

顎顔面免疫と生殖器免疫のクロストーク

Crosstalk between maxillofacial immunity
and reproductive immunity

清野 宏 (KIYONO HIROSHI)

東京大学・医科学研究所・教授



研究の概要：一個所の粘膜関連リンパ組織(MALT)に抗原投与することで遠隔の粘膜面に抗原特異的免疫応答が誘導されることは現象論として知られているものの、その分子・細胞機構については不明な点が多い。本研究では経鼻免疫および経眼免疫によって誘導される抗原特異的免疫担当細胞の腔粘膜組織指向性を決定する分子機構を明らかにすることを目的とし、そこから得られた知見を基に、性感染症に対する新世代粘膜ワクチンの開発への基盤研究遂行を目指す。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

経鼻または経眼投与された抗原に対する特異的免疫応答が遠隔の粘膜組織である腔粘膜に効果的に誘導されることは以前から知られており、この性質を利用した単純ヘルペスウイルス2型 (Herpes Simplex Virus type2: HSV-2) やヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus: HIV) などによる性感染症に対するワクチン開発を目標とした研究が進められている。しかしながら、現在までにプラスミド DNA、増殖能欠損ウイルス、組換えウイルスベクターなどを用いた動物モデルによるワクチン開発が試みられたが、いずれも防御免疫応答、特に細胞性免疫応答の誘導効率が悪く、現段階ではヒトへの応用は困難であり、実際にワクチンとして認可されているものは存在しない。この問題を解決するため、経鼻投与された抗原に対する抗原特異的T細胞および抗体産生細胞が誘導される機構および担当組織、さらに記憶T細胞やB細胞が形成され、感染に備えるべく腔粘膜に誘導・局在するための分子・細胞機構の解明が待たれている。

2. 研究の目的

本研究は、世界的に存在が認められているが現象論にとどまっている粘膜免疫循環帰巢経路の、顎顔面免疫と生殖器免疫に焦点を当て、その分子機構の解明を目的とする。さらに、現時点では予防法が存在しないことが問題となっている、性感染症に対する効果的

な粘膜ワクチンを開発する基盤研究遂行を目指すものである。

3. 研究の方法

本研究では、まずモデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を経鼻または経眼投与して誘導された OVA 特異的 IgA 産生細胞、OVA 特異的エフェクターT細胞 (CD4+ T細胞・CD8+ T細胞) の腔粘膜指向性の機構について解析する。得られた結果の普遍性を HSV-2 やクラミジアなどの性感染症原因微生物を用いたマウスモデルにより検証する。その際、感染に必須で高い免疫原性がある HSV-2 エンベロプタンパク質 glycoproteinB (gB) または gD や *Chlamydia trachomatis* の major outer membrane protein (MOMP) を構成するペプチドのうち、高い免疫原性を有する配列を決定し、従来手法を応用した MHC クラス I と当研究室において開発された技術を駆使したクラス II テトラマー、さらには各ペプチド特異的T細胞レセプタートランスジェニックマウスを作製し、それらを用いて通常のマウスでは割合が少ない抗原ペプチド特異的エフェクターT細胞を解析する。さらに、申請者らがその効果を実証した、カチオン性ナノ粒子 (ナノゲル) アジュバントフリー抗原デリバリーシステムを用いて、アジュバントの影響がない状態で誘導された抗原特異的エフェクターT細胞を解析する。以上の実験から得られる結果を総合的に判断し、経鼻・経眼免疫による抗原特異的免疫担当細胞の腔

粘膜局所における移動、局在メカニズムを明らかにする。

4. これまでの成果

HSV-2 の弱毒株を経鼻免疫すると、実際に腔粘膜組織において野生型 HSV-2 に対する防御免疫応答が認められることを確認した。本研究において作製した弱毒化 HSV-2 をマウスに経鼻免疫した後に、免疫組織学的解析法、HSV-2 特異的プライマーを用いた定量 PCR 法および *in vitro* 共培養系を駆使して解析した結果、1) HSV-2 が鼻腔粘膜上皮細胞に感染し増殖する。2) 鼻腔粘膜樹状細胞がそのウイルス抗原を補足・処理した後、頸部リンパ節において未感作 CD4 T 細胞に抗原提示する。3) 誘導された HSV-2 特異的エフェクター CD4 T 細胞が腔粘膜やその所属リンパ節へ移動する、といった、HSV-2 特異的エフェクター CD4 T 細胞誘導とその動態機構についての細胞生物学的知見が得られた。

次いで、腔粘膜における野生型 HSV-2 感染に対する防御免疫応答には、免疫により誘導された HSV2-CD4 T 細胞が腔粘膜組織に長期間局在することが重要であり、この腔粘膜局在性 HSV2-CD4 T 細胞は注射による腹腔免疫では誘導されないことを明らかにし、経鼻免疫ワクチンの有用性を証明した。さらに、この経鼻免疫により誘導される HSV2-CD4 T 細胞の腔粘膜指向性および局在性の分子機構について今後さらに詳細に解析する目的で、HSV-2 抗原特異的 MHC クラス II テトラマーおよび TCR トランスジェニックマウスの作製を開始していたが、トランスジェニックマウスに関しては、メルボルン大学より貸与された HSV-1 の gD 特異的 CD4 T 細胞 TCR トランスジェニックマウス (HSV-1 gDT-II マウス) が、HSV-2 に対しても十分に応答しうるということが明らかになったため、作製は中止し、以降の実験には HSV-1 gDT-II マウスを用いることにした。これに伴い、MHC クラス II テトラマーも、HSV-1 gDT-II マウスが認識するペプチド配列を用いて作製することにした。

また、エフェクター T 細胞の腔粘膜指向性の分子機構については、経鼻免疫した野生型マウスの腔粘膜組織 CD4 T 細胞においてケモカインレセプター CXCR3 を代表とするいくつかの細胞の遊走に関与する分子の発現上昇を確認している。

5. 今後の計画

経鼻免疫したマウスの腔粘膜組織において、組織型メモリー細胞群の誘導、存在に関与する分子機構について、メモリー T 細胞の解析のみならず、リンパ球以外の腔粘膜組織細胞の側面から、Tandem Mass Tag 法を用いた LC-MS/MS による網羅的タンパク質同定・比較定量を行う予定である。これらの方法により、経鼻免疫によって誘導される抗原特異

的免疫担当細胞の腔粘膜組織指向性を決定する分子機構を明らかにし、注射型免疫方法では形成が困難な腔粘膜組織型メモリー T 細胞形成機構について明らかにしていく。また、その機構の普遍性を確認するために、*C. trachomatis* と、その抗原として MOMP を用いた感染実験系および *in vitro* 実験系を HSV-2 と同様に組み、解析を進めていく予定である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- 1) Kurashima, Y., Amiya, T., Fujisawa, K., Shibata, N., Suzuki, Y., Kogure, Y., Hashimoto, E., Otsuka, A., Kabashima, K., Sato, S., Kubo, M., Akira, S., Miyake, K., Kunisawa, J. and Kiyono, H. The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity* (in press), 2014.
- 2) Kong, I.G., Sato, A., Yuki, Y., Nochi, T., Takahashi, H., Sawada, S., Mejima, M., Kurokawa, S., Okada, K., Sato, S., Briles, D.E., Kunisawa, J., Inoue, Y., Yamamoto, M., Akiyoshi, K. and Kiyono, H. Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by *Pneumococcus*. *Infect. Immun.* 81:1625-1634, 2013.
- 3) Kim, D.-Y., Fukuyama, S., Nagatake, T., Takamura, K., Kong, I.-G., Yokota, Y., Lee, C.-H., and Kiyono, H. Implications of nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in the development of allergic responses in an allergic rhinitis mouse model. *Allergy* 4: 502-509, 2012.
- 4) Sato, S., and Kiyono, H. The Mucosal immune system of the respiratory tract. *Curr. Opin. Virol.* 2:225-232, 2012.
- 5) Kim, D.Y., Sato, A., Fukuyama, S., Sagara, H., Nagatake, T., Kong, I.G., Goda, K., Nochi, T., Kunisawa, J., Sato, S., Yokota, Y., Lee, C.H., and Kiyono, H. The airway antigen sampling system: Respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J. Immunol.* 186: 4253-4262, 2011.

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/EnMen/index_j.html