

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

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 研究の目的

ヒト糞線虫感染マウスモデル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。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。

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* 感染モデルを作成し、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 Ig E 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、フローサイトメトリー法、qPCR 法等を用いて解析した。

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: BMDCs) 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 BMDCs 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。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

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

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

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* 変異および *Bmal1* 欠損マウスでは消失していた。加えて、*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比較検討を行なった結果、野生型マウスにおける好酸球数が概日リズム性周期を示すことわかり、*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。さらに、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すのに対し、*Clock* 変異マウスでは消失していた。

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

Sv 特異的 IgE の周期性がマスト細胞活性化 (脱顆粒) の周期性を制御できるか否かについて、野生型マウス、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 7 日後 (*Sv*-血清) のマウスから採取した血清を用いて BMMCs を感作し、*Sv* 抽出物刺激における脱顆粒の強度を比較検討した結果、10 時 (AM) に回収した *Sv*-血清で感作した BMMCs の脱顆粒反応が概日リズム性周期を示した。一方、時計遺伝子 *Clock* 変異マウス由来 BMMCs ではこの周期が消失していた。さらに、抗原感作後のマウスを用いて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 日目に *Sv* 抗原を皮下投与して誘導し検討した結果、血中 *Sv* 特異的 IgE 濃度が高値を示す時間でマスト細胞の脱顆粒反応が強く誘導された。

以上の結果から、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変異・欠損マウスでは消失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、その血清を用いた *in vitro* における BMMCs 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。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。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。