

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11333

研究課題名(和文) 上気道粘膜免疫応答と自然リンパ球の関与

研究課題名(英文) Effect of Mucosal immune responses on innate lymphoid cells 2 in mucosal and lymphoid tissues.

研究代表者

鈴木 正志 (Suzuki, Masashi)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：60211314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：粘膜アジュバントを経鼻投与した時の自然リンパ球応答について検討した。雄性、BALB/cマウスを用いた。粘膜アジュバントを週1回、1、2回経鼻免疫を行い、投与後7日目に、鼻粘膜、肺、頸部リンパ節、脾臓を採取し単核球を抽出した。2型自然リンパ球を濃縮したのちに、各組織における2型自然リンパ球の割合についてフローサイトメトリー解析を行った。対照と比較して、鼻粘膜および肺組織においては投与により2型自然リンパ球率の上昇を認めた。しかし、CTとMPLにおける免疫応答には相違を認めた。頸部リンパ節や脾臓においては変化を認めなかった。粘膜アジュバントの経鼻投与は気道粘膜中心に自然リンパ球に影響を与える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当科における研究において、インフルエンザ菌外膜蛋白やP6蛋白を用いた中耳炎ワクチンへの臨床応用について経鼻粘膜免疫応答を通じた研究を行っているが、粘膜ワクチンによりIgAを主体とした粘膜免疫応答やIgGを主体とした全身免疫応答を惹起するにはコレラトキシンなどのアジュバントによる粘膜免疫賦活化作用が重要であることは周知の事実である。今回、粘膜免疫賦活化機序として、コレラトキシンの自然リンパ球への影響がアジュバント効果に関連を示すことが示唆され、今後の粘膜ワクチン開発において、自然リンパ球を介した獲得免疫の賦活化はより有効なワクチン開発において重要になるかも知れない。

研究成果の概要(英文)：Mucosal adjuvants, such as cholera toxin (CT) and monophosphoryl lipid A (MPL), are important to elicit mucosal and systemic immune responses to bacterial antigens. In this study, we investigate the effect of CT or MPL via nasal route on Group 2 innate lymphoid cell (ILC2) in mucosal tissues and lymphoid tissues. BALB/c mice were intranasally administered 1 µg CT or 10 µg MPL once a week for 1 or 2 times. At 1 week after the administration, nasal mucosa, lung, cervical lymph nodes, spleen were collected. Mononuclear cells were isolated from these tissues, and ILC2 were concentrated by using the Mouse ILC2 Enrichment Kit. Flow cytometric analysis was performed to examine the proportion of ILC2. The percentage of ILC2 in the nasal mucosae and lung tissues increased after the administration compared to the control, but no change was observed in the cervical lymph nodes and spleen. Our study indicated that nasal administration of adjuvants may affect ILC2 population in the airway mucosa.

研究分野：医歯薬学

キーワード：粘膜免疫 上気道 アジュバント 自然リンパ球2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外界に接し、抗原、アレルゲンや病原微生物の侵入に絶えず曝されている粘膜面には粘膜免疫機構という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。粘膜免疫は“免疫学の新大陸”として近年、活発に研究が進められており、腸管を中心にその特異性、重要性が認識されるようになってきた。しかし上気道における解析は十分になされておらず、未解明の部分が多く残っている。我々はこれまで上気道粘膜免疫機構について研究を行い、そのユニーク性や、中耳炎をはじめとする上気道炎に対する経鼻ワクチンの有効性について動物実験レベルで明らかにしている。その経鼻ワクチンの有効性を誘導するには粘膜アジュバントによる粘膜免疫活性化機序の解析が重要なポイントとなっている。コレラトキシン(CT)は代表的な粘膜ワクチンアジュバントとして使用されているものの、そのアジュバント効果がどこに起因するのか明らかになっていないところが多く存在している。また、当科においても粘膜アジュバントの実験を行っており、Toll-like receptor (TLR) 9 のリガンドである CpG DNA、Flt3 ligand、TLR4 のリガンドである Monophosphoryl lipid A など様々な粘膜アジュバントの有効性について報告している。その中でも、Monophosphoryl lipid A は現在の臨床において、ヒトワクチンのアジュバントとして実際に使用されており、その獲得免疫に作用する機序については CT 同様に十分に解明されてはいない。

2. 研究の目的

抗原特異的免疫応答にはリンパ球や樹状細胞をはじめとして、種々の免疫担当細胞が関与している。経鼻免疫は上気道粘膜に効率的に免疫応答を誘導しうる方法であるが、経鼻的に投与された抗原が粘膜関連リンパ組織を経由し樹状細胞を活性化し獲得免疫系を賦活化する。近年、リンパ球系に属する自然免疫細胞である自然リンパ球も様々な粘膜免疫応答に関与しており、獲得免疫への迅速な誘導に関与していることが知られている。今回、粘膜ワクチン誘導確立する過程において、自然リンパ球や T、B 細胞を中心に上気道粘膜免疫の誘導機序の解析を行い、中耳炎や副鼻腔炎など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。また、研究を少しでも臨床応用につなげることが目的となる。

3. 研究の方法

動物: SPF 下にて飼育した、雄性、BALB/c マウス(5~6 週齢)を用いた。
投与抗原: 粘膜アジュバントとして Cholera Toxin(CT) 1 µg をリン酸緩衝液(PBS)に溶解し CT 溶液(10 µl)を調製した。また Monophosphoryl lipid A (MPL) 10 µg をリン酸緩衝液(PBS)に溶解し MPL 溶液(10 µl)を調製した。マウス(n=5)に CT 溶液および MPL 溶液を週1回計1、2回経鼻投与を行った。対照は PBS の経鼻投与マウスとした。
試料採取: 粘膜アジュバント投与終了後7日目に鼻粘膜、肺組織、頸部リンパ節、脾臓を採取し、RPMI1640 培養液に保存した。鼻粘膜、肺組織は RPMI1640 培養液にコラゲナーゼ type IV を加えて、37 °C、15 分にて処理を行った後に、パーコールを用いた比重遠沈法により粘膜に存在する単核球を採取した。頸部リンパ節、脾臓などのリンパ組織はスチールメッシュを用いて細砕後に単核球を採取し、RPMI1640 培養液に保存している。
フローサイトメトリーによる解析: 各種蛍光標識した抗 CD3a、抗 CD4 抗体、抗 CD8a 抗体、抗 CD25 抗体、抗 CD69 抗体を用いて単核球を染色し、T 細胞の活性化について検討を行った。粘膜免疫における 2 型自然リンパ球(ILC2)の関与を検討するため、Mouse ILC2 Enrichment Kit を用いて、ILC2 を濃縮したのちに、抗 CD45 抗体、抗 Lineage(+)抗体*、抗 CD278 抗体にて染色し、各種粘膜アジュバントが与える ILC2 の動態についても解析を行った。(*: CD4、CD8a、CD11b、CD11c、CD19、Ly-6G、NK1.1、TER119、TCRab、TCRgd を含む)。同様の実験を3回実行し、BD LSRFortessa™ セルアナライザーにより解析している。

4. 研究成果

各組織由来 MNC における T リンパ球の解析において、各組織においては CT の反復投与により、CD3 陽性細胞における CD4 比率の低下を認め、2 回投与においては CD8 比率の増加を認めた。また MPL の反復投与により、CT 投与と同様に CD3 陽性細胞における CD4 比率の低下を認め、1 回目投与から CD8 比率の増加を認めた。しかし、2 回目投与における増加効果は認めなかった。また Helper T 細胞である CD4 陽性 T 細胞において、早期のリンパ球活性化マーカーである CD69 は CT 投与後1回目において、すべての臓器において高発現を認めたが、CT 投与後2回目において減少するものの、CD4 陽性 T 細胞中 CD69 陽性 T 細胞比自体は対照と比較して高値であった。しかし、MPL 投与では、初回投与後では CD4 陽性 T 細胞中 CD69 陽性 T 細胞比は上昇するものの、2 回目投与において CD69 陽性 T 細胞比は減少していた。また、後期のリンパ球活性化マーカーである CD25 は、鼻粘膜では CT および MPL 投与1回目において CD25 陽性 T 細胞比は上昇しているものの、2 回目には変化を認めなかった。しかし、肺、頸部リンパ節、および脾臓における CD 25 陽性 CD4 陽性 T 細胞比は変化を認めなかった(表1)。

各臓器組織における ILC2 の解析について図示する(図1)。ILC2 比率においては、鼻粘膜においては CT 投与1、2 回目共に、対照と比して抗 Lineage(+)抗体陰性、抗 CD278 抗体陽性である ILC2 陽性細胞比率の増加を認めた。肺組織においても対照と比較して、ILC2 比率の増加を認めたが、2 回目には ILC2 比率は低下を認めている。表2に CT および MPL 投与における ILC2 比率の平均値および標準偏差を示す。CT 1 回目投与において、鼻粘膜や肺組織において ILC2 比

率の増加(鼻粘膜:33.3%、肺組織:7.2%)を認めるものの、2回目では減少しているが対照よりも、ILC2 比率は増加していた(鼻粘膜:23.2%、肺組織:4.3%)。しかし MPL 投与においては CT と同様に鼻粘膜を中心に肺組織において ILC2 比率の増加を認めたが(鼻粘膜:27.3%、肺組織:5.1%)、2回目投与において対照と比較しても低下していた(鼻粘膜:9.3%、肺組織:2.4%)。各粘膜アジュバントによる粘膜免疫応答動態が ILC2 に与える影響には相違を認めることが示される(表2)。頸部リンパ節や脾臓においては ILC2 比率の変化は少なく、いずれのアジュバントにおいても2回目投与により ILC2 の減少を認めている。今後はアジュバントの反応性の相違が獲得免疫に与える影響について解析を行う必要がある。

CD3gated	CD8+	CD4+	CD4+CD69+	CD4+CD69-	%(CD69+/CD4+)	CD4+CD25+	CD4+CD25-	%(CD25+/CD4+)
鼻粘膜								
control	20.7	61.8	10.4	54.3	17.2	6.3	59.9	9.4
CT 1time	39.2	56.2	17.5	37.7	30.8	7.5	47.7	15.3
CT 2times	41.6	48.8	23.0	25.6	45.6	6.5	41.1	14.0
MPL 1time	37.2	50.5	14.1	41.1	25.6	8.3	43.2	16.2
MPL 2times	37.8	40.4	3.8	34.4	9.9	4.7	32.7	12.5
肺								
control	38.6	60.6	6.4	55.5	10.7	7.0	57.7	10.5
CT 1time	39.6	50.7	6.3	47.5	14.4	2.3	46.4	9.4
CT 2times	59.5	41.1	11.9	29.4	27.8	3.5	37.8	8.7
MPL 1time	45.9	51.2	8.5	45.2	17.9	4.0	48.6	8.3
MPL 2times	46.4	47.8	2.5	44.4	5.1	2.2	43.2	5.1
頸部リンパ節								
control	37.5	67.7	12.3	58.1	17.1	9.1	62.3	12.7
CT 1time	36.3	72.3	6.9	45.6	13.5	5.5	46.7	8.4
CT 2times	47.3	59.2	10.8	48.3	18.4	6.4	52.7	10.9
MPL 1time	54.7	64.8	9.0	56.1	13.9	6.4	58.4	9.9
MPL 2times	52.1	60.5	6.9	53.1	12.4	6.5	53.6	10.9
脾臓								
control	40.9	61.6	13.7	51.0	21.7	10.0	56.0	15.1
CT 1time	46.3	52.4	9.9	41.5	18.9	7.3	43.7	14.5
CT 2times	51.5	49.2	13.9	33.8	29.3	6.9	41.8	14.5
MPL 1time	40.7	55.6	11.2	45.6	20.3	6.7	50.1	11.7
MPL 2times	47.3	52.1	9.9	40.6	21.2	5.7	44.5	11.8

表1 各組織由来単核球における CD4 陽性 T リンパ球の解析

	鼻粘膜	肺	頸部リンパ節	脾臓
control	19.7 ± 1.8	2.8 ± 1.1	12.1 ± 1.4	3.3 ± 2.9
CT 1time	33.3 ± 9.1	7.2 ± 3.8	16.8 ± 11.1	2.5 ± 1.7
CT 2times	23.2 ± 12.9	4.3 ± 3.3	6.0 ± 2.5	1.8 ± 0.5
MPL 1time	27.3 ± 19.5	5.1 ± 3.2	11.2 ± 9.4	4.9 ± 2.7
MPL 2times	9.3 ± 9.6	2.4 ± 1.7	6.5 ± 10.1	1.4 ± 1.3

表2 各臓器における2型自然リンパ球(ILC2)の比率

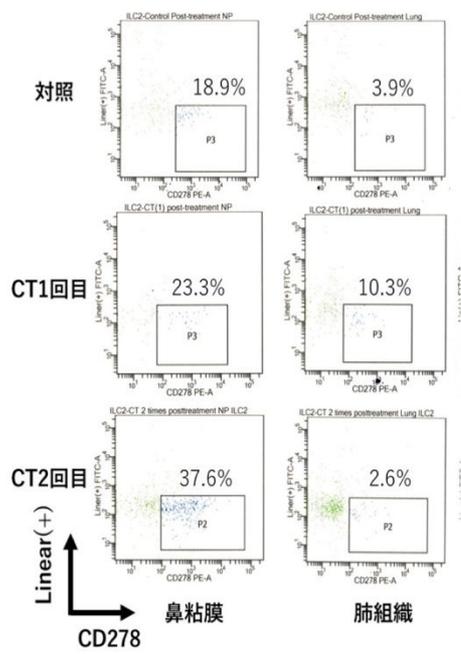


図1:鼻粘膜においては CT 投与回数に応じて、ILC2 比率の増加を認めた。肺組織においては対照と比較して、単回投与で ILC2 比率の増加を認めたが、2回目には対照と同様であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平野隆、川野利明、松永崇志、吉永和弘、鈴木正志
2. 発表標題 粘膜アジュバント経鼻投与による自然リンパ球への影響
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Yoshinaga, Takashi Hirano, Toshiaki Kawano, Takayuki Matsunaga, Masashi Suzuki
2. 発表標題 Effect of Mucosal adjuvant on innate lymphoid cells 2 in mucosal and lymphoid tissues.
3. 学会等名 20th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平野 隆 (Hirano Takashi) (20305056)	大分大学・医学部・講師 (17501)	
研究分担者	川野 利明 (Kawano Toshiaki) (30633424)	大分大学・医学部・助教 (17501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	門脇 嘉宣 (Kadowaki Yoshinori) (10706980)	大分大学・医学部・助教 (17501)	