

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791909

研究課題名（和文）

NKT 細胞による上気道粘膜免疫応答の誘導・制御の解析と経鼻ワクチンへの応用

研究課題名（英文）Mucosal immune response associated with NKT cell activation in nasopharynx for the development of prospective mucosal vaccine

研究代表者

野田 謙二（NODA KENJI）

大分大学・医学部耳鼻咽喉科・助教

研究者番号：90511171

研究成果の概要（和文）：上気道粘膜免疫においてIgAは重要な役割を担っている。今回、インフルエンザ菌外膜の抗原蛋白であるP6とNKT細胞のリガンドである α -ガラクトシルセラミド（ α -GalCer）の経鼻免疫によりNKT細胞の活性化を介して抗原特異的IgAの分泌に必要なTh1/Th2型CD4⁺T細胞が誘導され、P6特異的免疫応答が起こることを明らかにした。これらの実験結果はNKT細胞の活性化による抗原特異的免疫応答の誘導が新しいワクチンストラテジーになる可能性を示唆するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Specific IgA plays an important role in the elimination of pathogen. In this study, we demonstrated that CD4⁺ T cells expressing P6-specific Th1 and Th2 cytokine mRNA, which is important for the induction of the specific S-IgA immune response, were induced after intranasal immunization with P6 and α -GalCer. These findings suggest that nasal vaccination with P6 and α -GalCer might be an effective regimen for mucosal vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000 円	840,000 円	3,640,000 円

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（7309）

キーワード：NKT 細胞、 α -ガラクトクトシルセラミド、経鼻免疫、中耳炎予防ワクチン、P6

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでマウスを用いた動物実験において、インフルエンザ菌外膜蛋白である P6 と α -GalCer による経鼻ワクチンで P6 特異的免疫応答が誘導され、鼻咽腔のレベルでインフルエンザ菌特異的防御免疫が強化されることについて報告した。そのことは、 α -GalCer をアジュバントとした NKT 細胞の活性化による抗原特異的免疫応答が軽微ワクチンとして非常に効率的であることを示唆している。今回、P6 と α -GalCer による経鼻免疫による上気道粘膜免疫の誘導の詳細な

メカニズムについて分子レベル、細胞レベルで明らかにする目的で研究を行った。

2. 研究の目的

（1）P6 と α -GalCer の経鼻免疫による上気道粘膜免疫応答の解析

①マウスに P6 と α -GalCer 経鼻免疫を行い経鼻免疫による CD4⁺T 細胞における抗原特異的な IFN- γ 、IL-2, 4, 5, 6, 10, TGF- β のサイトカイン mRNA の発現を RT-PCR 法について

解析し、抗原特異的分泌型 IgA の誘導に重要な Th1 型、Th2 型の免疫反応について検討する。

②経鼻免疫したマウスの鼻粘膜、脾臓において単核球を分離、培養しフローサイトメトリーにて P6 特異的 Th1 型、Th2 型サイトカイン産生細胞の誘導について検討する。

(2) P6 と α -GalCer の経鼻免疫による NKT 細胞・樹状細胞の動態の解析

①経鼻免疫したマウスの鼻粘膜・NALT について免疫組織化学を行い、組織レベルで樹状細胞の誘導について解析する。

②経鼻免疫したマウスの NALT において単核球を分離しフローサイトメトリーにて NKT 細胞の誘導について検討する。

3. 研究の方法

(1) P6 と α -GalCer の経鼻免疫による上気道粘膜免疫応答の解析

①Feeder cell として免疫していないマウスから単核球を分離し、 γ 線 30Gy を照射する。P6 と α -GalCer で経鼻免疫を行ったマウスから単核球を分離し、さらにマグネティックセルソーター (MACS) にて CD4⁺T 細胞を単離する。Feeder cell と CD4⁺T 細胞を P6 の存在下に 5%CO₂ 下 37°C で 96 時間培養する。培養した細胞から RNA を抽出する (RNeasy Mini Kit を用いる)。抽出した RNA から逆転写にて cDNA を合成する (RT-PCR)。合成した cDNA で PCR を行い、IFN- γ 、IL-2, 4, 5, 6, 10, TGF- β について特異的プライマーを用い増幅させる (TaqMan Universal PCR Master Mix を用いる)。PCR 産物を電気泳動することにより CD4⁺T 細胞における抗原特異的な IFN- γ 、IL-2, 4, 5, 6, 10, TGF- β のサイトカイン mRNA の発現を解析する。また、抗原特異的サイトカイン mRNA を定量する (リアルタイム PCR)。

②P6 と α -GalCer で経鼻免疫を行ったマウスの鼻粘膜および脾臓より単核球を分離する。分離した単核球から 1×10^6 個の細胞浮遊液を調整する。Berfeldin-A の存在下に ionomycin、phorbol myristate acetate (PMA) にて細胞のサイトカイン産生を促進させ、37°C にて 4 時間、細胞を培養する。細胞染色第 1 過程で細胞膜表面抗原 (CD4) を染色する。Perm/fix solution にて細胞膜

透過処理を行い、細胞膜透過性を高める。抗サイトカイン抗体により、細胞内サイトカイン (IFN- γ 、IL-4, 6) を染色する。フローサイトメトリーにてサイトカイン産生細胞数について解析する。

(2) P6 と α -GalCer の経鼻免疫による NKT 細胞・樹状細胞の動態の解析

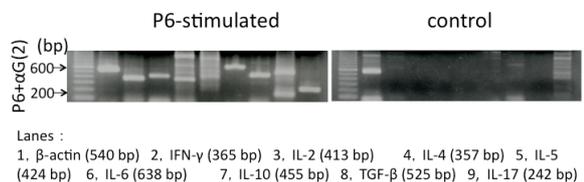
①P6 と α -GalCer で経鼻免疫を行ったマウスを 10%緩衝ホルマリンにて灌流固定する。脱灰後、免疫組織化学用に厚さ 12mm の凍結切片を作製する。内因性ペルオキシダーゼ活性の除去後、5%マウス血清にて非特異的吸着をブロッキングする。抗マウス CD11c 抗体を一次抗体として用いた avidin-biotinylated peroxidase complex (ABC) 法にて免疫染色を行い (Kit ABC Elite を用いる)、DAB 発色にて反応部位を可視化する。

②P6 と α -GalCer で経鼻免疫を行ったマウスの NALT より単核球を分離し、Fc Block 処理を行う。FITC 標識抗マウス CD4 抗体、T-Select Mouse CD1dTetramer-PE (α -GalCer を結合させたもの)、CyChrome 標識抗マウス B220 抗体にて細胞を染色する。フローサイトメトリーにて NKT 細胞数について解析する。

4. 研究成果

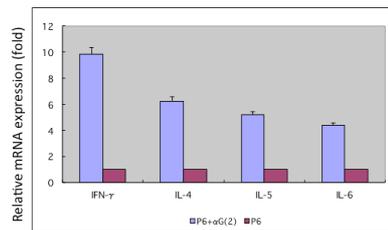
(1) P6 と α -GalCer の経鼻免疫による上気道粘膜免疫応答の解析

①P6存在下に培養したCD4⁺T細胞ではINF- γ 、IL-2, 4, 5, 6, 10, TGF- β のmRNAの発現を認め、P6非存在下に培養したCD4⁺T細胞ではそれらサイトカインmRNAの発現は認めなかった (下図: CD4⁺T細胞におけるP6特異的サイトカインmRNAの発現)。



さらに、リアルタイムPCRでP6と α -GalCer で経鼻免疫したマウスとP6のみで経鼻免疫したマウスの抗原特異的サイトカインmRNA (INF- γ 、IL-4, 5, 6) の発現を比較すると、P6と α -GalCer で経鼻免疫したマウスで抗原特異的

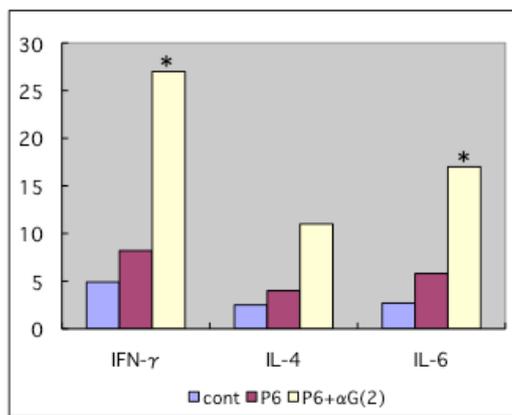
サイトカインmRNAの発現が有意に増加していた（下図）。



The level of cytokine mRNA expression were determined by quantitative RT-PCR. Cytokine mRNA expression was normalized by 18 second ribosomal RNA as the internal reference. These results are expressed as the mean \pm SE. $P < 0.05$ compared with P6 mice.

このことから、P6と α -GalCerの経鼻免疫によりTh1/Th2型サイトカイン産生CD4⁺T細胞が誘導されることが示された。

②P6と α -GalCerで経鼻免疫を行ったマウスではP6のみで経鼻免疫したマウス、コントロールのマウスと比較してINF- γ 、IL-4, 6の産生細胞数の有意な増加が認められた。このことから、P6と α -GalCerの経鼻免疫によりTh1/Th2型サイトカイン産生CD4⁺T細胞が誘導されることが示された（下図：鼻粘膜におけるTh1/Th2型サイトカイン産生細胞数、/10³ cells）。

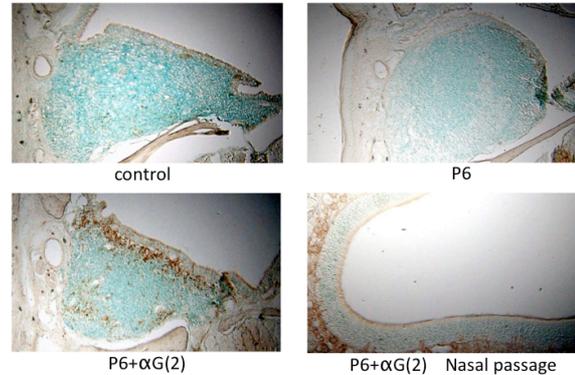


* $P < 0.05$ compared with control group.

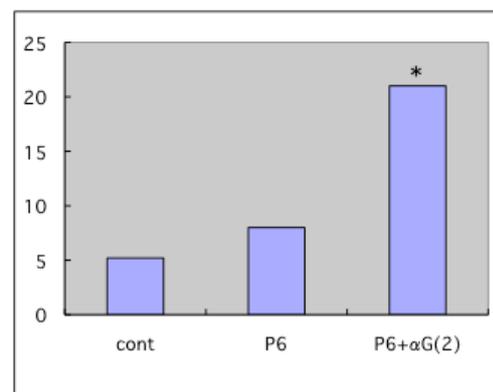
このことから、P6と α -GalCerの経鼻免疫によりCD4⁺T細胞が抗原特異的分泌型IgAの誘導に重要なTh1/Th2型サイトカインmRNAを発現することが示された。

(2) P6と α -GalCerの経鼻免疫によるNKT細胞・樹状細胞の動態の解析

①経鼻免疫によりNALTでの樹状細胞の誘導は促進されていた。鼻粘膜とNALTでの樹状細胞の誘導を比較するとNALTにおいて強く誘導されていた（下図：NALTにおける樹状細胞の発現）。



経鼻免疫によりNALTでのNKT細胞数は有意に増加していた（下図：NALTにおける樹状細胞数、/10³ cells）。



* $P < 0.05$ compared with control group.

このことから、経鼻免疫により抗原特異的免疫応答に重要な樹状細胞が誘導されるが、その誘導の場は主にNALTであること。さらに、樹状細胞とNKT細胞のinter-actionは主にNALTで行われていることが示された。今回の研究ではP6と α -GalCerの経鼻免疫によるインフルエンザ菌特異的防御免疫の誘導の詳細なメカニズムを明らかにした。今回、明らかにした研究結果は中耳炎予防ワクチンの開発に大きく貢献するとともに、今後、粘膜ワクチンに関わる免疫応答の問題や嗅覚や中枢神経系への障害を解決していくことで臨床応用することが期待される。

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 1 件)

Noda K, Kodama S, Umemoto S, Nomi N, Hirano T, Suzuki M. Th17 cells contribute to nontypeable *Haemophilus influenzae*-specific protective immunity induced by nasal vaccination with P6 outer membrane protein and α -galactosylceramide. *Microbiol Immunol* 55 (8): 574-581, 2011.

[学会発表] (計 1 件)

Noda K. Nasal vaccination with α -galactosylceramide induces protective immunity against nontypeable *Haemophilus influenzae* associated with NKT cell activation in the nasopharynx. ISIAN. June 17th, 2012. France.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 謙二 (NODA KENJI)
大分大学・医学部耳鼻咽喉科・助教
研究者番号：90511171

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：