

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02857

研究課題名(和文) 神経向性ウイルス複製における粘膜組織微生物群の役割

研究課題名(英文) Role of mucosal tissue microbiota in neurotropic virus infection

研究代表者

飯島 則文 (IIJIMA, NORIFUMI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・サブプロジェクトリーダー

研究者番号：40612552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経向性ウイルスの一つである単純ヘルペスウイルス(HSV)は、現在、感染を予防できるワクチンが皆無であるため、神経組織に潜伏感染したウイルスを根治することは不可能である。それ故、HSVの感染部位である粘膜組織に構築される生体防御機構の重要性や限界を明らかにすることで新規治療方法の構築を目指した。本研究では、粘膜に集積する組織局在型メモリーT細胞(TRM)がHSVが粘膜から神経への移行を完全に阻害する、その複雑なメカニズムの詳細を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性感染症を発症する病原体として知られている単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)は、生殖器の粘膜から感染し、神経組織へと移行する神経向性ウイルスである。HSV-2感染を防御するワクチン開発の研究が進められているが、現在もHSV-2感染を防御できる方法は全くない。それ故、一度神経組織に侵入したウイルスを除去できないため、HSV-2感染部位における生体防御機構の詳細を明らかにすることにより、新たな治療標的を同定することができる可能性が高い。それ故、申請者は生殖粘膜組織に集積する免疫細胞群や常在微生物群の役割に着目し、粘膜組織に構築される生体防御機構の詳細を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Herpes simplex virus (HSV), one of the neurotropic viruses, is impossible to cure latently infected nerve tissue because there is currently no vaccine that can prevent infection. Therefore, we aimed to establish a new treatment method by clarifying the importance and limitations of the defense mechanisms that are constructed in mucosal tissues, the site of HSV infection. In this study, we analyzed the details of the unresolved mechanism by which tissue-localized memory T cells (TRMs) accumulating in the mucosa completely inhibit the retrograde transport of HSV from the mucosa to the nerves.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：B細胞応答 組織局在型メモリーT細胞 粘膜感染

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (HIV; Human Immunodeficiency Virus)、単純ヘルペスウイルス (HSV; Herpes Simplex Virus) やヒトパピローマウイルス (HPV; Human Papillomavirus) などのウイルスは、感染後に宿主の細胞に潜伏感染し、免疫機構を回避して生体に長期間生存する。近年になり、身体中の特定の臓器・細胞に潜伏するのみならず、免疫不全 (HIV)、神経疾患 (HSV)、中喉頭癌・子宮頸癌 (HPV) などの深刻な慢性疾患を引き起こすことが明らかとなってきた。それ故、これらのウイルスに感染して潜伏感染が成立してしまうと根治させることが困難である。また、HPV に関してはワクチンで感染を予防することが可能であるが、HSV および HIV に関しては、現状感染を予防できるワクチンが存在しない。そのためこれらのウイルス感染を予防できるワクチンを開発するためにはこれまでとは異なる視点で新しい治療標的を明らかにする必要が考えられる。そこで、申請者は感染部位である粘膜組織に構築される生体防御機構及びウイルスによって回避される生体防御機構の詳細を明らかにすることで新規治療方法の構築を目指す。

2. 研究の目的

性器ヘルペスを引き起こす単純ヘルペスウイルス 2 型 (Herpes simplex virus type 2; HSV-2) の感染部位である生殖粘膜組織では、HSV-2 感染 5 週間後には、CD4 陽性 T 細胞と抗原提示細胞がクラスターを形成する。クラスター内の CD4 陽性 T 細胞は、組織局在型 CD4 陽性メモリー T 細胞 (Tissue-resident CD4⁺ memory T cells; CD4⁺ T_{RM}) として長期間維持されることをすでに報告している (Iijima N & Iwasaki A. *Science* 346: 93. 2014)。さらには、これらの CD4⁺ T_{RM} は、HSV-2 再感染後早期に高濃度の IFN-gamma を産生して HSV-2 が粘膜から神経へ移行することを完全に阻害することが可能である。

本研究は、HSV ウイルスの感染部位である粘膜組織に構築される生体防御機構、特に粘膜組織微生物群や CD4⁺ T_{RM} に着目し、粘膜組織におけるウイルス複製制御における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、粘膜に長期間維持される CD4⁺ T_{RM} の維持に常在微生物叢が与える影響、粘膜へのメモリー B 細胞浸潤における CD4⁺ T_{RM} の役割をフローサイトメトリーにて解析した。

(1) CD4⁺ T_{RM} の維持に常在微生物叢が与える影響

HSV-2 弱毒株をマウス膣粘膜組織に感染 4 週間後、マウスの飲水を抗生物質の入った飲水 (アンピシリン、ゲンタマイシン、ネオマイシン、バンコマイシン) に交換し、2 週間飼育した。その後、ウイルス抗原に反応する IFN-gamma 産生 CD4 陽性 CD44 陽性 T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーで解析した。

(2) 粘膜へのメモリー B 細胞浸潤における CD4⁺ T_{RM} の役割

HSV-2 弱毒株をマウス膣粘膜組織に感染 5 週間後、抗 CD4 抗体または抗 IFN-gamma 抗体を投与し、HSV-2 野生株を再感染させた。HSV-2 再感染 1 日後に、膣粘膜組織に浸潤するメモリー B 細胞 (IgD⁺ IgG⁺ CD19⁺) の細胞数をフローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

本研究方法に記載した実験から下記の成果を得た。

(1) HSV-2 弱毒株をマウス膣粘膜組織に感染 4 週間後、Abt MC らの方法に従って (Abt MC et al. *Immunity* 27: 158, 2012) 抗生物質の入った水をマウスに飲水させた。抗生物質処理 2 週間後にはマウス体内の常在細菌叢が著しく減少する。この状態で、膣粘膜組織を酵素消化により単細胞浮遊液を調製した。その後、ウイルス抗原と共に培養し、IFN-gamma を産生する CD4 陽性メモリー T 細胞の細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、ウイルス抗原に反応して IFN-gamma を産生する CD4 陽性メモリー T 細胞数は、抗生物質処理した場合とコントロール群ではほぼ同数であった (図 1)。それ故、生殖粘膜組織に長期間維持される CD4⁺ T_{RM} の維持に、常在細菌叢は影響を与えないことが示唆された。

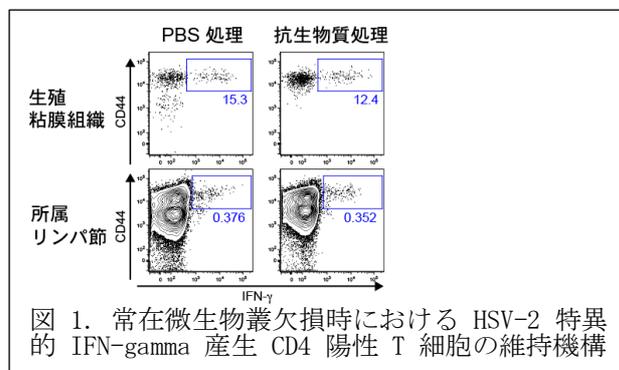


図 1. 常在微生物叢欠損時における HSV-2 特異的 IFN-gamma 産生 CD4 陽性 T 細胞の維持機構

その結果、ウイルス抗原に反応して IFN-gamma を産生する CD4 陽性メモリー T 細胞数は、抗生物質処理した場合とコントロール群ではほぼ同数であった (図 1)。それ故、生殖粘膜組織に長期間維持される CD4⁺ T_{RM} の維持に、常在細菌叢は影響を与えないことが示唆された。

(2) 次に、 $CD4^+T_{RM}$ の役割についてさらに詳細に解析した。HSV-2 弱毒株をマウス膣粘膜組織に感染 5 週間後に、HSV-2 野生株を再感染させた場合、再感染後早期に、メモリー B 細胞 ($IgD^-IgG^+CD19^+$) が速やかに集積することを発見した (図 2A)。一方で、HSV-2 弱毒株で免疫していないマウス (未免疫マウス) では、このようなメモリー B 細胞の集積は認められなかった。加えて、再感染後早期に膣粘膜組織に集積したメモリー B 細胞は、共刺激分子である CD86 の発現上昇が認められ、メモリー B 細胞が活性化していることが明らかとなった (図 2A)。

さらには、HSV-2 弱毒株をマウス膣粘膜組織に感染 5 週間後に、抗 CD4 抗体または抗 IFN-gamma 抗体を投与し、 $CD4^+T_{RM}$ がメモリー B 細胞の集積に関与しているのか、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、抗 CD4 抗体を投与した場合、抗 IFN-gamma 抗体を投与した場合、それぞれにおいて、HSV-2 再感染 1 日後に、膣粘膜組織に浸潤するメモリー B 細胞 ($IgD^-IgG^+CD19^+$) の細胞数をフローサイトメトリーで解析したところ、コントロール群に比べ、メモリー B 細胞数は著しく減少した (図 2 B&C)。以上の結果か

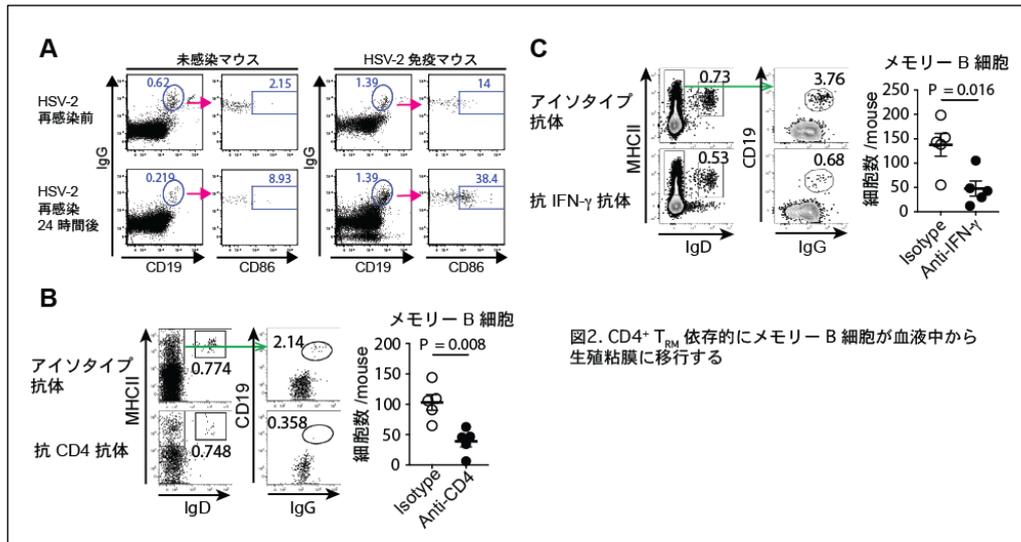


図2. $CD4^+T_{RM}$ 依存的にメモリー B 細胞が血液中から生殖粘膜に移行する

ら、HSV-2 再感染後早期に $CD4^+T_{RM}$ が IFN-gamma を産生し、血中から生殖粘膜組織へのメモリー B 細胞の浸潤に大きく貢献していることが明らかとなった (Oh JE*, Iijima N* et al. *Nature* 571, 122, 2019)。

これまでの研究から $CD4^+T_{RM}$ は、HSV-2 再感染後早期に IFN-gamma を速やかに分泌することで、粘膜上皮細胞に感染した HSV-2 の複製を阻害することを明らかにしている。本研究では、 $CD4^+T_{RM}$ が IFN-gamma 分泌を介して、感染細胞のウイルス複製のみならず、血中からメモリー B 細胞を動員することで、HSV-2 の粘膜から神経への伝播抑制に大きく貢献していることが示唆された。これらの結果は、生殖粘膜組織に長期間維持される $CD4^+T_{RM}$ が、生殖粘膜組織から神経への HSV-2 移行をどのようにして完全に阻害するのか説明できる重要な発見である。今後、このような T_{RM} を人工的に、安全に粘膜組織に動員することができれば、HSV 感染を防御できるワクチンのプラットフォームとして重要な基盤を構築することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Lelliott PM, Momota M, Lee MSJ, Kuroda E, Iijima N, Ishii KJ, Coban C.	4. 巻 95
2. 論文標題 Rapid Quantification of NETs In Vitro and in Whole Blood Samples by Imaging Flow Cytometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytometry A.	6. 最初と最後の頁 565-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cyto.a.23767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Oh JE*, Iijima N*, Song E, Lu P, Klein J, Jiang R, Kleinstein SH, Iwasaki A (* equally contributed).	4. 巻 571
2. 論文標題 Migrant memory B cells secrete luminal antibody in the vagina.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 122-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1285-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Amezcu Vesely MC, Pallis P, Bielecki P, Low JS, Zhao J, Harman CCD, Kroehling L, Jackson R, Bailis W, Licona-Limon P, Xu H, Iijima N, Pillai PS, Kaplan DH, Weaver CT, Kluger Y, Kowalczyk MS, Iwasaki A, Pereira JP, Esplugues E, Gagliani N, Flavell RA.	4. 巻 178
2. 論文標題 Effector TH17 Cells Give Rise to Long-Lived TRM Cells that Are Essential for an Immediate Response against Bacterial Infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1176-1188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.07.032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 飯島則文	4. 巻 72
2. 論文標題 粘膜ウイルス感染に対する末梢組織生体防御機構の解明に取り組んで	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagatake T, Suzuki H, Hirata SI, Matsumoto N, Wada Y, Morimoto S, Nasu A, Shimojou M, Kawano M, Ogami K, Tsujimura Y, Kuroda E, Iijima N, Hosomi K, Ishii KJ, Nosaka T, Yasutomi Y, Kunisawa J.	4. 巻 30
2. 論文標題 Immunological association of inducible bronchus-associated lymphoid tissue organogenesis in Ag85B-rHPIV2 vaccine-induced anti-tuberculosis mucosal immune responses in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International immunology	6. 最初と最後の頁 471-481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy046.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iijima N	4. 巻 426
2. 論文標題 Memory Lymphocyte Clusters in Genital Immunity: Role of Tissue-Resident Memory T cells (TRM).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Topics in Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 84-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/82_2020_213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee ML, Matsunaga H, Sugiura Y, Hayasaka T, Yamamoto I, Ishimoto T, Imoto D, Suematsu M, Iijima N, Kimura K, Diano S, Toda C.	4. 巻 12
2. 論文標題 Prostaglandin in the ventromedial hypothalamus regulates peripheral glucose metabolism.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 2330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22431-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imoto D, Yamamoto I, Matsunaga H, Yonekura T, Lee ML, Kato KX, Yamasaki T, Xu S, Ishimoto T, Yamagata S, Otsuguro KI, Horiuchi M, Iijima N, Kimura K, Toda C.	4. 巻 54
2. 論文標題 Refeeding activates neurons in the dorsomedial hypothalamus to inhibit food intake and promote positive valence.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Daigo Imoto, Izumi Yamamoto, Hirokazu Matsunaga, Toya Yonekura, Ming-Liang Lee, Kan X Kato, Takeshi Yamasaki, Ken-ichi Otsuguro, Motohiro Horiuchi, Norifumi Iijima, Kazuhiro Kimura, Chitoku Toda	4. 巻 -
2. 論文標題 Activation of prodynorphin neurons in the dorsomedial hypothalamus inhibits food intake and promotes positive valence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 183780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.07.02.183780	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ming-Liang Lee, Hirokazu Matsunaga, Yuki Sugiura, Takahiro Hayasaka, Izumi Yamamoto, Daigo Imoto, Makoto Suematsu, Norifumi Iijima, Kazuhiro Kimura, Sabrina Diano, Chitoku Toda	4. 巻 -
2. 論文標題 Prostaglandin in the ventromedial hypothalamus regulates peripheral glucose metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 56374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.05.18.056374	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Yamamoto, Toya Yonekura, Taiga Ishimoto, Shu-Cheng Xu, Norifumi Iijima, Kazuhiro Kimura, Sabrina Diano, Chitoku Toda	4. 巻 -
2. 論文標題 Expectation for sweet taste changes peripheral glucose metabolism via basolateral amygdala	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 479066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.02.03.479066	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 飯島則文
2. 発表標題 生殖器粘膜ウイルス感染に対する末梢組織免疫制御機構の解明
3. 学会等名 第 92 回 日本細菌学会総会 シンポジウム3 生体フロントラインバリアの破綻と感染症 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norifumi Iijima
2. 発表標題 Migrant memory B cells secrete luminal antibody in the vagina
3. 学会等名 The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯島則文
2. 発表標題 組織局在型メモリー T 細胞に着目した潜伏感染ウィルススの再活性化機構の解明
3. 学会等名 J-PRIDE 研究成果発表会 重症・難治性感染症の理解と予防・治療法の開発に向けて～若手研究者たちの挑戦～ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norifumi Iijima
2. 発表標題 Peripheral immune control of latent virus infection
3. 学会等名 大阪大学免疫学フロンティア研究センター IFReC セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯島則文
2. 発表標題 性感染症に対する末梢組織生体制御機構の解明
3. 学会等名 第71回日本細菌学会関西支部総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯島則文
2. 発表標題 生殖器粘膜ウイルス感染に対する末梢組織免疫制御機構の解明
3. 学会等名 第 92 回 日本細菌学会総会 シンポジウム3 生体フロントラインバリアの破綻と感染症（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯島則文
2. 発表標題 “ 生体に寄生する ” 病原体が引き起こす様々な慢性疾患発症の予防・治療薬開発戦略
3. 学会等名 戦略的創造研究推進事業（新技術シーズ創出）令和3年度戦略目標及び革新的先端研究開発支援事業令和3年度研究開発目標の検討に関するワークショップ（感染症創薬学の新潮流）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Norifumi IIJIMA
2. 発表標題 Neuro-Immune Control of Mucosal Virus Infection
3. 学会等名 THE UEHARA INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2021 brain-periphery interactions an increasingly significant area in life sciences and medicine（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯島則文
2. 発表標題 神経および末梢組織における生体防御機構の重要性
3. 学会等名 日本神経免疫学会 第9回神経と免疫を語る会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯島則文
2. 発表標題 末梢組織に構築される生体防御機構の重要性
3. 学会等名 東京大学医科学研究所、国際共同利用・共同研究拠点2021年度国際共同利用・共同研究拠点成果報告会（千葉大学真菌医学研究センターとの合同開催）（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 飯島則文 石井健	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医薬ジャーナル社	5. 総ページ数 8
3. 書名 アレルギー・免疫 内因性アジュバントと自己免疫疾患	

1. 著者名 飯島則文	4. 発行年 2019年
2. 出版社 公益財団法人 日本感染症医薬品協会	5. 総ページ数 6
3. 書名 The Japanese Journal of Antibiotics 粘膜ウイルス感染に対する末梢組織生体防御機構の解明に取り組んで	

1. 著者名 飯島則文	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 16
3. 書名 「感染・炎症・免疫」 単純ヘルペスウイルス 2 型 (HSV-2) 感染に対する末梢組織免疫記憶メカニズムの仕組み	

1. 著者名 飯島則文	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 18
3. 書名 実験医学別冊 『新世代フローサイトメトリー活用スタンダード 生物学・医学・創薬研究で定量・多色解析を活かす！基本原理の理解と実践プロトコール』 第二章 II 基礎科学研究・細胞外 6 末梢組織に局在するさまざまな免疫担当細胞の表現型及び機能解析	

〔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	戸田 知得 (CHITOKU TODA) (70571199)	北海道大学・獣医学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Yale University School of Medicine	Harvard Medical School	Geisel School of Medicine at Dartmouth	他2機関