

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34414

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09930

研究課題名(和文) 舌下粘膜組織に存在する免疫細胞クラスターの口腔免疫応答における役割の解明

研究課題名(英文) Role of Immune Cell Clusters in Sublingual Mucosal Tissue in Oral Immune Responses

研究代表者

楠本 豊 (Kusumoto, Yutaka)

大阪大谷大学・薬学部・准教授

研究者番号：40252689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜の免疫応答機序の解明を目的とし、舌下粘膜に存在する免疫細胞の集積(クラスター)の性状、構成細胞、その役割について解析を行った。定常状態でのクラスターは他の組織と異なり制御性T細胞(Treg)を含む特徴的な構造体であることが示された。一方、抗原刺激を行うとT細胞サブセットの存在比率が定常状態に比べ変化した。クラスター内に含まれるT細胞を活性化する機能を持つ樹状細胞のサブセットが共存することから、クラスターは免疫反応の状態により構成細胞のサブセットが変化し、局所におけるT細胞の調節・維持機構を持つことが考えられた。このことは舌下投与ワクチンや舌下免疫療法の機序解明につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、舌下粘膜に存在する免疫細胞の集積(クラスター)特徴的な性状の詳細を解析した。この結果は、口腔粘膜における免疫応答の機構を理解するのに有益な情報を与えると考えられる。さらにI型アレルギー疾患の治療法として近年注目されている舌下免疫療法や、これからのワクチンとして有望視されている舌下投与ワクチンのメカニズム解明につながり、さらにはこれらのより効率良い療法、投与方法の開発につながるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of immune responses in the oral mucosa, we analyzed the properties, constituent cells, and functional roles of immune cell clusters in the sublingual mucosa. The clusters in steady state contained regulatory T cells (Treg), unlike other tissues. The subsets of constituent T cells significantly changed depending on the immune responses. The coexistence of a subsets of dendritic cells, which were able to activate these T cells, suggested that the clusters had a local immunomodulatory mechanism. These findings may lead to the elucidation of the mechanisms of sublingually administered vaccines and sublingual immunotherapy.

研究分野：口腔粘膜免疫

キーワード：口腔粘膜免疫 樹状細胞 クラスター

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

舌下抗原投与による注射不要のワクチン開発の一方で、スギ花粉に対する I 型アレルギー疾患の脱(減)感作舌下免疫療法薬が上市されている。すなわち口腔免疫系は、外来異物に対する応答と寛容の誘導に重要であるが、その誘導機序は十分に解明されていない。

抗原特異的免疫応答は、局所での樹状細胞(DC)の抗原取り込みから始まる。申請者らは広範囲の口腔組織での 3D 可視化による DC を中心とした免疫細胞分布を検討していた。DC が蛍光タンパク質 YFP を発現する CD11c-YFP マウスの口腔内全域の粘膜表層を観察し、舌下粘膜面に DC と他の血球系細胞の集積(クラスター)を見出した。同じような DC やマクロファージを含むリンパ球の集積が皮膚や他の粘膜組織で報告され(Takamura Front. Immunol, 2018 他)、メモリー T 細胞の維持や、抗原侵入時の活性化への関与が考えられている。

2. 研究の目的

本研究は、舌下投与ワクチンや舌下免疫療法の抗原投与部位である舌下粘膜面において、申請者らが見出した免疫細胞のクラスターの定常状態ならびに一次および二次免疫応答、全身免疫系との連携における役割を明らかにし、ひいては、口腔粘膜における免疫機能の解明を目的とした。そのために、以下の項目について検討した。

- ・クラスターの T 細胞サブセットの同定
- ・クラスターを構成する DC と孤立 DC の DC サブセットの同定
- ・クラスターの DC サブセットの T 細胞サブセットとの相互作用の検出
- ・クラスターへの免疫細胞集積の分子メカニズムの検討
- ・舌下免疫応答の全身免疫系への波及効果における舌下免疫系細胞移動に基づく解明

3. 研究の方法

1) 舌下面への抗原の投与

抗原として卵白アルブミン(OVA)を粘膜アジュバントであるコレラトキシン(CT)と共に PBS(-)に溶解させ、舌下粘膜に種々の条件で塗布をした。あるいは、ハプテンとなる 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)をアセトンとオリーブオイルを混合した溶液に溶解し、舌下粘膜に種々の条件で塗布をした。

2) CD11c-YFP マウスを用いた孤立した DC と DC クラスター分布の検討

CD11c 陽性細胞、すなわち、ほとんどの DC が蛍光タンパク質 yellow fluorescent protein (YFP) を発現する CD11c-YFP マウスの口腔内全域を共焦点レーザー顕微鏡で xy 画像のみならず xyz 画像を取得し、立体的に観察した。さらに、舌下領域については一定領域当たり存在する孤立した DC 数、クラスター数を xyz 画像を用いて算出した。

3) クラスター内の DC subset の検討

KikGR は紫色光を照射すると緑の蛍光(KikGR-green)から赤色の蛍光(KikGR-red)に色変換する光変換蛍光タンパク質である。CD11c 陽性細胞がこの KikGR タンパク質を発現している CD11c-KikGR マウスの舌下粘膜に存在するクラスターのみを共焦点レーザー顕微鏡の region of interest (ROI) の機能を用いて紫色光を当て、クラスター内の細胞のみ KikGR-green (緑蛍光)から KikGR-red (赤色蛍光)に変換し、フローサイトメトリー(FCM)により解析した。

4) クラスター内の T 細胞サブセットの検討

KikGR タンパク質を全ての細胞に発現したマウスから骨髓細胞を採取し、致死量の X 線照射した野生型 C57BL/6 マウスに移入し、キメラマウスを作成した。このマウスは、骨髓幹細胞由来の細胞が KikGR を発現しており、KikGR マウスでは上皮系細胞の KikGR 発現が高いために観察されない舌下粘膜の免疫細胞クラスターが観察されるようになる。このマウスの舌下粘膜のクラスターに 3) と同様にして紫光を照射し、クラスター内の細胞を KikGR-green 発現から KikGR-red 発現細胞に色変換し、FCM により解析した。

5) 免疫組織学的なクラスター内の細胞局在の検討

CD11c-YFP マウスの舌の凍結切片を作成し、蛍光色素標識抗マウス CD5、CD4、CD8 ならびに Foxp3 抗体を用いて免疫染色し、クラスター内の各細胞の存在や局在、細胞-細胞コンタクトを検討した。

6) 舌下粘膜から所属リンパ節への免疫細胞の移動

KikGR マウスもしくは CD11c-Kik マウスの舌下面に紫光を照射し、それぞれ舌下に存在する細胞もしくは DC を KikGR-green 発現細胞から KikGR-red 発現細胞に色変換してマークした。数時間もしくは数日後に所属リンパ節である顎下リンパ節を中心にいくつかのリンパ組織における KikGR-red 発現細胞の存在を FCM により解析した。

7) 所属リンパ節から舌下粘膜への免疫細胞の移動

KikGR マウスの顎下リンパ節に紫光を照射し、同リンパ節に存在する細胞を KikGR-green 発現細胞から KikGR-red 発現細胞に変換してマークした。数時間もしくは数日後に舌下粘膜における KikGR-red 発現細胞の存在を FCM により解析した。

8) 抗原特異的 T 細胞のクラスター内での検出

OVA 特異的 T 細胞受容体を持つ OT-II マウスが赤色の蛍光タンパク質 tdTomato を発現する OT-II / tdTomato マウスより得た CD4 陽性 T 細胞を、CD11c-YFP マウスに移入後、舌下に抗原投与した。投与 1~3 日後に OT-II / tdTomato CD4 陽性 T 細胞がクラスターに浸潤するか否かを共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

4. 研究成果

論文発表の予定であり、再提出時に詳細を公表する。

1) クラスターの性状

定常状態の CD11c-YFP マウスにおいて舌下粘膜に存在するクラスターならびに孤立した DC は、舌尖から舌根に近づくにつれ、すなわち口腔の奥の方が、その数が増加した。OVA を CT と共に、あるいは DNFB を舌下粘膜に塗布するとクラスターの大きさの増大が観察された(図 1)。

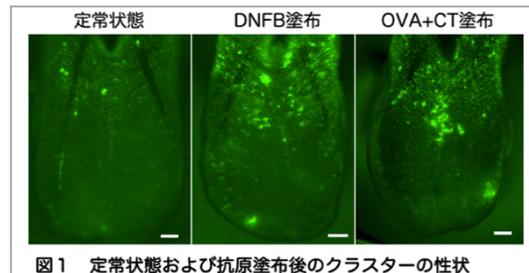


図1 定常状態および抗原塗布後のクラスターの性状

2) クラスターに存在する DC サブセット

CD11c-Kik マウスを用いた解析から、定常状態の舌下粘膜ではクラスターの内外を問わず、CD11b 陽性 DC、CD103 かつ XCR1 陽性 DC 等が存在した。この結果は他の口腔粘膜に関する報告と一致する。CD103(XCR1)陽性細胞は、cDC1 細胞すなわち CD8 陽性 T 細胞にクロスプレゼンテーションできる DC であると考えられている。また、口腔粘膜においては腸管などの粘膜組織と異なり CD11b 陽性 DC が制御性 T 細胞(Treg)を誘導するとの報告がある(Tanaka Mucosal Immunol 2017, Miyayama Commun. Biol. 2020)。これらのことから、定常状態の CD8 陽性 T 細胞や Treg をクラスター内で調節・維持していると考えられた。

抗原投与後に関しては、DNFB 塗布マウスのクラスター内においては、定常状態と比較し、DC サブセットの存在比率が変化していた。また、クラスター内 DC は、定常状態より、また、クラスター外 DC より MHC class II 分子の発現が上昇、すなわち活性化していた。これらの結果から、定常状態のクラスターを構成する DC と抗原投与時の DC は明らかな違いがあり、共存する T 細胞に与える影響も異なる事が考えられた。

3) クラスターに存在する T 細胞サブセット

KikGR マウス骨髄細胞に置換された骨髄キメラマウスを用いた解析から、定常状態のクラスター内には CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、さらには Treg が存在した。上記の DC のサブセットの結果も合わせて、定常状態のクラスターではこれらの T 細胞サブセットが維持されていると考えられ、舌下免疫療法のメカニズムにつながるものと考えている。

さらに、舌下に抗原刺激を行うとクラスターを構成する T 細胞の存在比率が変化した。上述の抗原投与による DC サブセットの変化と共に、定常状態と、特異抗原に対する免疫応答を誘導した場合は、クラスター内で維持される T 細胞が異なる事が考えられた。

4) 舌下粘膜から DC の所属リンパ節への移動

定常状態 KikGR マウスの舌下粘膜面に紫光を照射し、舌下粘膜に存在する細胞を KikGR-green 陽性から KikGR-red 陽性に変換した。24 時間後、所属リンパ節である顎下リンパ節に存在する DC を FCM で解析したところ、KikGR-red 陽性 DC、すなわち舌下粘膜から移動してきた DC が顎下リンパ節に存在した。

抗原として DNFB を、また、OVA を CT と共に舌下粘膜に塗布した場合、同様の実験系で DC の移動を確認している。

5) 所属リンパ節から舌下面へのリンパ球の移動

舌下粘膜への抗原投与 3 日後に所属リンパ節へ紫色光を照射し、細胞を KikGR-Red にマークして 24 時間後に、舌下粘膜と共に他のリンパ組織への細胞の移動の検出を試みた。その結果、他のリンパ組織への細胞移動は検出できたが、舌下粘膜への移動は検出できなかった。

6) クラスター内での抗原特異的 T 細胞の検出

研究の方法 8) で記載した手法で、実験を行ったが、クラスター内で tdTomato 発現細胞は検出出来ていない。条件を変更して実施する予定である。

さらに、クラスターの形成や役割の分子レベルでの解明のため単細胞遺伝子解析を予定していたが、着手には至らなかった。

結論として、マウスの舌下粘膜面のクラスター内には、Treg、非 TregCD4 陽性細胞に加え、CD8T 細胞が存在し、それぞれに抗原提示能がある DC が共存した。一方で、抗原刺激により、このクラスターを構成する T 細胞、DC のサブセットが変化することから、クラスターは定常状態における、また、侵入抗原に対する免疫調節機構を担っていることが強く示唆された。さらに、舌下粘膜から所属リンパ節への細胞移動が確認され、局所に加え全身性の免疫応答誘導メカニズムの端緒を検出できた。

当初の予想に反した実験結果とともに、感染症の蔓延により研究活動に大きな支障が生じ、当初予定していた成果を十分に果たすことが出来なかったが、舌下粘膜のクラスターを中心にして、舌下免疫応答の一端を解明できたと考えている。

Takamura, S. Niches for the long-term maintenance of tissue-resident memory T cells. *Frontiers in Immunology* **9**, doi: 10.3389/fimmu.2018.01214 (2018).

Tanaka, Y. et al. Oral CD103 - CD11b + classical dendritic cells present sublingual antigen and induce Foxp3 + regulatory T cells in draining lymph nodes. *Mucosal Immunology* **10**, 79–90 (2017).

Miyanaga, N. et al. Essential role of submandibular lymph node dendritic cells in protective sublingual immunotherapy against murine allergy. *Communications Biology* **3**, doi: 10.1038/s42003-020-01466-3 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kusumoto Y., Kaisho T., Hemmi H., Katakai T., Honda T., Kikuta J., Kataoka K., Moriya T., Ishii M., Kabashima K., Tomura M.o
2. 発表標題 Sublingual dendritic cell(DC)-T cell clusters and distribution of DCs in the oral cavity
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kusumoto Y., Kaisho T., Hemmi H.,Moriya T., Tomura M
2. 発表標題 Detailed analysis of dendritic cells (DCs) and T cell subsets comprising sublingual clusters DC - T cell clusters (SDTCs)
3. 学会等名 第14回寄生虫感染免疫研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 戸村道夫
2. 発表標題 舌下樹状細胞(DC)-T細胞クラスターと口腔内のDCの分布
3. 学会等名 第8回先進イメージング医学研究会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楠本豊、片岡宏介
2. 発表標題 DC-cluster formation in sublingual mucosa by sublingual immunization
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田尚子、楠本豊、小川大将、有村綾菜、重春舞、山元純哉、西村実紗、西居亜希子、守屋大樹、戸村道夫
2. 発表標題 舌下面への抗原投与による舌下粘膜における樹状細胞クラスターの形成誘導
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠本 豊、片岡宏介
2. 発表標題 口腔粘膜における樹状細胞とそのクラスターの分布
3. 学会等名 第60回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018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	戸村 道夫 (Tomura Michio) (30314321)	大阪大谷大学・薬学部・教授 (34414)	
研究分担者	片岡 宏介 (Kataoka Kosuke) (50283792)	大阪歯科大学・歯学部・准教授 (34408)	
研究分担者	守屋 大樹 (Moriya Taiki) (30759759)	酪農学園大学・獣医学群・助教 (30109)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	安達 貴弘 (Adachi Takahiro) (50222625)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授 (12602)	

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