

所属機関名 山梨大学大学院総合研究部免疫学講座

職名・氏名 准教授・中村勇規

1 研究テーマ

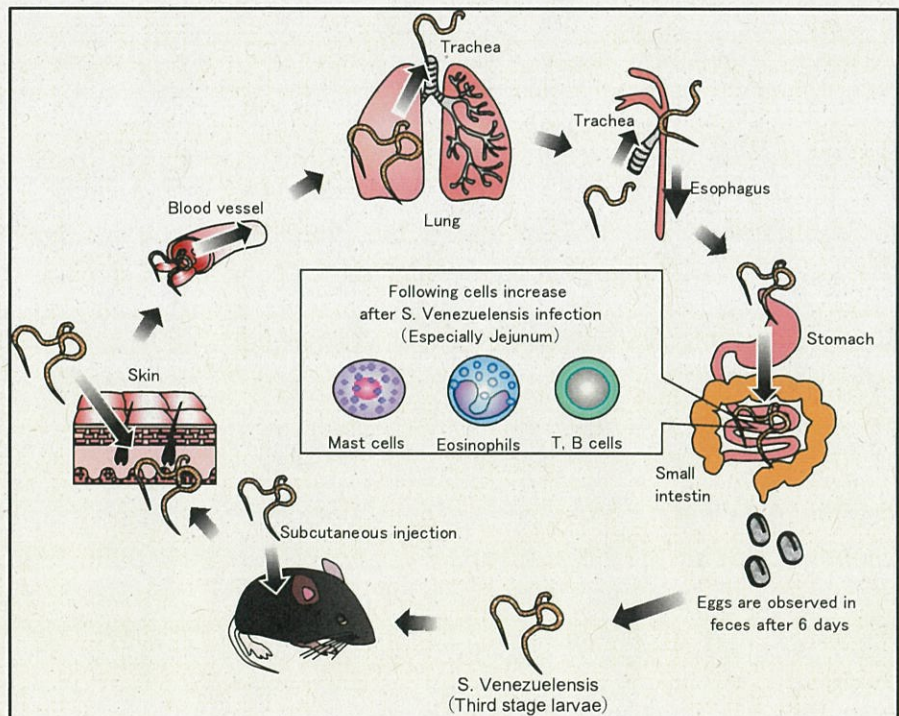
糞線虫感染の防御免疫における概日時計の役割

2 研究の背景・目的

糞線虫(*Strongyloides stercoralis*: Sv)は消化管に寄生する蠕虫(線虫)の1つで約3000万から1億人のヒトが世界中(主に熱帯・亜熱帯地方)で感染している(Lancet 367:1521, 2006)。日本では沖縄・奄美地方が流行地域で、現在でも60歳以上の約2万5千人に糞線虫に感染していると推測されている。

糞線虫は一旦体内に入ると数十年にわたり寄生し治療を行わない限り治癒はしない。土壤中の幼虫が皮下から侵入し、感染から2~3週間後に腸管(小腸)に到達し成虫となり排卵する。寄生数が多い場合、腹痛や下痢、食思不振、嘔気、嘔吐などをきたすが無症状のことも多い。検査では、

血中 IgE 抗体及び好酸球の上昇を認める。免疫抑制剤の使用や抗がん剤などの治療によって免疫不全状態となっている患者は、重症化しやすく、全身に糞線虫が移行し、肺炎や髄膜炎などを起こし死に至る場合もある。日本でも毎年5名程度の死亡例が報告されている。2015年にノーベル賞を受賞された大村智博士の開発したイベルメクチンが特効薬であり、軽症から中等症例はほぼ副作用なく完治するが重症例には無効なこともある。よって糞線虫に対する宿主免疫反応をより良く理解することは、重症例の治療や無症状の潜伏感染患者における排虫を促す新しい治療法の開発に不可欠である。



(補足事項1) マウス糞線虫感染モデルについて

げっ歯類に感染する糞線虫であるSvはヒトの*S. stercoralis*と同じ生活環を持ち、ヒトの糞線虫感染モデルとして汎用されている(Adv. Parasitol 38:251, 1996)。Svの初期感染防御にはIgEおよびマスト細胞が主たる役割をしている(J Exp Med 202:607, 2005)。野生型マウスにSv第3期幼虫を経皮的に感染させると、Svは心臓を経由して肺に達しさらに気管をさかのぼり嚥下され、食道・胃を経由して小腸に到達する。通常、小腸粘膜でマスト細胞・好酸球数の増加し、虫卵排出が経皮感染後6日から認められ、約2週間後に消失する。

ヒト糞線虫感染マウスモデル（補足事項1参照）を使った研究から糞線虫感染防御には宿主免疫系の構成要素であるIgE抗体とマスト細胞が重要なことが明らかになっている（J Exp Med 202:607, 2005）。

生物の24時間周期性の生理活動を司る概日時計（時計遺伝子）（補足事項2参照）がIgE抗体刺激によるマスト細胞の活性化反応を強く制御していることを明らかにした（Nakamura et al. J Allergy Clin Immunol [JACI] 2011, 2014, 2016）。具体的には、概日時計の構成因子の1つである時計遺伝子ClockがIgE抗体受容体のプロモーター領域に結合しIgE抗体受容体の発現を時間依存的に調節する結果、アレルゲンに対するマスト細胞の活性化反応は休息期に強く活動期に弱くなる（Nakamura et al. JACI 2014）。このメカニズムは花粉症や喘息などのアレルギー疾患の症状が夜間に起こりやすい一因であると推測される。

糞線虫防御免疫反応にはIgE抗体及びマスト細胞が関

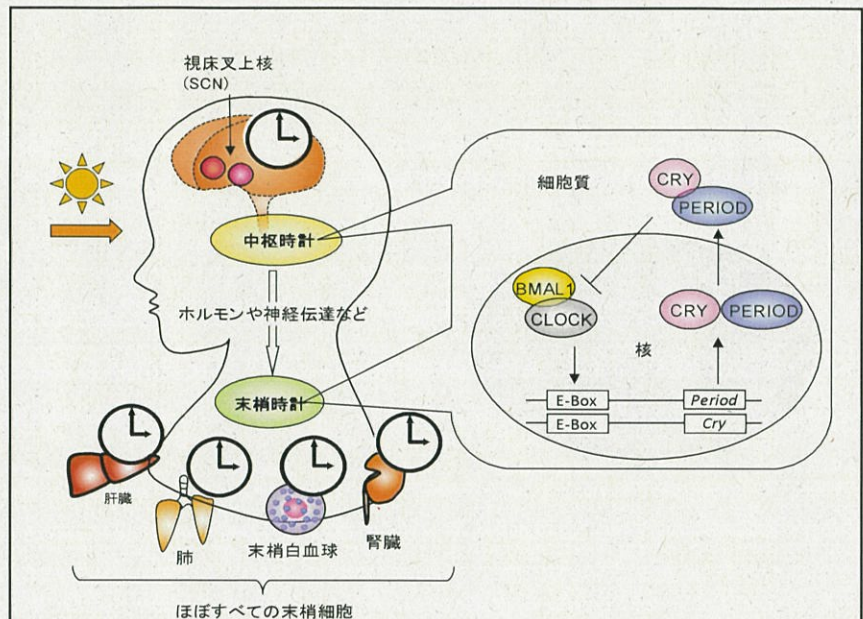
与しており、アレルギー反応と同様、概日時計（時計遺伝子）がそれらの活性を制御し糞線虫に対する宿主防御反応の効率（強さや質、持続時間など）に影響を与える可能性がある。しかしながら、糞線虫感染防御反応におけるIgE抗体及びマスト細胞の制御機構は不明である。

以上の背景から、本研究では、糞線虫感染防御免疫の制御に果たす概日時計（時計遺伝子）の役割を明らかにする。特に、マスト細胞の概日時計（時計遺伝子）が糞線虫感染防御反応の強さや免疫反応の質および持続時間などの制御に果たす役割に注目する。

3 研究の方法

①糞線虫感染防御における時計遺伝子が果たす役割の解明

野生型マウス、時計遺伝子Clock変異、Bmal1欠損マウスにStrongyloides Venezuelensis(Sv)第3期幼虫を経皮感染させたSv感染モデルを作成(Fig 1)し、感染後5日後から糞便中に虫卵が観



（補足事項2）「概日時計」について

生物の約24時間周期性（概日性）の生理活動リズム（睡眠覚醒、体温、ホルモン分泌など）を生み出す仕組みを概日時計と呼ぶ（Science 354:992, 2016）。概日時計は全身の細胞1つ1つに存在し（末梢時計）、そのシステムは階層性がある。中枢時計（視床下部の視交叉上核[SCN]に存在）が網膜からの光刺激により時間情報を得てホルモン分泌や神経伝達によってその時間情報を末梢細胞に伝達し全身の概日時計を制御する。概日時計の実体は主にClock, Bmal1, Period(Per), Cryptochrome(Cry)の4種類の時計遺伝子で作られる転写・翻訳レベルでのネガティブフィードバックループである。このループの約24時間の周期活動が時間情報となり個々の細胞・組織の生理活動に概日リズムが生み出される。近年、末梢時計を同調させる因子として光の他に食事が重要であることが明らかにされた（Cell 2015;161:84）。

察できなくなるまで毎日 10 時と 22 時にカウントした。Sv 感染前、感染後 7 日目の 10 時と 22 時に採血または小腸（空腸）を採取し、血中抗体（特に IgE）濃度を ELISA 法、小腸粘膜における炎症反応の強さを病理学的手法（HE 染色等）、フローサイトメトリー法、qPCR 法等を用いて解析した（Fig 1）。

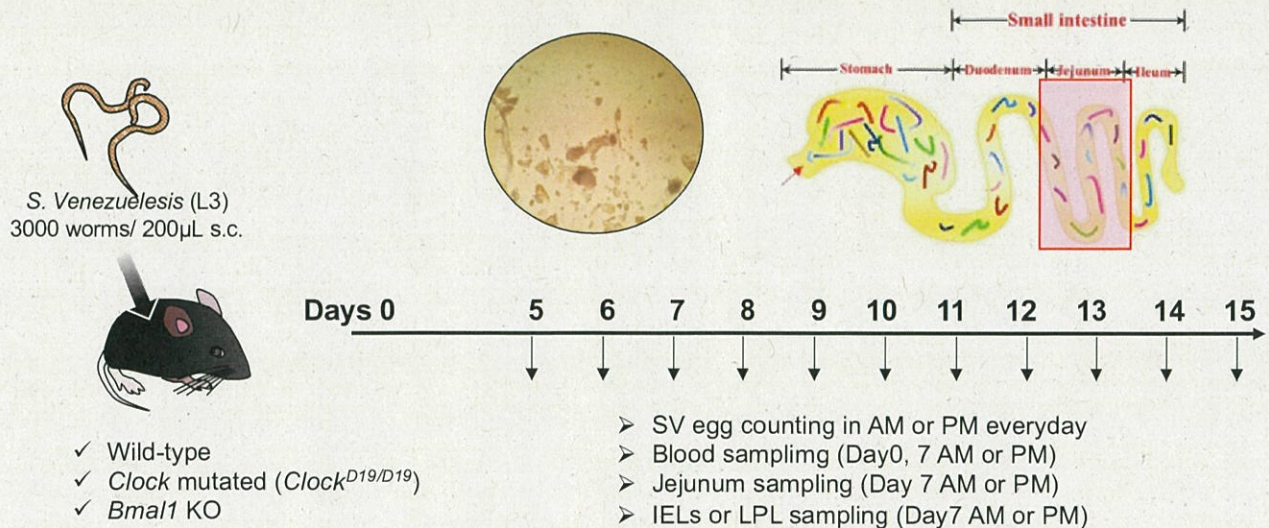
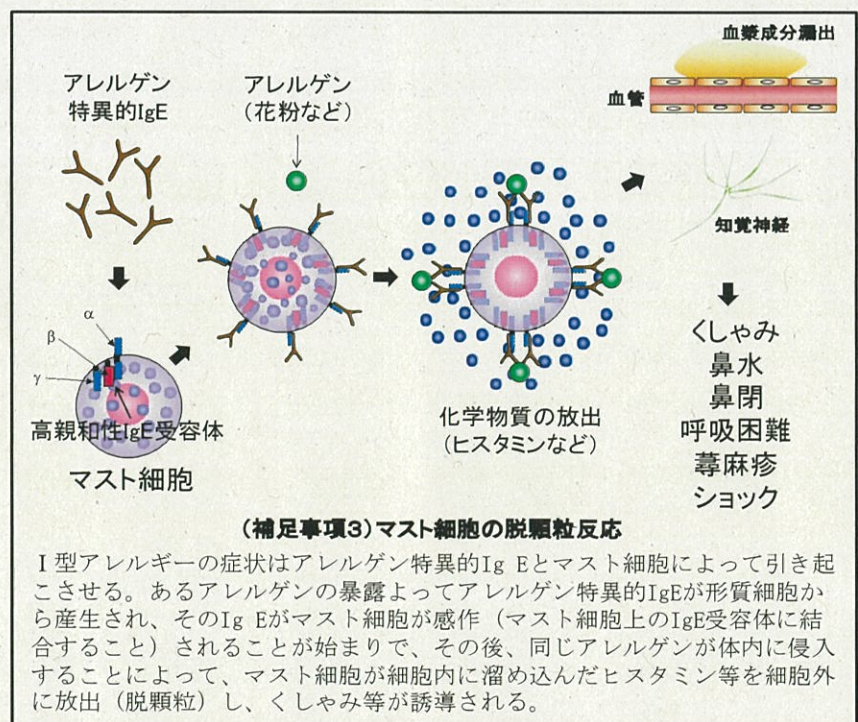


Fig 1. Sv感染モデルマウスを用いた病態解析法

② 糞線虫感染防御におけるマスト細胞の時計遺伝子が果たす役割の解明

野生型マウス、各時計遺伝子変異マウス骨髓細胞由来培養マスト細胞 (Bone-marrow derived culture mast cells: BMBCs) を Sv に感染したマウスから採取した血清 (抗 Sv 抗原 IgE 抗体を含む) を培養液中に添加し BMBCs を感作したのち、Sv 抽出物で刺激し、脱顆粒の強度を比較検討した (補足事項 3)。

さらに、野生型マウスを用いて Sv 感染モデルを作成し、感染後 7 日目に Sv 抽出物を用いて能動型皮膚アナフィラキシー反応 (Active cutaneous anaphylaxis: ACA) を 10 時 (AM) と 22 時 (PM) に誘導しその強さを比較した。



4 研究の成果

野生型マウス、時計遺伝子 *Clock* 変異および *Bmal1* 欠損マウスに *Sv* 第3期幼虫を経皮感染させ、感染後5日後から糞便中に虫卵が観察できなくなるまで毎日10時(AM)と22時(PM)にカウントした結果、野生型マウスでは10(AM)時よりも22時(PM)における糞便中虫卵数が有意に高く、この概日リズム性周期は時計遺伝子 *Clock* 変異 (Fig 2) および *Bmal1* 欠損マウス (Fig 3) では消失していた。さらに、*Clock* 変異マウスにおける感染後7日後の糞便中虫卵数が野生型マウスよりも高く、感染期間が延長すること (Fig 2)、*Bmal1* 欠損マウスでは糞便中虫卵数の減少と感染期間の短縮が観察できた (Fig 3)。

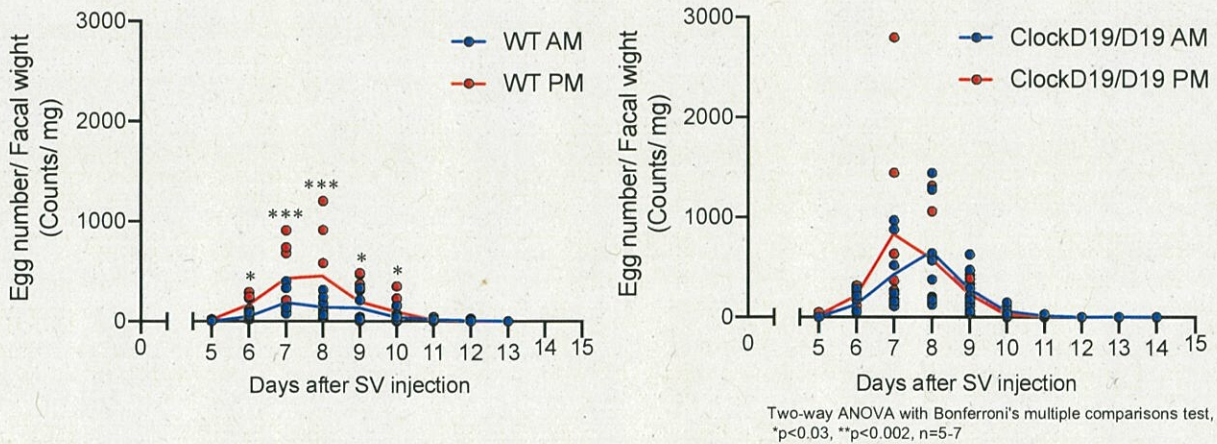


Fig 2. The *Sv* egg number shows a time of day dependent variations in the *Sv* infected wild-type mice (WT), but not *clock*-mutated mice (*Clock*^{D19/D19})

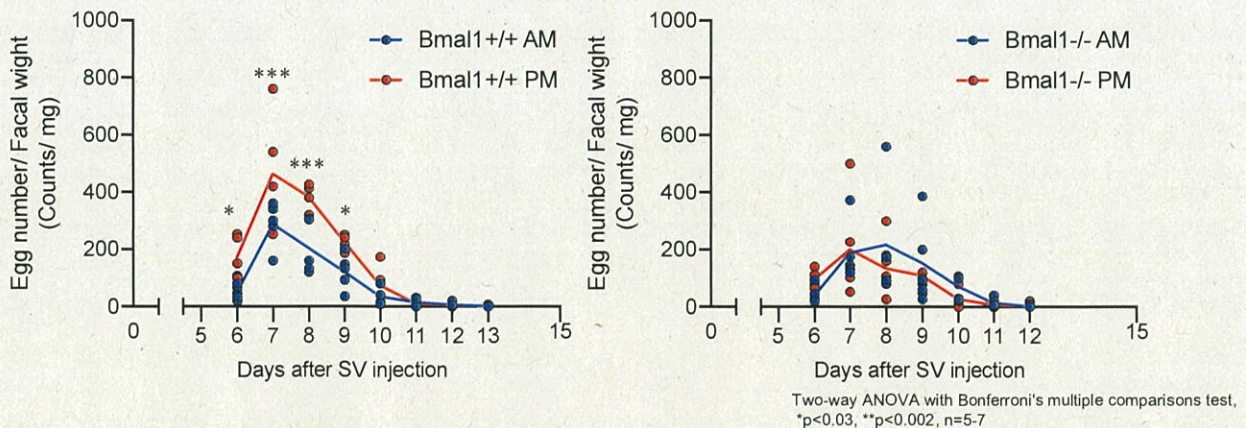


Fig 3. The *Sv* egg number shows a time of day dependent variations in the *Sv* infected wild-type mice (*Bmal1*^{+/+}), but not *Bmal1* KO mice (*Bmal1*^{-/-})

次に、*Sv* 感染前 (Day0) と *Sv* 感染後7日目の10時(AM)と22時(PM)に野生型マウスまたは *Clock* 変異マウスから小腸を回収し、病理学的手法とフローサイトメトリー法を用いて症状の比較を行い、野生型マウスにおける好酸球 (CD45.2⁺SiglecF⁺MHC II⁺ 細胞) 数が概日リズム性周期を示すことが明らかとなった。一方、*Clock* 変異マウスではこの概日リズム性周期が消失していた (Fig 4)。

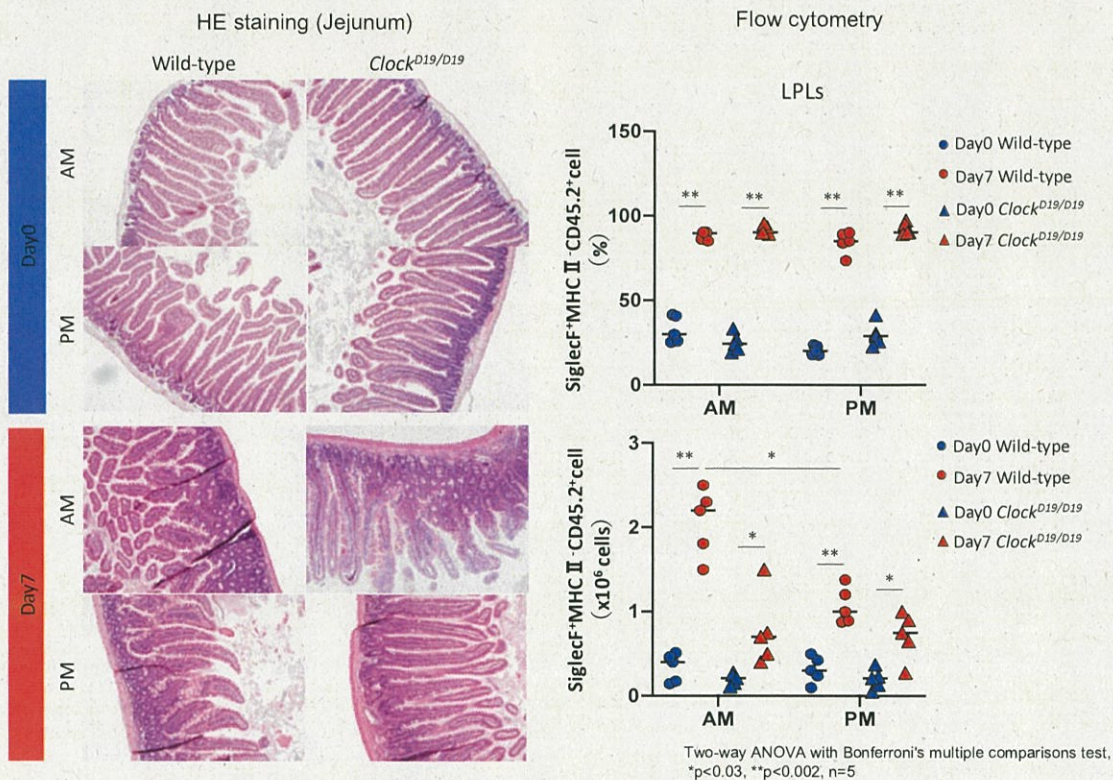


Fig 4. Jejunum eosinophils number shows a time of day dependent variations in the SV infected Wild type mice, but not *Clock*^{D19/D19} mice

加えて、野生型マウスと時計遺伝子 *Clock* 変異マウスから感染前 (Day0)、感染後 7、14 日の 10 時 (AM) と 22 時 (PM) に採血を行い、血中 IgE、IgG1、*Sv* 抗原特異的 IgE、*Sv* 抗原特異的 IgG1 濃度を測定した結果、野生型マウスでは 22 時 (PM) よりも 10 時 (AM) における血中 *Sv* 抗原特異的 IgE 濃度のみが有意に高く、概日リズム性周期を示した。一方、この概日リズム性周期は時計遺伝子 *Clock* 変異マウスでは消失していた。また、野生型マウスに比べ、*Clock* 変異マウスの血中 *Sv* 特異的 IgE 濃度が低値であることも明らかとなった (Fig 5)。

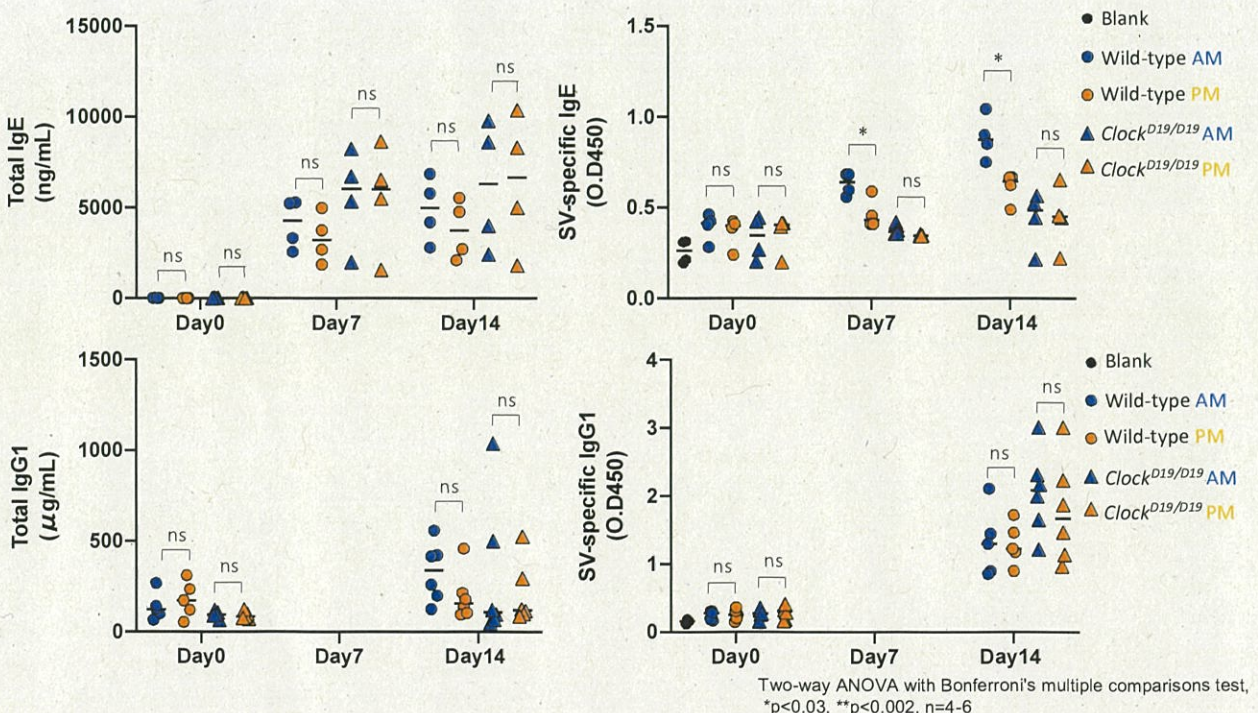


Fig 5. The amount of antibodies in the blood were increased 7 days after SV infection

Sv 特異的 IgE の周期性がマスト細胞活性化（脱顆粒）を制御しているか否か明らかにするために、野生型マウスおよび時計遺伝子 *Clock* 変異マウス由来 BMMCs を感染前 (*Sv*-血清) および *Sv* 感染 14 日後 (*Sv*+血清) の野生型マウスから採取した血清を用いて BMMCs を感作し、*Sv* 抽出物 (*Sv* 抗原) 刺激における脱顆粒反応の強度を比較検討した。その結果、10 時 (AM) に回収した *Sv*+血清で感作した BMMCs の脱顆粒反応が 22 時 (PM) に回収した *Sv*+血清で感作した BMMCs の脱顆粒反応よりも有意に高い概日リズム性周期を示すことが明らかとなった。一方、時計遺伝子 *Clock* 変異マウス由来 BMMCs ではこの概日リズム性周期が消失していた (Fig 6)。

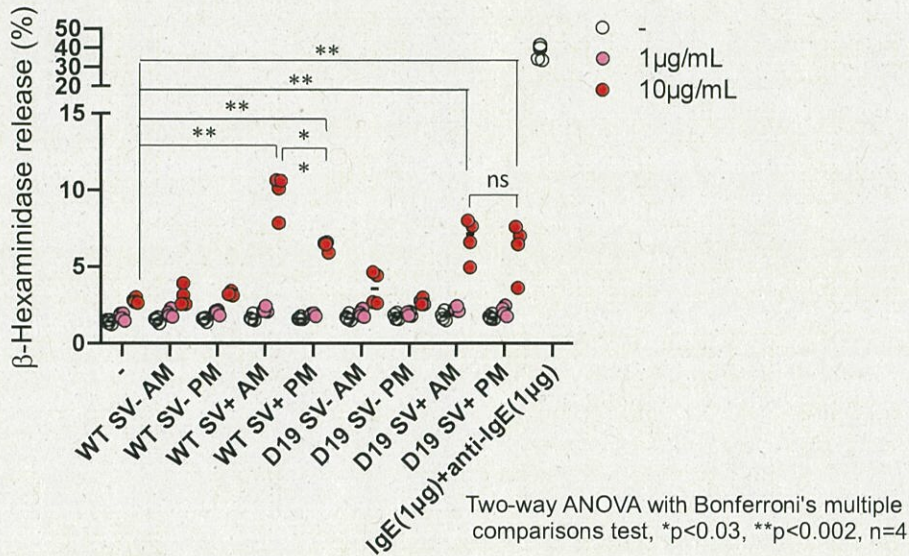


Fig 6. Degranulation test in the wild-type or clock-mutated(D19) BMMCs

さらに、上述の *in vitro* の結果が *in vivo* においても見られるか否かを、抗原感作後のマウスを用いて生体内のマスト細胞脱顆粒反応を評価できる能動型皮膚アナフィラキシー (Active cutaneous anaphylaxis: ACA) 反応を *Sv* 感染後 14 日目の 10 時 (AM) と 22 時 (PM) に *Sv* 抗原を皮下投与して誘導し比較検討した。その結果、血中 *Sv* 特異的 IgE 濃度が高値を示す 10 時 (AM) に *Sv* 抗原を皮下投与すると、マスト細胞の脱顆粒反応が 22 時 (PM) よりも有意に強く誘導された (Fig 7)。

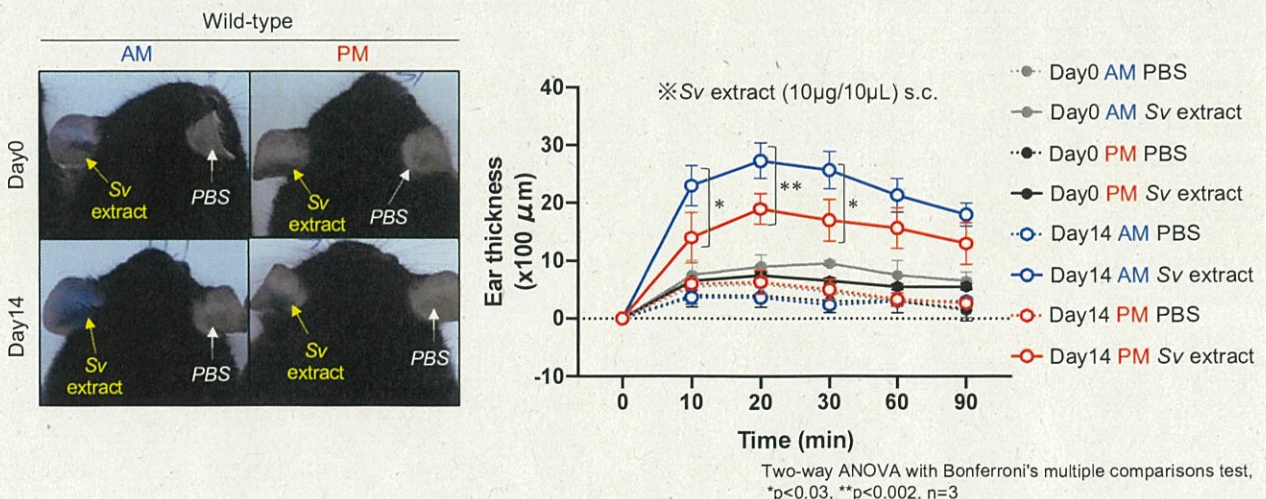


Fig 7. ACA in *Sv* infected wild-type mice

これらの結果から、糞線虫 *Sv* 感染モデルにおける防御機構に概日リズム性周期が存在し、マスト細胞と *Sv* 抗原特異的 IgE が関与していることが示唆された。

5 今後の展望

糞線虫 *Sv* 感染モデルにおける感染防御に概日リズム性周期が見られることが明らかとなり、その周期性が時計遺伝子 *Clock* 変異マウスおよび *Bmal1* 欠損では消失し、感染が延長・短縮することが明らかとなった。加えて、血中 *Sv* 特異的 IgE 濃度のみが概日リズム性周期を示すことが明らかとなった。さらに、その血清を用いた *in vitro* における BMBCs 脱顆粒反応、*in vivo* における *Sv* 感染マウスにおける *Sv* 抗原投与による ACA 反応の結果から、糞線虫感染防御反応で見られる概日リズム性周期に、概日リズム性抗原特異的 IgE 血中濃度変化によって制御されるマスト細胞脱顆粒が重要な役割を担う可能性が示唆された。これは血中の IgE 抗体量が概日時計によって制御され、その抗体量によってマスト細胞が適時的に糞線虫に対して防御反応を誘導していることが推測できる。その今後は、その他の時計遺伝子変異・欠損、マスト細胞欠損マウスを用いた実験、抗体産生に関与する免疫細胞(T・B細胞)の解析を *Sv* 感染モデルを用いて行い、詳細な糞線虫感染防御における概日時計を介する全貌を明らかにしていく予定である。

6 研究成果の発信方法 (予定を含む)

論文発表および学会・研究会(日本免疫学会、時間生物学会、米国アレルギー学会等)でポスターまたは口頭発表を行い、研究成果を積極的に外部に発信する。また山梨大学医学部ホームページまたは申請者の所属する講座のホームページに研究成果を専門外の方がわかりやすいように簡便に研究内容・成果を載せ、社会や国民に向けて研究成果の開示を積極的に行う。