

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09872

研究課題名（和文）上下気道粘膜免疫における経年的免疫応答動態の解析

研究課題名（英文）Analysis of mucosal immune responses in airway system by aging

研究代表者

平野 隆（Hirano, Takashi）

大分大学・医学部・講師

研究者番号：20305056

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）：加齢による無莢膜型インフルエンザ菌の外膜タンパク質（OMP）の経鼻免疫に対する上気道粘膜免疫応答を解析した。マウス（5週齢、6か月齢、1年齢）に、OMP経鼻免疫前後に中耳、鼻粘膜、鼻関連リンパ組織、頸部リンパ節、および脾臓から単核細胞を収集し、フローサイトメトリーによってT細胞の分化を解析した。加齢に伴いCD3陽性T細胞がリンパ組織で減少し、メモリーT細胞比は増加し、ナイーブ細胞比は減少した。免疫後の解析では、加齢により上気道粘膜およびリンパ組織でのメモリーT細胞比の増加、エフェクターT細胞比の低下を認めた。上気道粘膜およびリンパ組織におけるOMPに対するT細胞免疫応答は加齢により減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児のみならず高齢者を含めて、無莢膜型インフルエンザ菌は上気道のみならず下気道においても感染症を発症する起炎菌であり、鼻咽腔におけるインフルエンザ菌の定着が発症の引き金になりうるということが推測されている。このような背景からインフルエンザ菌ワクチンの開発は、小児のみならず高齢者においても急務であり重要な意義を持つものと思われる。加齢に伴って局所から全身免疫系を含めたT細胞における免疫応答機能が低下し、感染抵抗性が低下することはよく知られている。今回、加齢に伴う上気道粘膜免疫応答をT細胞含めた免疫応答について解析することにより、インフルエンザ菌粘膜ワクチン開発への応用につなげることが可能となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed changes of mucosal immune responses in upper airway by aging against outer membrane protein (OMP) from nontypeable *Haemophilus influenzae*, focusing on the differentiation of T cells. Mice (5 weeks, 6 months, 1 year old mice) were vaccinated with OMP and cholera toxin three times seven days apart. Mononuclear cells were collected from middle ear, nasal mucosa, nasal associated lymphoid tissue, cervical lymph node, and spleen to analyze T cell differentiation by flow cytometry at day 7 after the immunization. Non-immunized mice at each age were served as a control. In CD4-positive T cells, the memory T cell ratio was increased in upper airway mucosa in young mice after the immunization, and also, the effector T cell ratio was increased markedly in lymphoid tissues in young mice after the immunization. It was suggested that the T cell immune responses against OMP in the upper airway mucosa and lymphoid tissues may decrease by aging.

研究分野：上気道粘膜免疫

キーワード：インフルエンザ菌 粘膜免疫 加齢 上気道粘膜 T細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在のワクチンの投与方法の多くは皮下接種や筋肉内注射であり、IgG 抗体を中心とした全身免疫系の賦活を図るものである。他の投与方法として、近年開発されているものが、経口、経鼻、経舌下投与を主体とした粘膜ワクチンであり、本来、上気道や消化管には分泌型 IgA を主役とする粘膜局所免疫が備わっており、抗原の粘膜投与により賦活されるが、経口投与では、パリエル板などの消化管関連リンパ組織(GALT)を、経鼻投与では鼻咽腔関連リンパ組織(NALT)を経由して 2 型 helper T 細胞が誘導され、TGF β 、IL-5、IL-6 といったサイトカインが分泌され抗原特異的 IgA 抗体が粘膜局所において産生されるようになる。粘膜ワクチンは国内では使用されているものはなく、以前、国内にて使用されていた経粘膜ワクチンとして、経口ポリオ生ワクチンがあげられる。このワクチンは弱毒化したポリオウイルスを経口投与し、咽頭や腸管にて増殖させることにより、分泌型 IgA 産生を誘導し、全身免疫系を刺激し IgM、IgG 中和抗体を産生させることが知られており、不活化ポリオワクチン筋注と比較してポリオ患者が激減したことが知られているが、ワクチン関連麻痺を認めたことから不活化ポリオワクチンのみが使用されている。他にも海外においては経鼻噴霧型の弱毒生ワクチンが使用されており、2003 年以来アメリカやヨーロッパで一般的に使用されており、2016 年にはアメリカの Centers for Disease Control and Prevention(CDC)から同ワクチンを接種推奨リストから取り下げられたものの、2018 年から再び接種推奨リストに挙げられている。本ワクチンがインフルエンザウイルスに対する特異的 IgA 産生を誘導し、広範囲なインフルエンザ strain に対しても有効性を持つことは報告されている。このように経鼻免疫は、経鼻的に投与された抗原と粘膜アジュバントが獲得免疫系を賦活化することにより上気道粘膜に効率的に免疫応答を誘導しうる方法である。しかし、上気道粘膜免疫は加齢に対する免疫応答の影響が少ないと報告されているが、インフルエンザ菌に対するワクチン療法に対して加齢による影響の報告は少ない。

2. 研究の目的

上気道や消化管に感染をもたらす病原体に対して粘膜ワクチンは現在も有効な免疫賦活する手段であると考えられる。実際に、マウスモデルを用いたインフルエンザ菌外膜蛋白を用いた経鼻粘膜免疫応答について当科において報告しており、経鼻免疫により鼻汁、唾液、肺胞洗浄液中の抗原特異的 IgA の上昇、血清中抗原特異的 IgG の上昇を認め、脾臓から採取した CD4 陽性 T 細胞を抗原刺激することにより、サイトカイン産生能が増加することを報告している。しかし、加齢に伴って局所から全身免疫系を含めた T 細胞における免疫応答機能が低下し、感染抵抗性が低下することはよく知られている。今回、同様の実験系を用いて、マウスに対してインフルエンザ菌外膜蛋白の経鼻免疫を施行し、中耳～鼻粘膜などの上気道粘膜免疫応答の経年的変化について、T 細胞の分化を中心に解析を行った。

3. 研究の方法

動物：SPF 下にて飼育した、雄性、BALB/c マウス 5 週齢、6 カ月齢、1 年齢を用いて検討した。
経年的マウス：加齢に伴う変化を見るため無処置であるマウス (各群 n=5) から、中耳骨胞、鼻粘膜、鼻粘膜関連リンパ組織(NALT)、頸部リンパ節(CLN)、脾臓(SPL)を採取し、中耳骨胞(MEM)や鼻粘膜(NP)はコラゲネース type IV による処理を行い、NALT、頸部リンパ節、脾臓などのリンパ組織はスチールメッシュにて細砕し単核球を採取した。鼻粘膜由来単核球は比重遠沈法にて分離採取している。

経鼻免疫マウスモデル：無莢膜インフルエンザ菌 strain76 由来の外膜蛋白(OMP) 10 μ g と粘膜アジュバントとしてコレラトキシン 1 μ g をリン酸緩衝液(PBS)に溶解し OMP 溶液(10 μ l)を調製した。OMP はインフルエンザ菌を培養後に EDTA 溶液に 56 $^{\circ}$ C にて 30 分培養した後に、氷温下に超音波にて細胞膜を破碎し遠沈処理を行い抽出している。各マウス(n=5)に OMP 溶液を週 1 回計 3 回経鼻投与を行った。投与終了後 7 日目に、中耳骨胞、鼻粘膜、鼻粘膜関連リンパ組織、頸部リンパ節、脾臓を採取し同様の検討を行っている。

フローサイトメトリーによる解析：前方散乱光シグナル(FSC)と側方散乱光シグナル(SSC)を基にリンパ球が存在する領域にゲートをかけ、各組織から採取した単核球を蛍光標識した FITC 標識抗マウス CD3a 抗体、Pacific Blue 標識抗マウス CD4 抗体、APC-Cy7 標識抗マウス CD8a 抗体、PE 標識抗マウス CD44 抗体、PE-Cy7 標識抗マウス CD62L 抗体 (全て BioLegend 社、CA、USA) を用いて単核球を染色し、CD4 陽性ヘルパー T 細胞の分化については、CD3 陽性 CD4 陽性細胞にゲートを囲み、CD44^{high}CD62L^{low} 細胞をメモリー T 細胞、CD44^{low}CD62L^{low} 細胞をエフェクター T 細胞として同定し、CD44^{low}CD62L^{high} 細胞をナイーブ T 細胞として同定検討を行った。

統計学的解析：Kruskal-Wallis 検定により多群間比較を行い、p<0.05 を持って有意差があると判定している。また、有意差を認めた多群間においては Steel-Dwass 検定による多重比較検定を行い、p<0.05 の有意差を認めた群間に有意差があると判定している。また経鼻免疫有無における比較は Mann-Whitney 検定を行い、p<0.05 の有意差を認めた群間に有意差があると判定している。

4. 研究成果

(1) Tリンパ球の分布

フローサイトメトリーによる各組織由来単核球における T リンパ球領域の解析において、実行組織である中耳および鼻粘膜においては、CD3 陽性 T 細胞は加齢に伴い増加傾向があるものの、誘導組織である頸部リンパ組織や脾臓において、CD3 陽性細胞比率は加齢に伴い減少傾向を認められた(図 1)。OMP 経鼻免疫後においても同様の傾向であり、中耳粘膜においては CD3 陽性 T 細胞の増加を認め、鼻粘膜では増加傾向を認めた。リンパ組織においては頸部リンパ節では加齢に伴う減少を認めた。リンパ組織においては組織学的所見と類似した傾向を認めている。

(2) 粘膜組織における Tリンパ球分画および CD4 陽性 T 細胞の分化

粘膜組織(実行組織)における T 細胞動態について示す。鼻粘膜における T 細胞動態について示す。OMP 非投与時では、CD4+T 細胞比率は加齢に伴い低下する傾向を認め、CD4-CD8-T 細胞比率が増加を認めた。また OMP 経鼻投与により、5 週齢マウスの CD4+T 細胞比率が有意に高率となり、CD4-CD8-T 細胞比率も加齢に伴い優位に増加した状態を認めた。また CD4 陽性 T 細胞の分化において、加齢に伴いメモリー T 細胞比率が増加傾向、および ナイーブ T 細胞比率の減少傾向を認めたが、OMP の経鼻免疫により 5 週齢でのメモリー T 細胞比率の著明な増加を認め、1 年齢ではエフェクター T 細胞比率が明らかに低下していた(図 2)。しかし、中耳粘膜において T リンパ球の分画および CD4 陽性 T 細胞の分化において加齢に伴う特徴的な変化を認めず、OMP 経鼻投与においても加齢による影響は一定していなかった(図 3)。

(3) リンパ組織における Tリンパ球分画および CD4 陽性 T 細胞の分化

リンパ組織(誘導組織)における T 細胞動態について示す。NALT では鼻粘膜と同様に加齢に伴い CD4+T 細胞比率が低下し、CD4-CD8-T 細胞比率の増加を認めた。OMP 経鼻免疫前後において、T リンパ球の分画における経年的変化は軽微であった。また CD4 陽性細胞における T 細胞分化の傾向は全体としてナイーブ T 細胞比率が最も高値であるものの、加齢に伴い減少する傾向を認めた。OMP 経鼻免疫後において、メモリー T 細胞比率は加齢に伴い全体的に増加傾向を認め、エフェクター T 細胞やナイーブ T 細胞比率は低下傾向を認めた(図 4)。頸部リンパ節では NALT と同様に加齢に伴い CD4+T 細胞比率が低下傾向を認め、CD4-CD8-T 細胞比率の増加を認めた。OMP 経鼻免疫後においても同様であった。CD4 陽性細胞における T 細胞分化は全体としてナイーブ T 細胞比率が最も高値であるが、OMP 経鼻免疫後において、メモリー T 細胞比率は加齢に伴い全体的に増加し、加齢に伴いエフェクター T 細胞比率が減少した(図 5)。次に、脾臓における経年的変化は局所リンパ組織と若干反応が異なり、6 カ月齢マウスにおいて CD4+T 細胞比率が最も高値であり、経年的な CD4-CD8-T 細胞の変化は乏しかった。OMP 経鼻免疫後においても、T リンパ球の分画における経年的変化は軽微であった。OMP の経鼻免疫後では、5 週齢マウスではエフェクター T 細胞比率は増加するが、加齢に伴い反応性は減弱しており、メモリー T 細胞比率は加齢に伴い全体的に増加傾向を認め、ナイーブ T 細胞比率は加齢に伴い減少傾向を認めた(図 6)。

今回、マウスに対してインフルエンザ菌外膜蛋白の経鼻免疫を施行し、中耳～鼻粘膜などの上気道粘膜免疫応答の経年的変化について、T 細胞の分化を中心に解析を行った。誘導組織である頸部リンパ組織や脾臓において、経年的に T 細胞比率は減少傾向を認め、T 細胞分画においても上気道粘膜組織とリンパ組織において加齢に伴い CD4+T 細胞比率が低下傾向を認めた。また、CD4+T 細胞の分化においても、OMP の経鼻免疫により上気道粘膜およびリンパ組織において、加齢に伴いエフェクター T 細胞比の低下を認めており、各リンパ組織においては加齢に伴いメモリー T 細胞比率の増加とナイーブ T 細胞比率が減少する傾向を認めた。しかし、中耳粘膜における経年的変化は乏しかった。加齢に伴い、鼻粘膜を中心とした上気道粘膜およびリンパ組織においても T 細胞免疫能の応答性低下が示唆された。

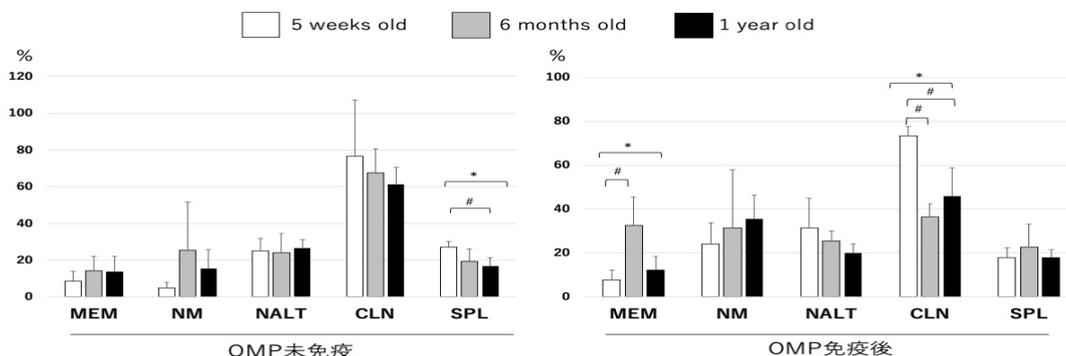


図 1 : リンパ球領域における CD3 陽性細胞比率

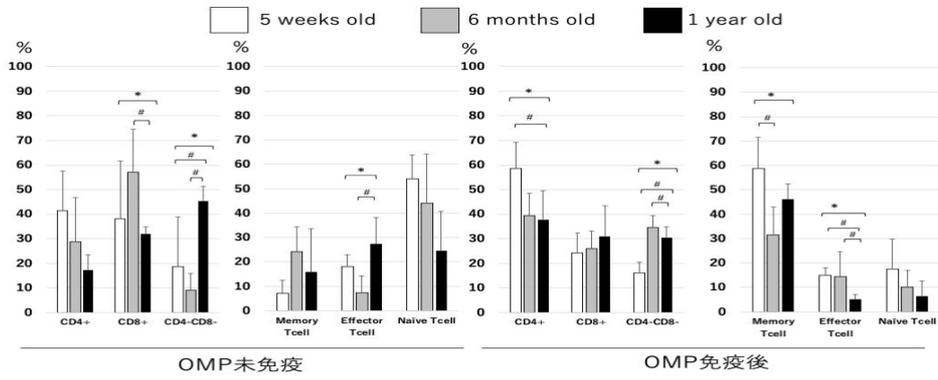


図 2 : 鼻粘膜組織における T 細胞分画および T 細胞分化

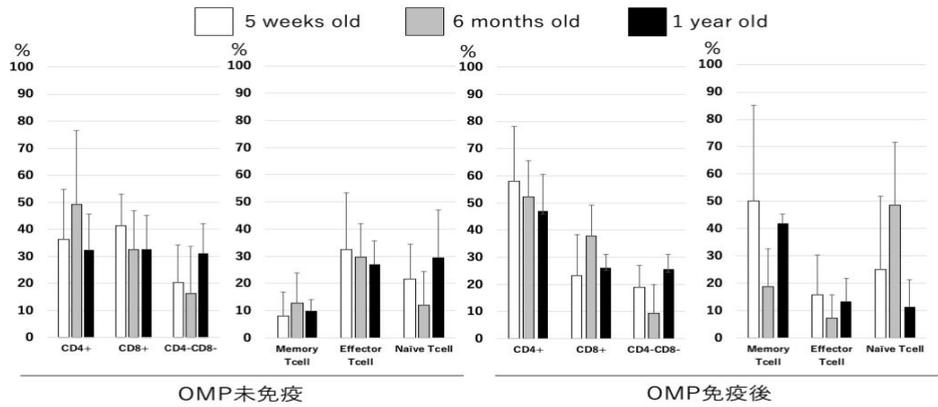


図 3 : 中耳粘膜における T 細胞分画および T 細胞分化

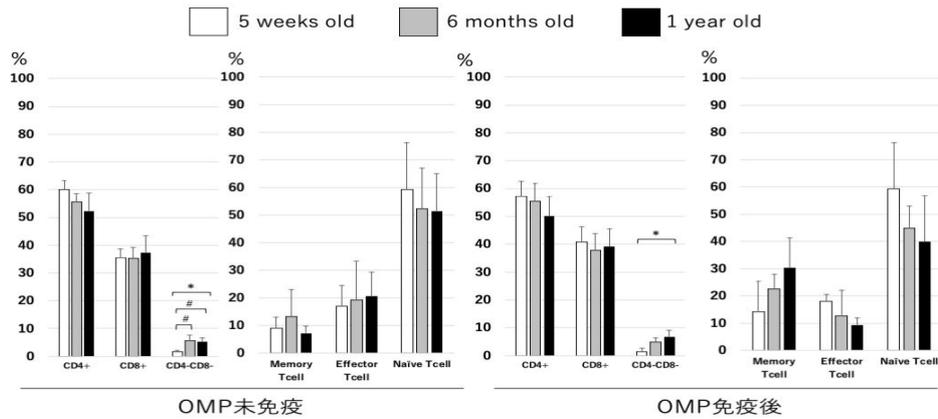


図 4 : 鼻粘膜関連リンパ組織 (NALT) における T 細胞分画および T 細胞分化

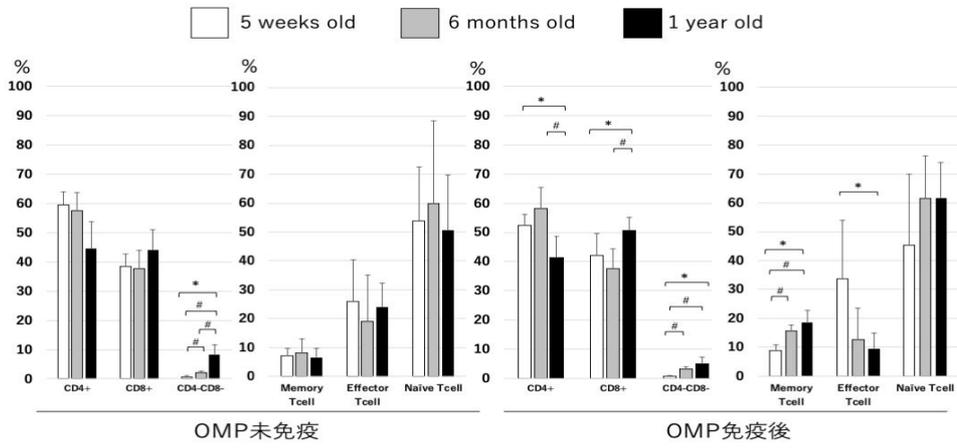


図 5 : 頸部リンパ節における T 細胞分画および T 細胞分化

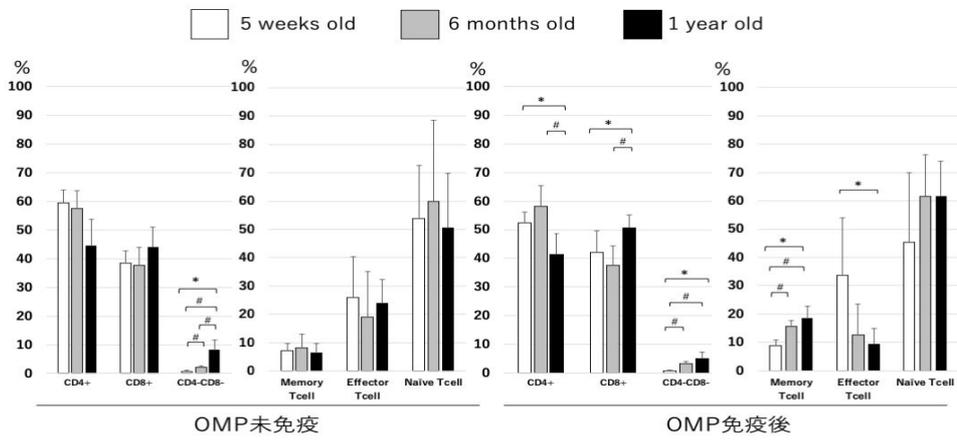


図 6 : 脾臓における T 細胞分画および T 細胞分化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 平野 隆, 川野 利明, 松永 崇志, 吉永 和弘, 門脇 嘉宣, 梅本 真吾, 鈴木 正志	4. 巻 1
2. 論文標題 インフルエンザ菌に対する経年的上気道粘膜免疫応答の変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー感染症学会誌	6. 最初と最後の頁 165-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24805/jiaio.1.3_165	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 Takashi Hirano, Toshiaki Kawano, Takayuki Matsunaga, Kazuhiro Yoshinaga, Shingo Umemoto, Munehito Moriyama, Masashi Suzuki.	4. 巻 1
2. 論文標題 Aging affects the mucosal immune responses against outer membrane proteins from nontypeable Haemophilus influenzae.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of 5th rhinology research forum in Asia,	6. 最初と最後の頁 52-55
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Hirano, Toshiaki Kawano, Kazuhiro Yoshinaga, Takayuki Matsunaga, Masashi Suzuki
2. 発表標題 Effect of aging on mucosal immune responses against nontypeable Haemophilus influenzae in upper airway
3. 学会等名 21st INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN OTITIS MEDIA (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平野 隆、川野利明、松永崇志、吉永和弘、鈴木正志
2. 発表標題 加齢に伴う経鼻粘膜ワクチン投与における上気道免疫応答の解析
3. 学会等名 耳科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野 隆、川野利明、梅本真吾、松永崇志、吉永和弘、門脇嘉宣、鈴木正志
2. 発表標題 加齢に伴う上気道粘膜免疫応答の解析
3. 学会等名 第29回 日本耳科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Hirano, Toshiaki Kawano, Takayuki Matsunaga, Kazuhiro Yoshinaga, Munehito Moriyama, Yoshinori Kadowaki, Masashi Suzuki
2. 発表標題 Aging affects the mucosal immune responses against outer membrane proteins from nontypeable Haemophilus influenzae.
3. 学会等名 The 5th Rhinology Research Forum in Asia 2019 (国際学会)
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
研究分担者	安倍 伸幸 (Abe Nobuyuki) (10433054)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	鈴木 正志 (Suzuki Masashi) (60211314)	大分大学・医学部・教授 (17501)	

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
---------	---------