

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：84420

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07504

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Peripheral immune protection against mucosal 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 ワクチン・アジュバント研究センター・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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、性感染症を引き起こすことが知られている性器ヘルペス (Herpes simplex virus-2; HSV-2) 感染に対する生体防御機構の解明を目指しており、ウイルスが頻繁に複製することにより患者の QOL を著しく低下させることが問題となっている。また、他の性感染症を誘導する病原体の侵入や病態発現に大きく関与しており、宿主の生体防御機構の仕組みを理解することが新たな治療方法の開発に繋がると考えられる。本研究は、ウイルス産物の発現解析やメモリー T 細胞の機能解析を行い、粘膜組織で重要な役割を果たす組織局在型 CD4 陽性メモリー T 細胞の特徴の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) is known to cause genital herpes by recurrent activation. So far, effective vaccine against HSV-2 is not available. Towards developing vaccines to prevent HSV transmission and disease, a clear understanding of the mechanism by which immune responses are mediated within the relevant mucosal sites is necessary. Until now, we have found that tissue-resident memory T cells (TRM) form the cluster "memory lymphocyte clusters (MLC)" beneath mucosal epithelium in mouse model of attenuated HSV immunization and HSV+ patients. In the present study, we performed RNA-sequencing analysis to identify virus transcript in vaginal tissues following HSV-2 infection. In addition, we analyzed viral antigen which is recognized by CD4+ TRM in vaginal tissue following HSV-2 infection. The data in this study clearly provide further important evidence to dissect the effector function of CD4+TRM in the near future.

研究分野：粘膜免疫学

キーワード：組織局在型メモリー T 細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

性感染症 (STI; Sexual transmitted infection) は、生殖器官の粘膜を通してウイルスや病原微生物が感染することによって生じる。HIV (Human Immunodeficiency Virus) により引き起こされる AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) や単純ヘルペスウイルス 2 型 (Herpes simplex virus type 2; HSV-2) に代表されるように、長期にわたる慢性感染が主である。

これまで試験された全てのヘルペスワクチンは、ワクチンに対する特異的 T 細胞や抗体反応が誘導されるにも関わらず、実際にはワクチン効果がほとんど得られないという結果が示されている。

粘膜免疫制御機構の中でも、特に組織局在型メモリー T 細胞の役割が注目されている。従来、CD4 陽性メモリー T 細胞は絶えず血中を循環し、病原体に再び暴露された後速やかに血中から組織へ浸潤し、特定の病原体を監視する細胞と考えられていた。申請者は、先の研究で、HSV-2 をマウスに感染後 1 週間で腔粘膜組織に集積してくる CD4 陽性メモリー T 細胞に注目し、感染 5 週間後に腔粘膜組織に長期間局在する CD4 陽性メモリー T 細胞が組織局在型であり、抗ウイルス機能を長期間維持していることを明らかにした。具体的には、HSV-2 感染 5 -13 週間後のマウス腔粘膜組織に CD4 陽性メモリー T 細胞や抗原提示細胞を中心としたリンパ節様組織：メモリーリンパ球クラスターが形成されること、メモリーリンパ球クラスターには HSV-2 特異的で T 細胞受容体 Vbeta1 を発現する CD4 陽性メモリー T 細胞が特に凝集していること、IFN-gamma を速やかに産生できる抗ウイルス機能を維持していることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究は、HSV-2 腔粘膜感染後、メモリーリンパ球クラスターがどのようにして維持されているのか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、メモリーリンパ球クラスターが形成されている組織にウイルス産物が長期間維持されているのか、さらにはどのようなウイルス由来抗原を認識する CD4 陽性メモリー T 細胞が局在しているのか解析した。

#### 1) HSV-2 腔感染後の腔粘膜組織における HSV-2 ウイルス産物の解析

HSV-2 弱毒株をマウス腔粘膜組織に感染 5,14,21,49 日後、腔粘膜組織から total RNA を調製し、Hi-Seq2500 を用いて網羅的遺伝子解析を行った。

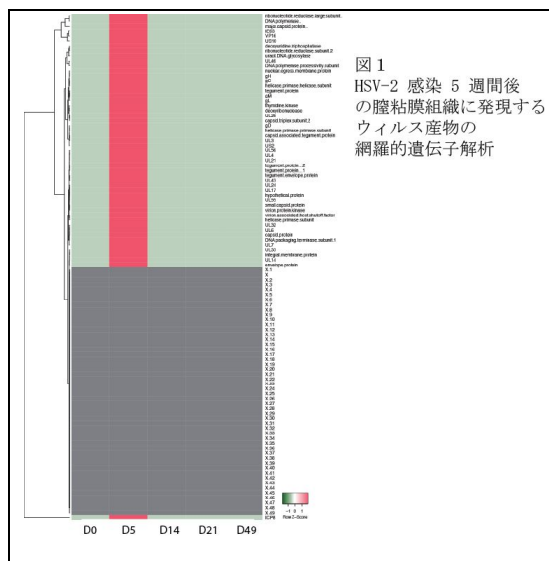
#### 2) HSV-2 腔感染 5 週間後の腔粘膜組織に局在する CD4 陽性メモリー T 細胞が認識するウイルスタンパク質の探索

HSV-2 弱毒株をマウス腔粘膜組織に感染 5 週間後、局在する CD4 陽性メモリー T 細胞がウイルス抗原に反応するか IFN-gamma 産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。

### 4. 研究成果

HSV-2 感染後に腔粘膜組織に形成されるメモリーリンパ球クラスター形成維持機構を解析するために、研究の方法に記載した実験から下記の成果を得た。

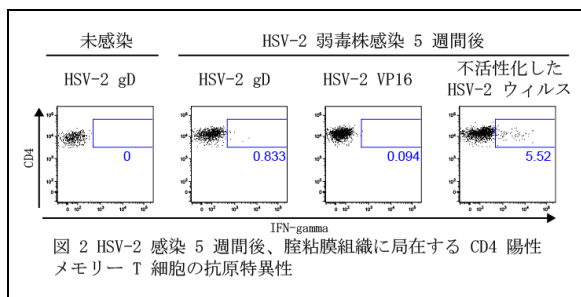
HSV-2 弱毒株感染 5, 14, 21, 49 日後の腔粘膜組織に発現する遺伝子を網羅的に解析した。特に、ウイルス由来の遺伝子発現の解析を遂行した。その結果、感染 5 日後には多くのウイルス由来遺伝子が検出されたが、感染 14, 21, 49 日後にはウイルス由来遺伝子がほとんど検出されなかった (図 1)。以上の結果から、HSV-2 弱毒株感



染 5 週間後に形成される組織局在型 CD4 陽性メモリー T 細胞の維持にウイルス由来産物が関与していない可能性が示唆された。

次に、メモリーリンパ球クラスターに局在する CD4 陽性メモリー T 細胞の機能解析を行うため、HSV-2 腔感染 5 週間後の腔粘膜組織を酵素消化により単個細胞浮遊液を調製した。その後、ウイルス抗原 gD または VP16 リコンビナントタンパク質と共に培養し、IFN-gamma 産生する CD4 陽性メモリー T 細胞をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、gD に反応して IFN-gamma を産生する CD4 陽性メモリー T 細胞が検出され、腔粘膜組織に長期間局在していることが示唆された (図 2)。一方で、VP16 に反応して IFN-gamma を産生する CD4 陽性メモリー T 細胞はほとんど検出されなかった (図 2)。また、ポジティブ

コントロールとして用いた不活性化 HSV-2 を添加した場合に、IFN-gamma を産生する CD4 陽性メモリー T 細胞が検出された (図 2)。以上の結果から、



ある特定のウイルス抗原特異的 CD4 陽性メモリー T 細胞が腔粘膜組織に長期間局在していることが明らかとなった。本研究から、CD4 陽性メモリー T 細胞が長期間腔粘膜組織に維持されるためには、ウイルス由来の産物の関与は低いことが示唆された。それ故、抗原提示細胞や CD4 陽性メモリー T 細胞の相互作用に関わる接着分子やサイトカインを介した維持機構のさらなる解析が必要であると考えられる。このような組織局在型 CD4 陽性メモリー T 細胞は、HSV-2 で再感染後早期に、粘膜上皮に感染した HSV-2 の複製を抑制し、ウイルスが粘膜組織から神経組織へと移行するのを完全に阻害することを明らかにしている。今後、このようなメカニズムにおいて、腔粘膜組織に長期間維持される CD4 陽性メモリー T 細胞が維持されるメカニズムとエフェクター機能を発揮する末梢組織粘膜制御機構のさらなる解明が進むことが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Shimada S, Ebina Y, Iijima N, Deguchi M, Yamada H. Decidual CD68+ HLA-DR+ CD163- M1 macrophages increase in miscarriages with normal fetal chromosome. *Am J Reprod Immunol*. 査読あり, Epub 2017 Dec 2. DOI: 10.1111/aji.12791.
- (2) Ebina Y, Shimada S, Deguchi M, Maesawa Y, Iijima N, Yamada H. Divergence of helper, cytotoxic, and regulatory T cells in the decidua from miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 査読あり, 76(3):199-204, 2016, DOI: 10.1111/aji.12546.
- (3) Iijima N & Iwasaki A. Access of protective antiviral antibody to neuronal tissues requires CD4 T-cell help. *Nature*. 査読あり,

533(7604):552-556, 2016, DOI: 10.1038/nature17979.

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) Iijima N Peripheral immune protection against genital herpes infection. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim AIDS Panel, Shenzhen, China, January 10-11, 2018 (Oral)
  - (2) Iijima N Peripheral immune protection against mucosal herpes infection. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 5-8, 2017 (Invited)
  - (3) 飯島則文 性器ヘルペスウイルス感染に対する末梢組織免疫制御機構の解明 第 28 回 日本生体防御学会学術総会, (6/29/2017-7/1/2017) 相模女子大学グリーンホール (招待講演)
  - (4) Iijima N Peripheral immune protection against mucosal herpes infection. The RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology, June 22-23, 2017, Tokyo, Japan (Invited)
  - (5) 飯島則文 性器ヘルペス感染を制御する生体防御機構の仕組み第 14 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 (招待講演), 2017
  - (6) Iijima N Peripheral immune protection in the peripheral tissues against mucosal herpes infection. The American Association of Immunologists, AAI ANNUAL MEETING May 12-16, 2017, (Washington DC, USA)(Invited)
  - (7) Iijima N Peripheral immune protection in the peripheral tissues against mucosal herpes infection. 東京大学医科学研究所 共同拠点研究事業 平成 28 年度若手研究者シンポジウム 2017 年 2 月 17 日, 東京大学医科学研究所 (招待講演)
  - (8) Iijima N Access of protective antiviral antibody to neuronal tissues requires CD4 T-cell help. Neuroimmune Communication in Health&Disease Gordon Research Conference, 2017 年 1 月 15-20 日, Ventura, CA, USA (Oral)
  - (9) Iijima N Peripheral immune protection in the peripheral tissues against mucosal herpes infection. 日本免疫学会学術集会・総会 2016 年 12 月 5-7 日, 沖縄 那覇 (ポスター)
- 〔図書〕(計 6 件)

- (1) 飯島則文 石井健 免疫学コア講義改訂4版 第25章 ワクチン南山堂 262-268 2017年11月15日
- (2) 飯島則文 組織局在型メモリー T細胞による生体防御機構の重要性 Update Review 羊土社 実験医学 Vol. 35, No.9 (6月号) 1504-1509, 2017
- (3) 飯島則文 性感染症を発症する病原体に対する生殖器バリアの重要性 羊土社 実験医学増刊号 生体バリア研究 Up-to-date 「第二章-8 生殖器バリアと疾患」 Vol 35- No.7 5月発行 147-154
- (4) 飯島則文 子宮頸癌ワクチンとアジュバント 『次世代アジュバント開発のためのメカニズム解明と安全性評価』 297-303 シーエムシー出版書籍 (2017年3月発行)
- (5) 飯島則文 メモリーリンパ球クラスターに局在するメモリーCD4陽性T細胞の重要性 羊土社「感染・炎症・免疫」45巻4号 Page 344-349 (2016年1月発行)
- (6) 飯島則文 感染防御に働く抗ウイルス抗体が神経組織へ移行するためには CD4陽性T細胞のヘルプが必要である 科学評論社 臨床免疫・アレルギー科 66(6): 633-640, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: CD4 T cells provide access to antibody in neuronal tissues  
 発明者: Akiko Iwasaki Norifumi Iijima  
 権利者: Akiko Iwasaki Norifumi Iijima  
 種類: 用途特許  
 番号: OCR 6953  
 出願年月日: 2016年3月4日  
 国内外の別: 国外

取得状況(計 1 件)

名称: Compositions and Methods of Vaccination  
 発明者: Akiko Iwasaki, Haina Shin, Norifumi Iijima  
 権利者: Akiko Iwasaki, Haina Shin, Norifumi Iijima  
 種類:  
 番号: Docket No. 47162-5125-00; U.S. 603959; OCR 6227  
 取得年月日: 2014年12月5日  
 国内外の別: 国外

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯島 則文 (Norifumi Iijima)

医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センター サブプロジェクトリーダー  
 研究者番号: 40612552

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

奥崎 大介 (Daisuke Okuzaki)  
 大阪大学微生物病研究所 遺伝情報実センター ゲノム解析室 助教  
 研究者番号: 00346131

常木 雅之 (Masayuki Tsuneki)  
 昭和大学歯学部口腔病理学部門・助教  
 研究者番号: 40714944