

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02831

研究課題名(和文) 経皮ウイルス感染に対する生体防御機構の概日リズムの解析

研究課題名(英文) Analysis for the circadian rhythm of host defense system against the cutaneous viral infection

研究代表者

川村 龍吉 (KAWAMURA, Tatsuyoshi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：70262657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はウイルスワクチン接種による抗ウイルス免疫に概日リズムが存在するのか、すなわち「ワクチンは何時に接種すると効果的か？」を解明することを目的とした。マウスにherpes simplex virus (HSV)抗原を経皮的に接種した。このワクチンをマウスにおける活動期と休止期に接種したところ、活動期にワクチンを接種した群でより優れたワクチン効果が確認された。以上のことから「抗ウイルスワクチンは活動期に接種することが望ましい」ということが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19)パンデミックに直面している我々に対して現在ワクチンの接種が進められている。COVID-19に対するワクチンは現在のところmRNAワクチンが使用されているため今回の研究とは直接的に関連しないが、抗ウイルスワクチンは1日のうち何時に接種するのが最も強い抗ウイルス免疫を誘導するのかが分かっていない。今回、我々はマウスにヘルペスウイルス抗原を用いたワクチンを行い、ヒトの日中(活動期)にワクチンを接種した方が夜間(休止期)に接種するより優れたワクチン効果が期待されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study sought to determine whether vaccine-induced anti-viral immunity is regulated by circadian rhythm. Specifically, this study sought an answer to the question "What time should we receive vaccine for the best efficacy?". To this end, mice were intradermally inoculated herpes simplex virus (HSV) antigen in either active or resting phase. The better vaccine efficacy was observed in mice who received vaccine in their active phase. These data might provide a following answer: anti-viral vaccine should be inoculated in active phase.

研究分野：免疫

キーワード：ワクチン 概日リズム ヘルペスウイルス 抗ウイルス免疫

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2017年のノーベル生理学・医学賞は、「サーカディアン・リズム（体内時計）を生み出す遺伝子とそのメカニズム」が選ばれた。近年、生体の概日リズムをつかさどる時計遺伝子がアレルギー性疾患などの様々な疾患と密接に関連していることが明らかとなりつつある。最近我々は、朝あるいは夜に単純ヘルペスウイルス（HSV）をマウス皮膚に接種すると、両群の感染症状や死亡率が大きく異なるという知見を得た。本研究の目的は、研究対象を様々な皮膚関連ウイルス群に拡大し、ウイルスが経皮的に生体に侵入する時間帯により宿主の生体防御反応に差異が認められるか、すなわちウイルスに対する自然免疫・獲得免疫に概日リズムが存在するかを網羅的に検討することにある。本研究による皮膚の「時間ウイルス学」確立に向けた新たな試みは、感染予防学の観点から、あるいは抗ウイルス薬による時間差治療・より有効なワクチン接種法開発の観点からも、臨床医学的に重要な意義があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、様々な皮膚関連ウイルス（HSV, HIV, Measles virus, Japanese encephalitis virus など）に対する宿主の自然免疫および獲得免疫によるウイルス排除能に概日リズムが存在するか否かについて検討することにある。本研究は今後のウイルス感染防御戦略に新しい方向を与えるものであり、トランスレーショナルリサーチ研究として、新規治療・予防法開発の基盤となりうる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種皮膚関連ウイルスの主要抗原に対する宿主免疫応答の概日リズムの検討

各ウイルスセンサーによる認識経路の outcome は IL-1 $\beta$ 、IFN- $\beta$  産生のいずれかに集約される。そこで、これらの皮膚関連ウイルスおよび実際に現在ワクチンが存在するウイルスの各主要抗原の皮内接種時間による自然免疫・獲得免疫惹起に日内変動があるか否かについて網羅的に検討する。まず、これらのウイルス群の主要抗原をマウス皮膚に異なる時間に皮下注射し、IFN- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの自然免疫サイトカインあるいは TNF- $\alpha$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生に概日リズムが存在するかについて検討する。さらに、時計遺伝子（Per2、Clock）欠損マウスにおいても同様の実験を行なう。また、皮膚自然免疫に関与する細胞群：ケラチノサイト、ランゲルハンス細胞、樹状細胞、肥満細胞をマウス皮膚より経時的に調整し、どの細胞のサイトカイン産生に概日リズムが存在するかを検討し、時計遺伝子欠損マウスより調整した各細胞についても同様の実験を行う。

#### (2) 各種皮膚関連ウイルスの主要抗原に対する宿主獲得免疫応答の概日リズムの検討

HSV に対する宿主防御の概日リズムに獲得免疫応答によるウイルス排除が関与している可能性が考えられる。そこで、各種皮膚関連ウイルス群の主要抗原をマウス皮膚に異なる時間帯に皮下注射し、皮内接種時間によってリンパ節内のウイルス特異的 CTL 数に違いがあるか否かについて経時的に比較検討する。さらに、異なる時間帯に各種ウイルス群の主要抗原を皮内接

種したマウス皮膚よりランゲルハンス細胞および真皮樹状細胞を調整し、naive CD4+T 細胞あるいは CD8+T 細胞と共培養し、HSV 特異的 T 細胞を誘導する。1 週間培養後、各種ウイルス群の主要抗原ペプチドにて再刺激し、CTL 誘導能をフローサイトメトリーで比較する。さらに、CD4+T 細胞をそれぞれ IL-17-, IL-22-, FoxP3-, IL-10-intracellular staining にて解析し、各種ウイルス特異的 Th17, Th22, Treg, Tr-1 誘導能を比較する。

### (3) ヒト皮膚を用いた HSV/HIV 感染後の宿主自然免疫・獲得免疫応答の概日リズムの検討

マウス皮膚で観察された概日リズムがヒト皮膚でも存在するかを調べるため、HSV, HIV の初期感染ターゲット細胞であるケラチノサイトおよびランゲルハンス細胞の HSV/HIV 感染性における概日リズムの存在を検討する。まず、ボランティアの表皮水疱蓋より得た表皮シートに HSV-2/HIV を異なる時間帯で曝露し、HSV 感染ケラチノサイト数, HSV/HIV 感染ランゲルハンス細胞数をそれぞれ免疫染色/FACS を用いて経時的にモニタリングし、両細胞群における HSV 感染性の概日リズムを検討する。さらに、ヒト正常表皮シートから経時的にケラチノサイト/ランゲルハンス細胞の浮遊細胞を調整し、ウイルス認識に関与する PRRs について、RT-PCR 法を用いて時計遺伝子発現との発現相関について検討する。また異なる時間帯に HSV/HIV を曝露した表皮シートから経時的にケラチノサイト/ランゲルハンス細胞の浮遊細胞を調整し、それぞれの細胞群からの自然免疫サイトカイン産生に概日リズムが存在するかを免疫染色・FACS を用いて経時的にモニタリングし、両細胞の抗ウイルス自然免疫応答に概日リズムが存在するかを検討する（表皮細胞群の概日リズムを同調にはウマ血清を用いる）。

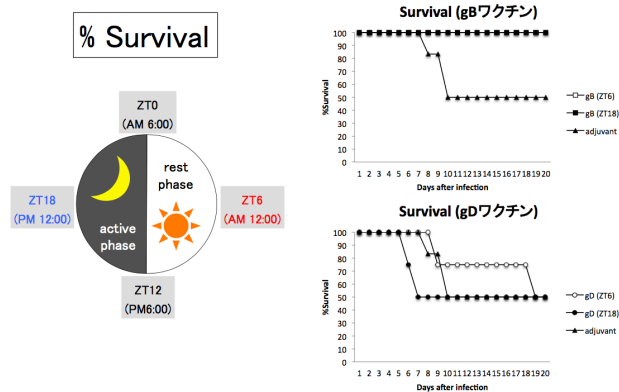
また、獲得免疫応答の評価として、異なる時間帯に経表皮的に HSV/HIV を曝露した全層皮膚から遊走したランゲルハンス細胞あるいは樹状細胞の浮遊細胞を調整し、naive CD4+T 細胞あるいは CD8+T 細胞と共培養し、特異的 CTL, Th17, Th22, Treg, Tr-1 誘導能を比較検討する。

## 4. 研究成果

### (1) ワクチンの接種時間によって抗ウイルス免疫に差が生じるか？

2 種類の HSV エンベロープ糖蛋白 (gB, gD) を抗原とし、各種アジュバントと共にマウスに比内注射し、HSV 獲得免疫が誘導されるかについて、条件検討を行った。

HSV 抗原としては gB が gD より免疫誘導能に優れており、また MPL, alum を特定の比率で混合したアジュバントを 2 週間おきに 2 回筋注することで、ワクチン接種後の経皮的な HSV 感染症状が抑制されること (HSV に対する獲得免疫が誘導されること) を確認した (右図)。



次に、gB ワクチンを昼 12 時 (ZT6)、夜 12 時 (ZT18) に上記条件で接種し、その後 HSV を経皮感染させ、感染症状を皮疹スコア、麻痺スコアで評価した。皮疹スコアは、抗原なし群 (コ

ントロール群)：平均 4、ZT18 投与群：平均 0.5、ZT6 投与群：平均 2 であり、ワクチンの効果は ZT18 が ZT6 よりも約 2 倍増強していた。麻痺スコアは抗原なし群 (コントロール群)：平均 1.67、ZT18 投与群：平均 0.25、ZT6 投与群：平均 1 であり、ワクチンの効果は ZT18 が ZT6 よりも約 4 倍増強していた。以上のことから ZT18 投与群は ZT6 投与群よりも、皮疹スコア、麻痺スコアいずれもワクチンの効果が増強 (より強力な HSV 獲得免疫が誘導されること) が明らかとなった。したがって、HSV ワクチンによる宿主獲得免疫応答に概日リズムが存在することが判明した。

### (2) HSV ワクチンはなぜ活動期に接種すると強い抗ウイルス免疫を誘導するのか？

HSV 特異的 CD8+T 細胞を GFP で追跡可能な gB 特異的 CD8 TCR をトランスジェニックされた gB-I mice を用いた。WT mice に gB-I CD8+T 細胞を移入し、その後 gB ワクチンを ZT6 および ZT18 に接種し、HSV を経皮的に感染させた。ZT18 群では ZT6 群と比較して、リンパ節・脾臓・神経節周囲・HSV 接種部皮膚における GFP+ gB-I CD8+T 細胞の集積が有意に増強しており、より活性化した effector memory T 細胞の surface phenotype を示した。それを反映して、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  といった Tc1 サイトカイン産生、また perforin, granzyme B といった cytotoxic molecule の産生も増強していた。このことから HSV ワクチンは活動期に接種することで強い CTL を誘導する概日リズムが存在することが判明した。

現在、時計遺伝子 (Per2、Clock) 欠損マウスを用いて同様の実験を行っており、Per2 欠損あるいは Clock 欠損マウスにおいては上記で記載した活動期ワクチン接種における強い CTL 誘導、抗 HSV 免疫応答の概日差が消失するという知見を得ている。

### (3) ヒトにおいても HSV の感染性に概日リズムは存在するのか？

マウス皮膚で観察された概日リズムがヒト皮膚でも存在するかを調べるため、HSV の初期感染ターゲット細胞であるケラチノサイトおよびランゲルハンス細胞の HSV 感染性における概日リズムの存在を検討した。健常ボランティアの表皮水疱蓋より得た表皮シートに HSV-2 を異なる時間帯で曝露し、HSV 感染ケラチノサイト数、ランゲルハンス細胞数をそれぞれ免疫染色 FACS を用いて経時的にモニタリングしたところ、日中に HSV に感染させたケラチノサイト、ランゲルハンス細胞においてより多くの HSV 感染が確認され、ヒトにおいても HSV 感染に概日リズムが存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	小川 陽一  (OGAWA Youichi)  (20377542)	山梨大学・大学院総合研究部・講師    (13501)	

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