

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：20791204

研究課題名（和文）上気道における CCL20/CCR6 を介する粘膜免疫誘導機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of mucosal immunity inducement system associated CCL20/CCR6 in upper respiratory tract

研究代表者

安倍 伸幸（ABE NOBUYUKI）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10433054

研究成果の概要（和文）：BALB/cマウスに対して卵白アルブミン（OVA）とMIP-3 α /CCL20を経鼻投与を行った。免疫組織学的検討で、NALTに樹状細胞が著明に誘導された。しかし、ELISAの検討ではIgGおよびIgAのOVA特異的免疫応答が誘導されなかった。このことから、MIP-3 α /CCL20は樹状細胞を免疫誘導組織へ誘導することはできるが経鼻ワクチンにおけるアジュバント効果までは有さないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：BALB/c mice were immunized intranasally OVA and MIP-3 α /CCL20. The dendritic cell was induced to NALT in the eminence for an immunohistochemistry. However, OVA specific immune response of IgG and IgA was not induced in the examination of ELISA. It was suggested not to have to the adjuvant effect in the passing nasal vaccine though MIP-3 α /CCL20 was able to induce the dendritic cell from this to the immunity inducement tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

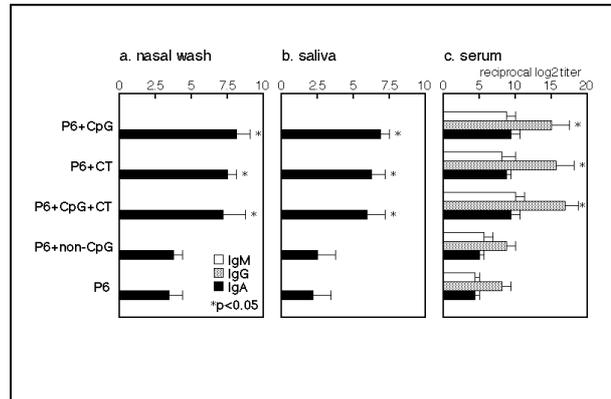
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：鼻科学

1. 研究開始当初の背景

生体は病原微生物の侵入に対して適切な免疫応答を惹起することにより病原微生物の排除を行う。この免疫防御機構には自然免疫応答とそれに引き続く獲得免疫応答がある。樹状細胞はナイーブ T 細胞に抗原を提示し、免疫応答あるいは誘導する主要な抗原提示細胞であり、生体内に広く分布して免疫監視を担う。さらに侵襲性微生物を toll-like receptor (TLR) を介して認識し活性化され、種々のサイトカインを産生して自然免疫応答をも増強する多様な機能を有している。今回注目している樹状細胞の機能として、樹状細胞は末梢組織で病原体や外来抗原を効率良く取り込み、輸入リンパ管を通過して 2 次リンパ節組織に移動し、そこで成熟した抗原提示細胞となることによって免疫応答に必須の役割を果たす。未熟な樹状細胞は CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR6, CXCR4 などを発現し、これらのレセプターに作用するケモカインに反応して遊走する。なかでも CCR6 は未熟樹状細胞で強く発現しており、樹状細胞の末梢組織への遊走と局在に極めて重要なレセプターと考えられている。我々はこれまでこの樹状細胞の機能に着目し、動物実験において樹状細胞による細菌抗原特異的免疫応答の制御について報告している。BALB/c マウスにインフルエンザ菌の外膜蛋白である P6 と樹状細胞を誘導するアジュバントである CpG を 1 週間ごとに 3 回経鼻免疫し、血清、鼻腔洗浄液を採取し ELISA にて P6 特異的抗体価を測定した。P6+CT, P6+CpG, および P6+CT+CpG の経鼻

免疫によってことにより鼻腔洗浄液、唾液中の P6 特異的 IgA 抗体価、血清中の P6 特異的 IgG 抗体価の著明な上昇を認めた(図)。



このことから私は CpG 経鼻投与によって、コレラトキシンと同程度に局所、及び全身に特異的免疫応答を誘導可能であることを明らかにした。また P6 と CpG を同様に経鼻免疫後、24 時間後にインフルエンザ生菌を経鼻的に鼻咽腔に注入しそのインフルエンザ菌のクリアランスを調べた。その結果マウスの鼻咽頭において、コントロール群と比べ有意にインフルエンザ菌を排除し防御効果を明らかにすることができた。このように樹状細胞の機能の理解とその制御により、効果的な経鼻ワクチンによる免疫応答の誘導が期待できると考えている。

2. 研究の目的

粘膜免疫機構は近年、腸管を中心に研究が進められているが、上気道における解析は十分になされておらず未解明の部分が多い。近年、免疫応答の司令塔として、多彩な機能を有することから樹状細胞が注目されている。また最近では、新しい T 細胞サブセットとして制御性 T 細胞が同定され、樹状細胞とも協

調し、免疫応答を制御していることが明らかにされた。本研究の目的は抗原特異的免疫応答における樹状細胞と制御性T細胞との細胞間相互作用の解析を行い、この両者のバランスをうまくコントロールして免疫応答を増幅させ、最終的にはより効果的な経鼻ワクチンへ応用することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) マウス鼻粘膜、NALTの樹状細胞の解析

BALB/cマウスを用いて、まずMIP-3 α /CCL20をマウスに経鼻免疫を行う。その後、マウスの鼻粘膜、NALTを採取し抗B220, 抗CD8 α , 抗CD11b, 抗CD11c, 抗CD4にて免疫組織化学にて解析する。樹状細胞と制御性T細胞の局在、位置関係を明らかにし、MIP-3 α /CCL20による樹状細胞の活性化を組織学的に検討する。

(2) MIP-3 α /CCL20による鼻粘膜免疫応答の解析

マウスに対してT細胞依存性抗原である卵白アルブミン(OVA)とMIP-3 α /CCL20を経鼻的に投与し、鼻粘膜、NALT、脾臓を採取し、抗原特異的免疫応答をELISPOT法、ELISAにて検討する。

(3) MIP-3 α /CCL20による鼻粘膜免疫応答の賦活化と修飾

MIP-3 α /CCL20は樹状細胞走化作用を有している。さらに抗原特異的免疫応答の作用を増強するために、MIP-3 α /CCL20、OVAに樹状細胞を活性化させるアジュバントであるCpGDNAを加えて、マウスに経鼻免疫を行う。抗原特異的免疫応答が誘導されるかについて、ELISPOT法、ELISAにて検討する。Th1/Th2シフトについても、PCRによってIFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-5などのサイトカイン産生パターン

を比較、検討して解析する。

4. 研究成果

(1) BALB/cマウスに対してT細胞依存性抗原である卵白アルブミン(OVA)と経鼻ワクチンのアジュバントとして確立されているコレラトキシン(CT)を経鼻投与しOVAに特異的な免疫応答を得ることができた。次にOVAと樹状細胞走化作用を有するMIP-3 α /CCL20をBALB/cマウスに経鼻投与を行った。免疫組織学的検討で、MIP-3 α /CCL20を4 μ g投与した群においてNALTに樹状細胞が著明に誘導された。



Control

CCL 投与

NALTのCD11cの免疫染色組織にてCCL投与で群で樹状細胞の増加が認められた(矢印)

しかし、採取した血清および鼻腔洗浄液を用いたELISAの検討で、MIP-3 α /CCL20を4 μ g投与した群でIgGおよびIgAのOVA特異的免疫応答が誘導されなかった。このことから、MIP-3 α /CCL20は樹状細胞を免疫誘導組織へ誘導することはできるが経鼻ワクチンにおけるアジュバント効果までは有さないことが示唆された。

(2) そのためOVAとtoll-like receptor 9のリガンドであるCpGとMIP-3 α /CCL20をマウスに経鼻投与した。CpGはアジュバント効果があることが確立されている。するとこの実験では、同様に血清および鼻腔洗浄液を用いたELISAの検討でIgGおよびIgAのOVA特異的免疫応答が誘導された。またELISPOTでは脾臓組織ではOVA特異的免疫応答が誘導できたが鼻粘膜組

織では誘導できなかった。いずれにせよOVAとCpGのみの群とOVAとCpGにMIP-3 α /CCL20を加えた群で有意な差がなく、MIP-3 α /CCL20によってCpGで得られた経鼻ワクチンの効果を増幅させることができなかった。

次年度はMIP-3 α /CCL20の投与量を4 μ gよりさらに増量して検討する必要があると考えた。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

安倍 伸幸 (ABE NOBUYUKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10433054

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし