症性サイトカイン産生増強をもたらすことを示唆する結果が観察された。この場合は IL-4 の関与は認められなかったので、IL-13 自身が、日本住血吸虫感染宿主においては、虫卵肉芽腫の炎症反応を抑制する一方で炎症や線維化を促進する一見相反する現象に関与する事が示唆されたことになる。

IL-4 と IL-13 の機能は相当部分でオーバーラップするが、肉芽腫性炎症から線維化に進展する日本住血吸虫症においては

IL-13 の機能がより重要である可能性が考えられ、今回のデータからは、SEA 刺激によるマクロファージからの IL-13 発現上昇が肉芽腫炎症の促進に働くことが考えられた一方で、IL-13 がさらに誘導されてくる Th17 細胞に対する抑制効果を担う事から、高度に過ぎる炎症を抑え、線維化の動向を調節することになっていることが推定された。

今回の研究は in vitro での事象観察に止まったため、実際に in vivo で起こっている現象を観察する必要がある。そのデータを得た上で、日本住血吸虫感染における虫卵肉芽腫反応のイニシエーションフェーズにおける宿主免疫細胞の関与について明らかに出来るものと期待している。

今回の結果をもとに、日本住血吸虫感染時の病態発現に影響する因子の特定と解明が進み、将来の治療的応用にむけて研究が進むことが期待される。

#### (ア) 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

原著論文

- (1) Okumura-Noji K, Miura Y, Lu R, Asai K, Ohta N, Brindley PJ, Yokoyama S. CD36-related protein in *Schistosoma japonicum*: candidate mediator of selective cholesteryl ester uptake from high-density lipoprotein for egg maturation. FSAEB J, 2012 Dec 13 (Epub ahead of print)
- (2) ElMalky M, Lu SH, El-Beshbish SN, Saundy NS, Ohta N. Effect of mirazid in

Schistosoma japonicum-infected mice:  
parasitological and pathological  
assessment. Parasitol Res, 112:373-7,  
2013.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし