

- 3) 酒井健太郎, 福井謙二, 前橋恭子, 永井智紀, 青柳美輪子, 落合恵理子, 高津光洋, 岩橋公晴. 女性化症候群を認めた一剖検例. 第78回日本法医学会学術関東地方集会. 東京, 10月.
- 4) 孫 燕 (日本大), 久山佳代, 福井謙二, 岩橋公晴, 山本浩嗣. Actinomycosis of the upper lip with tumor-like appearance. 第20回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会. 札幌, 7月.
- 5) Lu T, Hano H, Fukui K, Lu Y. Chromosomal allelic imbalance at 8p22-23 regions associated with both carcinogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. The 21th IUBMB and the 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Shanghai, Aug.

熱帯医学講座

教授：渡辺 直熙 寄生虫感染とIgE
准教授：牧岡 朝夫 原虫の分子生物学
准教授：石渡 賢治 寄生虫感染と粘膜免疫
講師：熊谷 正広 寄生虫症の臨床

教育・研究概要

I. 感染防御におけるマスト細胞と好塩基球

マスト細胞と好塩基球はいずれもIgE受容体を発現する細胞としてアレルギーでの役割が注目されてきた。われわれはこれらの細胞が生体に有利な機能を持つとする仮説のもとに、感染防御や免疫調節への関与を検討してきた。これまでにマラリア原虫の感染でマスト細胞由来のTNFやVEGFが防御を担うことを明らかにした。最近、自然免疫関連分子であるDectin-1がマスト細胞上に発現することが判明した。そこでネズミマラリアにおけるDectin-1の関与をみると、Dectin-1を欠くと防御能が低下した。さらにマスト細胞欠損マウスに正常マスト細胞を移入することで得られる防御はDectin-1欠損マウスのマスト細胞の移入の場合は低下した。すなわちマスト細胞上Dectin-1によるマラリア原虫への感染防御が示唆された。次に東南アジアでの感染者の急増が問題となっているデングウイルス感染とマスト細胞の関係を検討した。デングウイルス感染は軽症のデング熱と重症のデング出血熱およびデングショック症候群を起こす。重症では血管からの血漿漏出が病態発現の機序とされている。われわれはこの病態がマスト細胞によるものと考え、ベトナムの患者血清について検討した。重症患者ではVEGF値およびVEGF受容体-1の値が有意に高く、同時にマスト細胞特異酵素であるchymaseとtryptaseの値も高く示され、マスト細胞の活性化が重症の病態と関連することが示唆された。ダニの感染防御におけるマスト細胞および好塩基球についても検討した。マウスにフタトゲチマダニを感染させると、皮膚の感染局所に好塩基球の浸潤がみられた。またマスト細胞欠損マウスや抗体産生不全マウスでは再感染防御が抑制され、マスト細胞と抗体がダニの感染防御に関与することが明らかになった。

II. 腸管寄生虫感染におけるTh2免疫応答の抑制調節

T細胞応答の強さは、T細胞が抗原提示細胞上のMHC分子と抗原ペプチドをT細胞受容体を介して

認識する際に作用する補助刺激分子によって調節されている。抗原提示細胞に発現する補助刺激分子の B7 ファミリーに属する B7-DC は、同ファミリー内の B7-H1 と最も相同性が高く、共に T 細胞上の PD-1 という抑制性シグナルを誘導する分子と結合することが知られている。しかしながら、抑制作用を示す B7-H1 とは異なり、B7-DC は T 細胞増殖や細胞傷害性 T 細胞を誘導することが明らかにされている。そこで今回、強力に Th2 免疫応答を誘導する *Nippostrongylus brasiliensis* 感染における B7-DC の機能を検討した。抗 B7-DC 抗体投与あるいは B7-DC ノックアウトマウスにおける感染では末梢血好酸球増多、IgE および Th2 サイトカイン産生が対照に比して強く、逆に Th1 サイトカインである IFN- γ 産生が抑制された。これは B7-DC が Th2 応答を抑制していることを示唆する。また、この作用は PD-1 に依存しないことから、Th1 応答を増強するような未知の分子を介して行われていることが示唆された。一方、*N. brasiliensis* 感染において腸間膜リンパ節の抗原提示細胞は、一旦 MHC Class II 発現を上昇させるが、以降発現を低下させた。これは T 細胞に対する増殖能の低下として確認された。Class II 発現低下は抗原提示細胞上の IL-4 受容体発現の上昇およびリンパ節における Th2 応答発現 (IL-4 産生) 時期と重なることから、IL-4 による抗原提示能の低下誘導が考えられた。実際、抗原提示細胞は IL-4 との共培養によって Class II 発現を低下させた。以上より、腸管寄生虫感染によって誘導される Th2 応答は抗原提示細胞レベルにおいて B7-DC あるいは IL-4 を介して抑制されている可能性が示唆された。

Ⅲ. アメーバの脱嚢と嚢子形成の機序

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*: Eh) は栄養型から嚢子への変化に伴い嚢子壁を形成する。これは外界での嚢子の生存に必須であるとともに、宿主の小腸内で起こる脱嚢時にはその一部が破壊される必要がある。嚢子壁はタンパク質とキチンで構成されていることから、脱嚢時にキチン分解酵素キチナーゼ (Chit) の作用は重要である。一方、嚢子形成時にも Chit 活性が亢進することも報告されている。そこで、*Entamoeba* の Chit に注目し、脱嚢および嚢子形成誘導に伴う Chit の発現解析を行った。実験は Eh の脱嚢・嚢子形成のモデルとなる *E. invadens* (Ei) を用いた。Eh および Ei ゲノムデータベースのより、Eh には 1 種、Ei には 4 種 (EiChit1, Chit2, Chit3, Chit4) の Chit 遺伝子の存在が判明

した。系統樹を作成したところ、*Entamoeba* Chit は系統的に独自に進化したものと推測された。RT-PCR により、EiChit の mRNA 量を栄養型と嚢子で比較すると、嚢子では多量の Chit1 と微量の Chit4 の発現が認められ、両者とも栄養型では発現が著しく低かった。Chit2 と 3 の発現は両発育型とも低く、Chit1 と 4 と異なり栄養型の方が嚢子よりも若干高かった。mRNA 量を脱嚢誘導の前後で比較すると、Chit1 と 4 は減少し、Chit2 と 3 は増加した。一方、すべての Chit で嚢子形成の初期に著しい mRNA 量の増加が認められ、後期になると低下した。以上の結果から、*Entamoeba* Chit は脱嚢と嚢子形成の過程で分子種において、異なる発現調節を受けていることが明らかになった。

Ⅳ. 超高速シーケンサーを用いた *Entamoeba* 遺伝子の転写開始点と発現解析

先に oligo-cap 法より *Entamoeba* の完全長 cDNA ライブラリーを構築し、データベース Full-*Entamoeba* として公開した。これを用いた解析から、*Entamoeba* の 5' 非翻訳領域 (5'UTR) は他生物に比し、著しく短いことが判明した。一方、近年、oligo-cap 法と超高速シーケンサーを組み合わせた転写開始点 (TSS)-シーケンス (seq) 法が新たに開発され、これにより膨大な数の遺伝子の TSS 解析が可能になると同時に、そのタグ数により遺伝子発現の定量化も可能となった。今回、この TSS-seq 法を用いて *E. invadens* 栄養型の TSS 解析並びに嚢子形成誘導に伴う遺伝子の発現解析を行った。マップされた 3,534 個の遺伝子のうち、90% の遺伝子の 5'UTR が 30 塩基以下で、5'UTR が短いという先の結果が確認された。発現解析の結果、嚢子誘導時にのみ発現する遺伝子を発現値の順に並べたところ、高いものには hypothetical protein が多かったが、1 番多かったのは chitin binding lectin であった。また、chitinase の発現も高く、嚢子形成誘導によりキチン関連遺伝子の発現が亢進するという予測が確認された。このように TSS 解析のみならず遺伝子発現解析も同時に行うことができる TSS-seq 法は *Entamoeba* トランスクリプトーム解析に極めて有用と考えられた。

Ⅴ. サラセミアのマラリア抵抗性機序

サラセミアは最も多い単一遺伝子疾患でマラリアに対して抵抗性をもつことが知られている。しかし、サラセミアのマラリア抵抗性の機序は明らかになっていない。過去の研究では予想に反してサラセミア

モデルマウスのほうが抵抗性の低いことが示された。我々はその原因をマウスとヒトの赤血球の差異と考えた。マウスは胎生期に胎児型ヘモグロビンから成人型ヘモグロビンに変換するが、ヒトは成人になっても胎児型ヘモグロビンの発現が持続する。そこでヒトとマウスの胎児ヘモグロビン環境条件を同一にするため、マウスにヒト胎児ヘモグロビン遺伝子を導入した。野生型 ($\gamma^- \beta^+$)、ヒト胎児ヘモグロビン発現マウス ($\gamma^+ \beta^+$)、ヒト胎児ヘモグロビン発現サラセミアマウス ($\gamma^+ \beta^-$) にネズミマラリア原虫を感染させた。ヒト胎児ヘモグロビン発現マウスは他の2群と比べて感染赤血球数が有意に少なく、生存期間が有意に長かった。この結果はサラセミアの形質が胎児ヘモグロビン発現量を増大させることが原因と思われる、ヒトのサラセミアのマラリア抵抗性はサラセミア自体によるのではなくサラセミアから誘導される高胎児ヘモグロビン血症によることが示唆された。

〔点検・評価〕

研究では本年度は文部科学省科学研究費3件、長崎大学研究費1件、企業1件、学内研究奨励費1件の助成を受け、資金面での環境は整った。国内外との共同研究も幅広く展開された。また「免疫ふしぎ未来」における寄生虫感染の紹介も好評で、研究成果の社会還元にも貢献した。各自の研究内容は大きな変更なしに継続された。研究においては、新たな知見が急速に蓄積されるなかで常に見直しが必要で、寄生現象を通してより重要で本質的な新たな概念を見出す弛みない努力が求められる。

寄生虫の感染では他の病原体の感染ではみられない多くの宿主反応がみられる。この特異な宿主反応の理解は、寄生虫の構造や発育の複雑さ、さらに *in vitro* の実験が難しいなどの理由であまり進んでいない。寄生虫感染の研究にあえて取り組むことが新たな生命現象の発見につながると信じている。

教育では「寄生虫学実習」に課題が残った。これまでの実習時間の制約のなかで、実物にふれることで寄生虫症の診断と病態の理解を促すことを目指してきた。しかしながら熱心に取り組む学生ばかりではないのが実状である。実習の内容と方法の再検討が必要である。本講座が中心となって行われた「免疫」は学生から高い評価を受けた。講義では本学教員による基本的事項の概要に加えて、世界の第一線で活躍している外部の講師による先端的研究を踏まえた内容が学生に強い印象を与えた。「免疫学実習」は、免疫現象の基本事項を題材とした問題解決型の

内容で、学生の自ら学ぶ姿勢が強調され、少人数の討論による理解は充実感を持って受け入れられた。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Involvement of serine proteases in the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. *Parasitol Res* 2009; 105(4) : 977-87.
- 2) Tetsutani K, Ishiwata K, Ishida H, Tu L, Torii M, Hamano S, Himeno K, Hisaeda H. Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyalus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4+CD25+Foxp3+ Treg in mice. *Eur J Immunol* 2009; 39(10) : 2822-30.
- 3) Ikeshima-Kataoka H, Wada A, Ishiwata K, Watanabe N, Saito S. Cloning and expression of cDNA for Interleukin 4 from the MSKR inbred strain of *Mus musculus molossinus*. *In Vivo* 2009; 23(2) : 277-80.

III. 学会発表

- 1) 渡辺直熙, 石渡賢治, 三宅健介¹⁾, 古田隆久¹⁾(¹東大). 消化管寄生虫感染防御におけるMD-1の関与. 第78回日本寄生虫学会大会. 東京, 3月.
- 2) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 渡辺直熙, 小林正規¹⁾, 竹内勤¹⁾(¹慶応大). *Entamoeba* の脱嚢及び嚢子形成におけるセリンプロテアーゼの発現解析. 第78回日本寄生虫学会大会. 東京, 3月.
- 3) 熊谷正広, 平糠和志(京大), 渡辺純一(東大), 牧岡朝夫. 赤痢アメーバおよび *Entamoeba invadens* の完全長 cDNA ライブラリー・データベース 'Full-*Entamoeba*' の構築. 第78回日本寄生虫学会大会. 東京, 3月.
- 4) 小畑一茂¹⁾, 石渡賢治, 和田 剛¹⁾, 河野洋平¹⁾, 峯岸克行¹⁾鳥山 一¹⁾(¹東京医科歯科大), 渡辺直熙. 消化管寄生線虫感染防御における好塩基球の役割. 第78回日本寄生虫学会大会. 東京, 3月.
- 5) 古田隆久¹⁾, 松岡裕之(自治医大), 高村-赤司祥子¹⁾, 三宅健介¹⁾(¹東大), 渡辺直熙. 抗TLR4/MD-2 agonistic 抗体によるマラリア原虫 sporozoite 感染の制御. 第78回日本寄生虫学会大会. 東京, 3月.
- 6) 平糠和志(京大), 熊谷正広, 渡辺純一(東大), 牧岡朝夫. *Entamoeba* の完全長 cDNA ライブラリーを用いた5'非翻訳領域の解析. 第78回日本寄生虫学会大会. 東京, 3月.
- 7) 渡辺直熙, 渋谷正史(東京医科歯科大), 古田隆久(東大). VEGF と血管内皮細胞上 VEGFR-2 によるマラ

- リア原虫の防御機構. 第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 京都, 6月.
- 8) 渡邊直熙, 石渡賢治, 三宅健介, 古田隆久. 消化管寄生虫感染防御におけるMD-1の関与. 第20回日本生体防御学会学術総会. 東京, 7月.
- 9) 石渡賢治, 渡邊直熙. 消化管寄生線虫感染における樹状細胞の解析: IL-4の影響. 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム. 大阪, 10月. [第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム プログラム・講演要旨]
- 10) Nishino T, Matsumoto Y, Ida H, Watanabe N. Human fetal hemoglobin induction protects against malaria in thalassemia model mouse. 13th Asian Pacific Congress of Pediatrics. Shanghai, Oct.
- 11) 渡邊直熙, Nguyen Thi Phuong Lan¹⁾, Vu Thi Que Huong¹⁾(¹ホーチミンバスタール研), Tran Thi Thuy²⁾, Vo Dinh Tham²⁾(²ホーチミン市第2小児病院), Vo Dinh Tham³⁾, Tran Van Dat³⁾(³ビンロン予防医学センター), 菊池三穂子⁴⁾, 安波道郎⁴⁾, 森田公一⁴⁾, 平山謙二⁴⁾(⁴長崎大), 古田隆久(東大). デング熱の病態形成におけるマスト細胞の関与. 第50回日本熱帯医学会大会. 宜野湾, 10月. [第50回熱帯医学会プログラム抄録集 2009; 72]
- 12) 牧岡朝夫, 平糠和志(京大), 熊谷正広, 渡邊純一(東大). 完全長cDNAライブラリーを用いたEntamoebaのトランスクリプトーム解析. 第50回日本熱帯医学会大会プログラム抄録集 2009; 91]
- 13) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 平糠和志(京大), 小林正規¹⁾, 竹内 勤¹⁾(¹慶応大). Entamoebaの脱嚢におけるコフィリンの発現解析. 第42回日本原生動物学会大会. 石巻, 10月.
- 14) 西野多聞, 石渡賢治, 熊谷正広, 牧岡朝夫, 松本芳嗣, 井田博幸, 渡邊直熙. モデルマウスを用いたサラセミアのマラリア抵抗性機序の解明 ヒト胎児ヘモグロビンとの関係. 第126回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2009; 124(6): 270]
- 15) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 平糠和志(京大), 小林正規¹⁾, 竹内 勤¹⁾(¹慶応大). Entamoebaのアクチン脱重合因子コフィリンの解析. 第32回日本分子生物学会年会. 横浜, 12月.
- 16) Watanabe N, Ishiwata K, Miyake K¹⁾, Furuta T¹⁾(¹Univ. Tokyo). Suppressive effect of MD-1 on protection to parasitic infection (MD-1による寄生虫感染防御の抑制). 第39回日本免疫学会総会・学術集会. 大阪, 12月. [日免疫学会学術記録 2009; 39: 214]
- 17) Fruta T (Univ. Tokyo), Watanabe N. Mast cell-derived VEGF activates p38MAPK pathway in vascular endothelial cells and participates in the protection for malarial infection (マスト細胞由来 VEGF による p38MAPK を介した血管内皮細胞の活性化とマラリアの防御). 第39回日本免疫学会総会・学術集会. 大阪, 12月. [日免疫学会学術記録 2009; 39: 99]
- 18) Obata K¹⁾, Ishiwata K, Wada T, Kawano Y, Minegishi Y¹⁾, Watanabe N, Karasuyama H¹⁾(¹Tokyo Medical and Dental Univ.). Basophils play an important role in the acquisition of resistance to infections with nematodes (好塩基球は線虫の感染防御における獲得免疫に重要な働きをする). 第39回日本免疫学会総会・学術集会. 大阪, 12月. [日免疫学会学術記録 2009; 39: 100]
- 19) Wada T¹⁾, Obata K¹⁾, Ishiwata K, Yoshikawa S¹⁾, Minegishi Y¹⁾, Watanabe N, Karasuyama H¹⁾(¹Tokyo Medical and Dental Univ.). The role for basophils in the development of resistance to external parasites (外部寄生虫に対する耐性獲得における好塩基球の役割). 第39回日本免疫学会総会・学術集会. 大阪, 12月. [日免疫学会学術記録 2009; 39: 214]
- 20) Saito S, Akiyama N, Yano C, Ishiwata K, Watanabe N, Hirai H¹⁾, Nagata K¹⁾(¹BML), Nakamura M (Tokyo Medical and Dental Univ.). The role of CRTH2 in Th1 and Th2 inflammatory reactions (Th1 および Th2 炎症反応における CRTH2 の役割). [日免疫学会学術記録 2009; 39: 214]

V. その他

- 1) 高野裕太, 古谷伸之, 大西弘太郎, 柳内秀勝, 熊谷正広, 伊藤公美恵, 吉田 博, 渡邊直熙, 多田紀夫. 安静時胸部不快感から始まり, 息切れが増強してきた38歳の女性. 日未病システム会誌 2009; 14(2): 346-50.