

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：84420

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22645

研究課題名(和文) 粘膜組織免疫応答を応用した新規抗酸菌免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel antiacid bacterial immunotherapy based on mucosal immune response

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌やらい菌などの抗酸菌は、免疫担当細胞であるマクロファージで寄生・繁殖することができるため、病原性が高く長期間にわたって生体内に生存することができる。そのため、既存の抗酸菌薬で治療できない場合は抗酸菌の増殖抑制制御が不能となり、生命が脅かされることになる。そこで、抗酸菌薬が効果を発揮しない多剤耐性抗酸菌に対して、化学療法では不可能である感染部位の免疫増強効果を期待する新しい免疫療法の基盤となる研究計画を提案する。本研究計画から、多剤耐性結核菌のパンデミックなどに備えた、これまでにない抗酸菌に対する新しい免疫療法の基盤が構築できると確信している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗酸菌の一つである結核菌は世界10大死因の一つに数えられ、2016年には世界中で1,040万人が結核に罹患し、170万人が結核で死亡している。抗結核薬を長期間投与することにより、結核菌を駆逐することが可能であるが、多剤耐性結核菌(MDR)や広範囲薬剤耐性結核菌(XDR)に対しては、効果を発揮しない例が増加している。最も致命的なのは、すべての抗結核薬に耐性の結核菌の将来的な蔓延である。

本研究では、耐性菌を生み出す化学療法ではなく、粘膜組織の免疫増強効果を目的とした免疫療法のプラットフォームの構築を検討することで、今後の多剤耐性菌にも対処できる治療方法の新しい方向性を示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Anti-acid bacilli such as Mycobacterium tuberculosis and Leprosy are capable of parasitizing and reproducing in macrophages, the cells responsible for immunity, and are therefore highly virulent and can survive in the body for a long time. Therefore, if they cannot be treated with existing antibacterial drugs, the growth of anti-acid bacilli can become uncontrollable, resulting in life-threatening consequences. Therefore, we propose a research plan that will serve as the basis for a new immunotherapy against multidrug-resistant acid-fast bacteria, focusing on the reinforcement of immune defense in mucosal tissues instead of conventional chemotherapies. The goal of this project is to provide the basis for a new therapeutic platform against multidrug-resistant acid-fast bacteria in preparation for a pandemic.

研究分野：粘膜免疫

キーワード：粘膜免疫増強

## 1. 研究開始当初の背景

結核菌は世界 10 大死因の一つに数えられ、2016 年には世界中で 1,040 万人が結核に罹患し、170 万人が結核で死亡している。多剤耐性結核菌 (MDR) や広範囲薬剤耐性結核菌 (XDR) に対しては、治療効果を発揮しない例が増加している。

結核菌が潜伏感染すると、肺組織のマクロファージに結核菌が感染して形成した肉芽腫が多く認められる。マクロファージの他に、結核菌特異的 CD4 陽性 T 細胞の局在も多く認められるが、これらの CD4 陽性 T 細胞は、結核菌の除去に大きな役割を果たす IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  産生細胞のみならず、IL-17, IL-4 および IL-10 産生 CD4 陽性 T 細胞 (結核菌の潜伏感染に寄与すると考えられる細胞群) も認められる。特に、多剤耐性結核菌患者では、IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性 T 細胞の著しい減少や FoxP3 陽性 CD4 陽性 T 細胞数の著しい増大が報告されている (Geffner L. et al. *Infect Immun.*, 2009)。また、結核患者では、IL-6, IL-9 および IL-22 の産生上昇が認められ、抗結核免疫応答の抑制が示唆される。

## 2. 研究の目的

申請者は、先の研究から単純ヘルペスウイルス 2 型 (Herpes simplex virus type 2; HSV-2) 野生株からチミジンキナーゼ (Thymidine kinase; TK) を欠損した弱毒株を C57BL/6 マウスの生殖粘膜組織に免疫すると、免疫後 5 週間で感染部位である粘膜固有層に HSV-2 特異的メモリー T 細胞とマクロファージを中心とした抗原提示細胞の凝集塊 (Memory Lymphocyte Clusters; MLC) が形成されることを発見した (Iijima N & Iwasaki A. *Science*, 2014)。

MLC の特徴としては、

- ① 網羅的遺伝子解析の結果から、少なくとも MLC の形成にウイルスの複製は関与していない。
- ② MLC には、HSV-2 特異的 IFN- $\gamma$  産生メモリー T 細胞の凝集が認められ、HSV-2 再感染後早期に IFN- $\gamma$  を産生し、HSV-2 除去に大きく貢献している (Iijima N & Iwasaki A. *Science*, 2014, Iijima N & Iwasaki A. *Nature*, 2016)。
- ③ MLC には、HSV-2 複製抑制の障壁となる IL-4, IL-13, IL-9 および IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞数は未検出であり、FoxP3 陽性 CD4 陽性 T 細胞数はごく僅かであった。

これらの結果から、HSV-2 弱毒株を用いて粘膜組織に MLC を誘導することにより、IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  産生を介して速やかに病原体の除去できるプラットフォームを他の末梢組織に応用できると構想をたてた。

そこで、申請者は抗酸菌の一種であるらい菌や結核菌に着目した。抗酸菌の多くは、マクロファージに寄生・感染し、免疫回避機構を駆使して長期間生体で生存する。特に、IFN- $\gamma$  が抗酸菌の除去・増殖抑制に重要な役割を果たすが、現在まで長い間、免疫担当細胞を基盤とした免疫療法よりも、イソニアジドなどの化学療法に治療を委ねてきた。しかしながら、近年多剤耐性結核菌 (MDR) や広範囲薬剤耐性結核菌 (XDR) などの化学療法では対処できない耐性菌の増加に悩まされ、化学療法では達成できない新しい免疫療法の構築が望まれている (Singh J et al. *Drug Deliv.* 23: 1676, 2016)。そこで、末梢組織で長期間の防御能力を維持できる MLC 構築方法を検討した。具体的には、皮膚組織 (らい菌) や肺組織 (結核菌) にこれらの細菌特異的メモリー T 細胞をクラスターに呼び込み、MLC を構築することで、免疫抑制機構を回避し (抗酸菌除去に障壁となる IL-4, IL-13, IL-9 産生細胞や FoxP3 陽性制御性 T 細胞の増加を抑える)、抗酸菌を効果的に治療する基盤となるプラットフォーム構築を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、まず C57BL/6 マウスの鼻粘膜組織に HSV 弱毒株を免疫した。免疫 5 週間後に肺組織や気管支組織に MLC が形成されるのか明らかにする目的で、フローサイトメトリー解析を実施した。具体的には、肺組織や気管支組織を単離し、Dispase や Collagenase などの消化酵素で処理後、単一細胞浮遊液を調製した。その後、HSV 抗原と共に培養し、HSV 特異的メモリー T 細胞が産生するサイトカインをフローサイトメトリーにより解析した。細胞表面に発現する抗 CD45 抗体および抗 CD4 抗体で染色後、細胞内サイトカイン染色法により細胞を固定してから Permeabilization buffer で細胞に穴を開けた。HSV 特異的 CD4 陽性メモリー T 細胞が産生する IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  を各抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

## 4. 研究成果

マウスの鼻粘膜に HSV-2 弱毒株を感染 5 週間後、メモリーリンパ球クラスター形成の指標となる HSV 特異的 CD4 陽性メモリー T 細胞の局在をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、未感染マウスおよび HSV 免疫マウスの肺組織では、組織局在型メモリー T 細胞

(Tissue-resident memory T cells;  $T_{RM}$ ) の指標となる CD69 が高発現していたが、 $IFN-\gamma$  を産生する HSV 特異的 CD4 陽性メモリー T 細胞はごくわずかであった (データ非公表)。加えて、IL-4 陽性、IL-17a 陽性または GM-CSF 陽性 T 細胞数もわずかであった。一方で、気管支組織から単一細胞浮遊液を調製して HSV 抗原と共に培養し、HSV 特異的メモリー T 細胞が産生するサイトカインをフローサイトメトリーにより解析した。その結果、HSV 特異的 CD4 陽性メモリー T 細胞の中で、 $IFN-\gamma$  陽性および  $TNF-\alpha$  陽性 T 細胞群を検出した (図 1)。また、一部 GM-CSF 陽性 T 細胞の増加も認められた。

以上の結果から、マウス鼻粘膜より

HSV-2 弱毒株を免疫すると、肺組織に HSV 特異的メモリー T 細胞が集積すると予想していたが、実際には肺組織よりも、気管支組織で HSV 特異的メモリー T 細胞の集積が認められた。特に、 $IFN-\gamma$ 、 $TNF-\alpha$ 、GM-CSF など抗酸菌に対する生体防御機構を強化するのに重要なサイトカインを分泌できる T 細胞の集積を確認することができた。また、申請者らは、マウス鼻粘膜から HSV-2 弱毒株を免疫すると、強力な B 細胞応答を誘導することができることを明らかにしており (Iijima N & Iwasaki A. *Nature*, 2016)、MLC 様組織が気管支組織に形成されている可能性が考えられた。現在、気管支組織における免疫組織染色により、B 細胞や T 細胞の局在を解析しており、今後このような粘膜組織の免疫増強効果を目的とした免疫療法のプラットフォームの構築をさらに検討することで、今後の多剤耐性菌にも対処できる新規治療方法の開発が期待される。

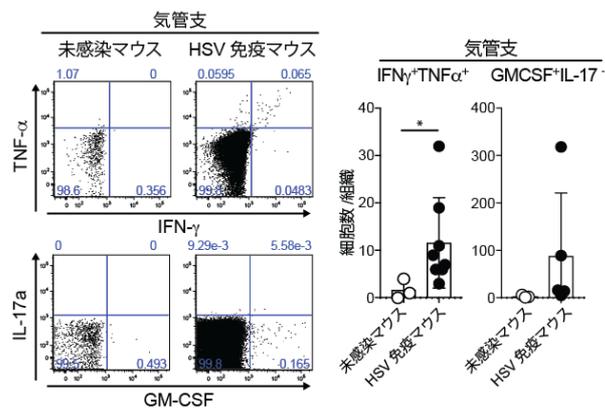


図 1. 気管支組織に集積する CD4 陽性メモリー T 細胞が分泌するサイトカイン

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Imoto D, Yamamoto I, Matsunaga H, Yonekura T, Lee ML, Kato KX, Yamasaki T, Otsuguro K, Horiuchi M, Iijima N, Kimura K, Toda C	4. 巻 1
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 1-17
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 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 Curr Top Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 83-117
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 1)LeeML, Matsunaga H, Sugiura Y, Hayasaka T, Yamamoto I, Imoto D, SuematsuM, 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 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-15
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 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 2)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 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 10)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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 4件/うち国際学会 1件)

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 IFRc 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 組織局在型メモリー T 細胞に着目した潜伏感染ウイルスの再活性化機構の解明
3. 学会等名 -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
4. 発表年 2019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 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イルスの再活性化機構の解明
3. 学会等名 -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

〔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

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