

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11085

研究課題名(和文) 経口ワクチン接種時のパイエル板における粘膜免疫誘導機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms related to the induction of mucosal immunity in Peyer's patches against oral vaccine

研究代表者

瀧澤 智美(橋爪智美)(HASHIZUME-TAKIZAWA, Tomomi)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：50419785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：効果的な経口投与型ワクチン開発への手助けとなるような知見を得るために、経口投与型ワクチンに対する腸管の抗原特異的分泌型IgA抗体応答誘導メカニズムについての解析を行った。これまで、弱毒化した組換え型サルモネラをワクチン抗原として用いて、経口投与した場合、抗原特異的IgA抗体応答を誘導するためにはパイエル板が必要であるとの結果を得ていたが、本研究では特にパイエル板のB細胞がカギとなる働きをしていることがin vitro実験系で示された。

研究成果の概要(英文)：We assessed mechanisms of the induction of antigen (Ag)-specific intestinal secretory (S)IgA antibody (Ab) responses against orally administered vaccines in order to provide helpful information that will aid in the development of an effective mucosal vaccine. Our previous study showed that Peyer's patches (PP) are required for the induction of Ag-specific intestinal SIgA Ab responses to oral attenuated recombinant Salmonella vaccine strain. In this study, we further showed that PP B cells play specific roles for the induction of Ag-specific mucosal IgA Ab responses in vitro.

研究分野：感染免疫学

キーワード：経口ワクチン 組換え型サルモネラ 分泌型IgA パイエル板

1. 研究開始当初の背景

重篤な感染症が世界的に流行し致命率が高く社会的に大問題となっている。また、生活習慣病でもある歯周病や齲蝕によって歯を喪失し Quality of Life の低下や咀嚼機能不全が認知症につながる恐れもある。このような感染症に対抗できる有効性の高いワクチンの開発が急務であると考えられる。経粘膜投与型ワクチンは投与に注射針が不要であり、全身免疫と粘膜免疫両方を誘導できることから発展途上国を含めた全世界で今後広い活用が期待される。より有効な、病原体特異的な防御抗体を産生可能なワクチンの開発へ一助となるために、消化管における抗原特異的抗体応答誘導メカニズムの解明を行うことは非常に意義があると考えられる。

これまで、申請者らは弱毒化した組換え型サルモネラに破傷風毒素の無害な部分であるフラグメント C を発現させた組換え型サルモネラ (r*Salmonella*-Tox C) をワクチン抗原として用いて、経口投与し、抗原特異的抗体応答誘導における各リンパ組織の役割について解析を行っている。腸管の抗原特異的分泌型 IgA 抗体応答を誘導するためにはパイエル板が必要であると報告している (Hashizume et al., 2008)。さらに、弱いガンマ線を照射しパイエル板の B 細胞領域や T 細胞領域を破壊したマウスに無処理のマウスから分離してきたパイエル板細胞を移入したところ、パイエル板の組織構築が再形成され、抗原特異的腸管 IgA 抗体応答が誘導された。以上の結果から、パイエル板の組織構築 (B 細胞領域、T 細胞領域) が経口投与された r*Salmonella*-Tox C に対する腸管の IgA 抗体応答誘導には重要であることが示唆された。これらの結果を踏まえ、本研究ではさらに細胞レベルでの解析を行った。

2. 研究の目的

本研究は、有効な経口ワクチンの開発に一助となるような知見を得るため、消化管における抗原特異的 IgA 抗体応答誘導メカニズムの解明を目的としている。これまで、経口投与した r*Salmonella*-Tox C に対する腸管 IgA 抗体応答誘導にはパイエル板組織の存在が不可欠であると報告し、さらに、パイエル板のリンパ組織構築が必要であるという結果を得ているが、リンパ球自体は全身のリンパ組織、血液、リンパ管を繰り返し巡回し常に移動している。そこで、本研究では、これまでの結果を踏まえ、脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板中の各免疫担当細胞 (T 細胞、B 細胞、樹状細胞) が抗原特異的腸管 IgA 抗体応答誘導にどのような役割を果たしているかについて詳細な解析を加える。パイエル板の組織構築に加えて、パイエル板由来細胞が重要なのか、或はどのリンパ組織のどの免疫担当細胞が抗原特異的 IgA 抗体応答誘導に重要であるのかを解明することはワクチン開発の上でも非常に意義があると考えられる。

3. 研究の方法

ナイーブマウスの脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板から CD4 陽性 T 細胞、B220 陽性 B 細胞をソーティングし、あらかじめ r*Salmonella*-Tox C を経口投与したマウスの脾臓、パイエル板から CD11c 陽性樹状細胞を分離し、それぞれ様々な組み合わせで共培養し、上清中に産生分泌された破傷風毒素 (TT) 特異的 IgA 抗体レベルを ELISA 法で解析した。また、共培養後の非接着細胞を回収し TT 特異的 IgA 産生細胞数を ELISPOT 法で定量した。さらに、パイエル板には高い割合で表層 IgA 陽性 B 細胞が存在していることから、B 細胞を表層 IgA 陽性 B 細胞と表層 IgA 陰性 B 細胞に分けて分離し、それぞれのサブセットについて TT-特異的 IgA 抗体応答が誘導されるかどうか検討した。まず予備実験として磁気細胞分離システムである IMag (現有) を用いて細胞を分離し傾向を調べた後、FACS Aria を用いて各細胞サブセットをソーティングし共培養実験を行った。

4. 研究成果

(1) 各組織由来免疫担当細胞の働き

単核細胞についての解析

ナイーブマウスの脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板から単核細胞を分離し、また、あらかじめ r*Salmonella*-Tox C を 7 日前と 2 日前に経口免疫したマウスの脾臓、パイエル板から単核細胞を分離し、樹状細胞エンリッチメントカクテル抗体を加えて 30 分静置しネガティブセレクションにより CD11c 陽性樹状細胞を回収した。脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板由来の単核細胞と感作させた樹状細胞をそれぞれ共培養すると、パイエル板由来の単核細胞を含んだ培養系で TT-特異的 IgA 抗体が産生された (図 1)。一方、脾臓、腸間

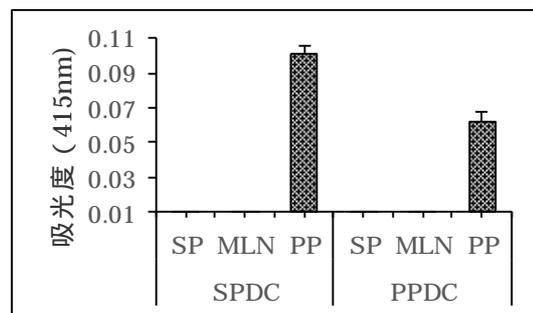


図 1 TT 特異的 IgA 抗体応答

膜リンパ節から分離した単核球は TT 特異的 IgA 抗体を産生しなかった。さらに、パイエル板由来単核細胞が含まれた培養系では樹状細胞の由来が脾臓であるかパイエル板であるかは関係なく TT 特異的 IgA 抗体が誘導された (図 1)。

リンパ球についての解析

ナイーブマウスの脾臓、腸間膜リンパ節、パイエル板から単核球を分離し、ビーズ標識

抗 CD4 抗体、ビーズ標識抗 B220 抗体を加えて 30 分静置した後、IMag システムを用いて CD4 陽性 T 細胞、B220 陽性 B 細胞をポジティブセレクションした。またあらかじめ *r Salmonella*-Tox C を経口免疫したマウスの脾臓、パイエル板からネガティブセレクションにより樹状細胞濃縮フラクションを回収した。それぞれ、様々な組み合わせで脾臓、腸間膜リンパ節、脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞、及び B220 陽性 B 細胞と感作済みの脾臓或はパイエル板由来の樹状細胞共培養したところ、パイエル板の B220 陽性 B 細胞を含んだ培養系で TT 特異的 IgA 抗体が産生された。つまり、パイエル板由来の B220 陽性 B 細胞が含まれた培養系では T 細胞の由来、樹状細胞の由来に関係なく TT 特異的 IgA 抗体を誘導した。一方、腸間膜リンパ節、脾臓由来の B220 陽性 B 細胞を含んだ系では TT 特異的 IgA 抗体を産生しなかった。

表層 IgA 陽性 B 細胞についての解析

TT 特異的 IgA 抗体応答誘導にはパイエル板所属の免疫担当細胞の中で B220 陽性 B 細胞が特徴的な役割を果たしている可能性が示唆されたことから、次にパイエル板に高い割合で存在している表層 IgA 陽性 B 細胞の関与について解析した。Biotin 標識 IgA 抗体をナイーブマウスのパイエル板から分離した単核細胞に加え、ビーズ標識 streptavidin をさらに加え IMag システムでポジティブセレクションした。同時にナイーブ CD4 陽性 T 細胞を分離し、また *r Salmonella*-Tox C 免疫マウスから分離したパイエル板樹状細胞と共に共培養した。その結果、表層 IgA 陽性 B 細胞を含んだ培養系で TT-特異的 IgA 抗体が産生された。表層 IgA 陰性 B 細胞を含んだ培養系では TT 特異的 IgA 抗体応答が少し検出された。

FACSAria によるセルソーティングを用いた解析

現有の IMag システムでは細胞分画の精度に限界があるため、FACSAria を使用してセルソーティングを行った。表層 IgA 陽性パイエル板細胞およびパイエル板 CD4 陽性 T 細胞と、感作済みのマウスから分離したパイエル板 CD11c 陽性樹状細胞を FACSAria でソーティングし共培養したところ、表層 IgA 陽性パイエル板細胞を含んだ培養系で TT 特異的 IgA 抗体を産生する傾向にあった。

(2)まとめ

以上の結果から免疫担当細胞の中でパイエル板由来の表層 IgA 陽性サブセットを含んだ B 細胞サブセットが抗原特異的腸管 IgA 抗体応答誘導に特有の役割を果たしている可能性が示唆された。これらの結果は粘膜免疫システムの解明に貢献することが期待され、粘膜ワクチンの開発への一助となると考える。今後は、表層 IgA 陰性細胞について解析していく。また、in vitro で得られた結果が in vivo でも一致するとは

限らない点を考慮し、in vivo でパイエル板 B 細胞の役割について解析していく。

<引用文献>

Hashizume, T., Togawa, T., Nochi, T., Igarashi, O., Kweon, MN., Kiyono, H., Yamamoto, M., Peyer's patches are required for intestinal immunoglobulin A responses to *Salmonella* spp., *Infect. Immun.*, 76:927 - 934, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hashizume-Takizawa, T., Yamamoto, M., Toll-like receptor 5 is not essential for the promotion of secretory immunoglobulin A antibody responses to flagellated bacteria, *Microbiol. Immunol.*, (査読有), 59:716-723, 2015

Hashizume-Takizawa, T., The Vaccine Potential of Heat-killed Attenuated Strain of *Salmonella*, *Int. J. Oral-Med. Sci.*, (査読有), 14:54-60, 2015

〔学会発表〕(計 2 件)

Hashizume-Takizawa, T., Surface IgA⁺ Peyer's patch B cells play key roles for induction of recombinant *Salmonella*-derived antigen-specific intestinal IgA antibody responses, 第 46 回日本免疫学会, 2017, 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

Hashizume-Takizawa, T., Fujihashi, K., McGhee, JR., Kurashima, Y., Shibata, N., Kiyono, H., Kurita-Ochiai, T., Peyer's patch B cells play distinct roles for induction of antigen-specific intestinal IgA antibody responses against orally administered recombinant *Salmonella*, 18th International Congress of Mucosal Immunology, 2017, Washington D.C. (USA)

〔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

瀧澤 智美（橋爪智美）

(HASHIZUME-TAKIZAWA, Tomomi)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：5 0 4 1 9 7 8 5