

平成 30 年 9 月 1 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20259

研究課題名(和文) 上気道粘膜免疫における樹状細胞、NKT細胞、Th17細胞の機能関連の解析

研究課題名(英文) Analysis of functional relationships of dendritic cells, NKT cells, and Th17 cells in upper respiratory mucosal immunity

研究代表者

梅本 真吾 (UMEMOTO, Shingo)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10771991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)： NKT細胞は末梢血リンパ球の約0.05%を占める希少なリンパ球サブセットであり、CD1d 分子上に提示された糖脂質抗原を認識し種々の免疫反応を引き起こすことで知られている。NKT細胞は、生体内における頻度は少ないものの、樹状細胞をはじめとする免疫担当細胞と協調し、宿主の免疫応答に深く関与している。

本研究においてNKT細胞は直接的に免疫担当細胞と協調し、上気道粘膜においても生体防御に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、上気道粘膜防御においてTh17細胞の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Mucosal immune responses in the nasopharynx associated with NKT cell activation were examined. Mice were administered α -galactosylceramide (α -GalCer) intranasally as a ligand for NKT cells, without any antigen.

After nasal immunization, dendritic cells (DCs) increased in nasal-associated lymphoid tissue. Antibody-producing cells, mainly those that produce immunoglobulin A, significantly increased in the nasal passage (NP). Interleukin (IL)-17-producing Th 17 cells were also induced in the NP. Bacterial challenges with live *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* resulted in enhanced clearances of both bacterial species from the nasopharynx. It is interesting that bacterial clearance was impaired by IL-17 neutralization.

These results suggest that the activation of NKT cells by nasal administration of α -GalCer induced protective immunity in the nasopharynx, possibly involving the interaction with DCs and induction of Th17 cells.

研究分野：上気道粘膜免疫

キーワード：NKT細胞 樹状細胞 Th17細胞 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景

病原微生物の侵入に絶えず曝されている粘膜面には全身系とは異なったユニークかつ発達した免疫システムが存在している。

我々の研究室ではこれまでに世界に先駆けて、上気道における粘膜免疫の誘導組織である鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)からの免疫担当細胞分離に成功し、また実効組織である鼻粘膜や腸管粘膜と比較することで、上気道粘膜免疫機構の特徴について明らかにした(Eur J Immunol 1998)。

抗原特異的免疫応答の誘導には、上気道においては経口や経腹腔などの投与方法よりも経鼻免疫が最も効果的であることを明らかにした(J Infect Dis 1999)。そして抗原の経鼻投与により、鼻腔とは離れた中耳粘膜にも抗原特異的免疫応答が誘導されうことを明らかにし (Infect Immun 2000, Laryngoscope 2000)、インフルエンザ菌を用いた中耳炎モデルにおいても経鼻ワクチンの感染予防効果を明らかにした (Infect Immun 2001)。さらに鼻粘膜、耳管、中耳といった上気道の一連の粘膜組織から免疫担当細胞分離にも成功し、上気道における粘膜免疫研究のモデルを確立した(Vaccine 2006)。

粘膜免疫応答を賦活化するためには適当な粘膜アジュバントが必要であり、有効かつ安全なアジュバントの研究も重要である。これまでに Toll-like receptor (TLR) 9 のリガンドである CpG DNA が経鼻アジュバントとして安全であり(Laryngoscope 2006)、抗原特異的免疫応答の誘導においてコレラトキシンと同様に効果的であることを明らかとなっている(Laryngoscope 2006)。さらに最近では NKT 細胞のリガンドである α -ガラクトシルセラミドの経鼻アジュバントとしての有効性も証明した (Vaccine 2010)。

このメカニズムとして重要な点は樹状細胞の活性化である。樹状細胞は T 細胞、B 細胞を制御し、免疫応答の司令塔として機能し

ていることがわかっているが、さらに、我々は樹状細胞と NKT 細胞の上気道の感染防御における関連、ならびにその重要性について報告した (Vaccine 2011)。

上気道粘膜免疫において樹状細胞との相互関係が重要である NKT 細胞の役割については報告 (投稿中、申請者は筆頭著者)、するが、本研究ではさらに踏み込んで、樹状細胞と NKT 細胞、Th17 細胞との関連について検討し、生体防御の観点からその役割について明らかにすることを目的とする。樹状細胞と NKT 細胞、さらに Th17 細胞の3者による粘膜免疫応答についてはこれまでほとんど検討されておらず、興味ある結果が期待される。最終目標としては NKT 細胞、樹状細胞を介し、種々の粘膜疾患に対応するような、より効果的なワクチン開発を目標としている。

2. 研究の目的

本研究の目的はこれまでの樹状細胞や経鼻ワクチンの研究を進展させ鼻粘膜および NALT における NKT 細胞の機能解明を進めることである。

鼻粘膜および NALT において NKT 細胞を活性化する事により誘導される Th17 を中心とした免疫細胞、IL-17, 22 を中心としたサイトカインなどについて精査を進める。

鼻粘膜および NALT における樹状細胞、NKT 細胞、Th17 細胞 3 者の相互作用について検討を進める。

鼻粘膜および NALT における樹状細胞 NKT 細胞、Th17 細胞の応答につき評価する。さらに、NKT 細胞と Th17 細胞の相互作用についても評価する。

3. 研究の方法

われわれは、抗原刺激を排除した条件で、純粋に NKT 細胞を刺激する事による免疫反応をみることで、NKT 細胞の機能を解明した(次項 雑誌論文 1))。

具体的な方法としては、SPF 下で飼育した

BALB/c マウスを用い、NKT 細胞のリグンドである α -ガラクトシルセラミドを経鼻投与する(週1回、計3回)。

鼻粘膜(nasal passage: NP)において IL-17 産生細胞数が増加するかを確認し、Th17 産生サイトカイン mRNA(IL-17, 22 mRNA)について PCR を行い評価する。Th17 細胞関連以外のサイトカイン mRNA についても比較して評価する。

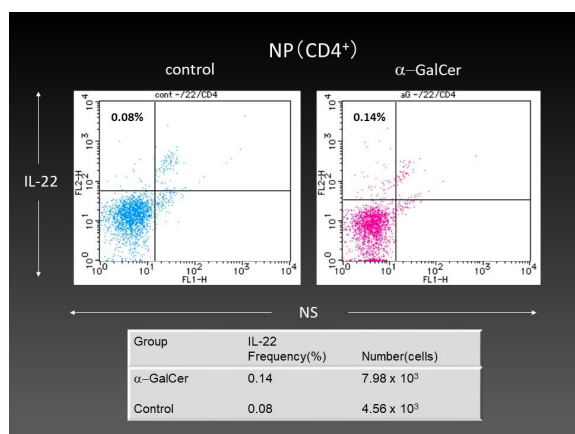
樹状細胞を直接刺激するリグンドは存在しないが、樹状細胞の増殖因子である Flt3 ligand を経鼻的に投与すると NALT の成熟樹状細胞が増加し、様々な免疫応答が増幅することは我々の研究室でこれまでに示した(Vaccine 2010)。

これまでの方法に則り Flt3 ligand を経鼻投与し、フローサイトメトリーを用いて NKT 細胞数、IL-17, 22 産生細胞数につき評価を行う。更に PCR を用いて IL-17, 22 mRNA について評価を行う。

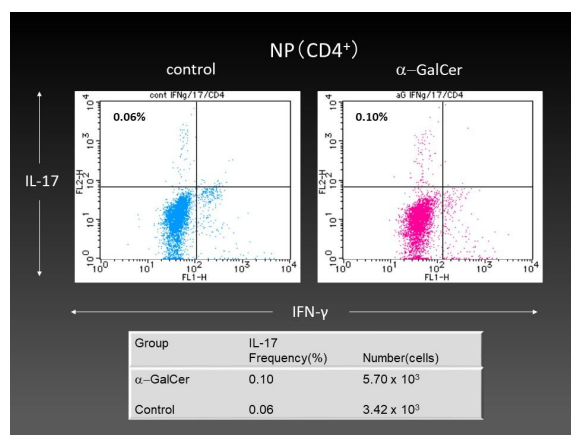
4. 研究成果

・IL-17, IL-22 産生細胞の変化

α -GalCer 群で、IL-17 産生細胞数の増加を認めた(次図)。

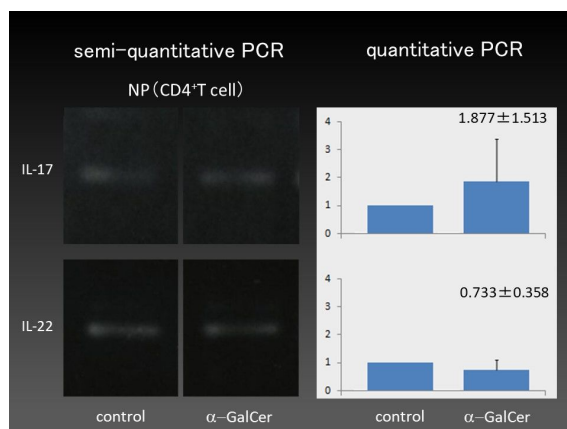


α -GalCer 群で、IL-22 産生細胞数の増加を認めた(次図)。



・Th17 産生サイトカイン mRNA 発現

α -GalCer 経鼻投与群で有意ではないが、IL-17 mRNA 発現増強する傾向にあった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1) Umemoto S, Kodama S, Hirano T, Noda Ke, Suzuki M : Mucosal immune responses associated with NKT cell activation and dendritic cell expansion by nasal administration of α -galactosylceramide in the nasopharynx, Otolaryngology: Open Access. 2015, 査読有

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅本 真吾 (UMEMOTO, Shingo)

大分大学・耳鼻咽喉科・助教

研究者番号：10771991

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()