

# ウイルス感染に対する神経組織での免疫制御機構の解明

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所  
アジュバント開発プロジェクト 飯島 則文

## 1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

性感染症を発症する病原体に対する予防的ワクチンは、HPV と HBV を除き、その効果がほとんど認められていない。これまで試験されたヘルペスウイルスワクチンは、ワクチン投与後に被験者の血中でヘルペスウイルスワクチンに対する抗体価や細胞性免疫が誘導されることが報告されている。しかしながら、既存の全てのヘルペスウイルスワクチンは、ヘルペスウイルス感染の予防に全く効果を示していない。それ故、申請者は、ヘルペスウイルスの感染部位である、生殖粘膜組織と神経組織におけるウイルス感染防御機構に着目した。

申請者は、先の研究で、単純ヘルペスウイルスが粘膜感染後、感染部位にリンパ節様組織が長期間形成されること、そして T 細胞が組織局在性を獲得し、抗ウイルス能を長期間維持していること（申請者研究業績 1 & 2）、また抗ヘルペス抗体が神経組織で効果を発揮するには CD4 陽性 T 細胞が必要である知見（申請者研究業績 3）を得ており、粘膜組織および神経組織における免疫制御機構の重要性を示唆する結果である。本研究により明らかになる知見は、性感染症を標的とした新たな予防薬開発の礎となることが期待される。

## 2. 方法

### (1) HSV-2 腔感染 5 週間後の神経組織および腔粘膜組織における HSV-2 ウィルス産物および発現する遺伝子解析

申請者は先の研究から、HSV-2 弱毒株腔感染 5 週間後のマウス腔粘膜組織には、リンパ節様組織メモリーリンパ球クラスター (Memory Lymphocyte Cluster; MLC) が形成されること（申請者研究業績 1 & 2）を発見しており、ウィルス産物を抗原提示細胞が CD4 陽性 T 細胞へ提示している可能性が考えられた。HSV-2 弱毒株腔感染 5 週間後の腔粘膜組織を用いて、ウィルスブランクアッセイ法により HSV-2 ウィルス粒子の検出を試みたが、ウィルス粒子およびウィルスが複製している証拠は得られていない（申請者研究業績 2）。また、HSV-2 腔感染 5 週間後のマウス後根神経節に CD4 陽性 T 細胞が凝集しているか、腔粘膜組織で微量のウィルス産物が発現しているのか現在のところ不明である。

<実験方法>そこで、マウス後根神経節および腔粘膜組織から total RNA を調製して定量的 RT-PCR 法を用いて解析する。ポジティブコントロールとして、HSV-2 腔感染 1 週間後の後根神経節より、RNA を調製してウィルス転写物を検出する。これらの解析の際もし可能であれば、次世代シーケンスを実施し、ウィルス由来および宿主側の遺伝子発現を網羅的に解析する。

### (2) 神経組織における抗ヘルペス抗体を介した生体防御機構における CD4 陽性メモリー T 細胞の役割

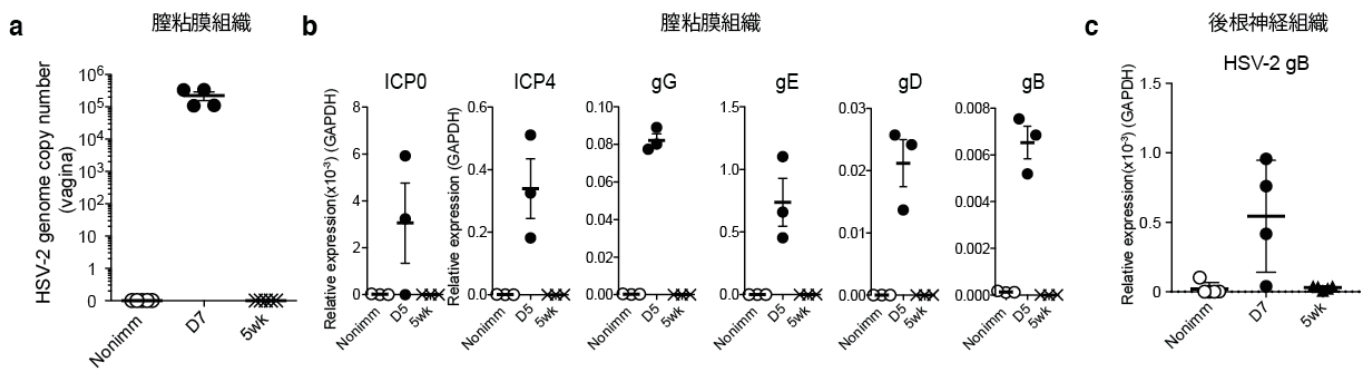
申請者は先の研究から、HSV-2 ワクチン候補薬を経鼻感染 5 週間後、腔粘膜組織に MLC は形成されず、血中を循環する CD4 陽性メモリー T 細胞が分化増殖することを確認している。これらの CD4 陽性 T 細胞が、神経組織で IFN- $\gamma$  を産生することによって血管透過性を上昇させ、抗ヘルペス抗体を神経組織へと透過させることによりウィルス複製抑制に重要な役割を果たすことを明らかにした（申請者研究業績 3）が、実際に CD4 陽性 T 細胞がウィルス複製に役割を果たす神経組織で何が起きているのか全く不明である。

<実験方法>そこで、HSV-2 ワクチン候補薬を経鼻感染 5 週間後、致死量の HSV-2 野生株をマウス腔粘膜に感染させ、後根神経節や脊髄における CD4 陽性 T 細胞の分布について蛍光顕微鏡を用いて観察する。また、神経組織でどのような細胞が IFN- $\gamma$  を産生しているのかフローサイトメトリーを用いて解析を行う。

## 3. 結果 研究成果

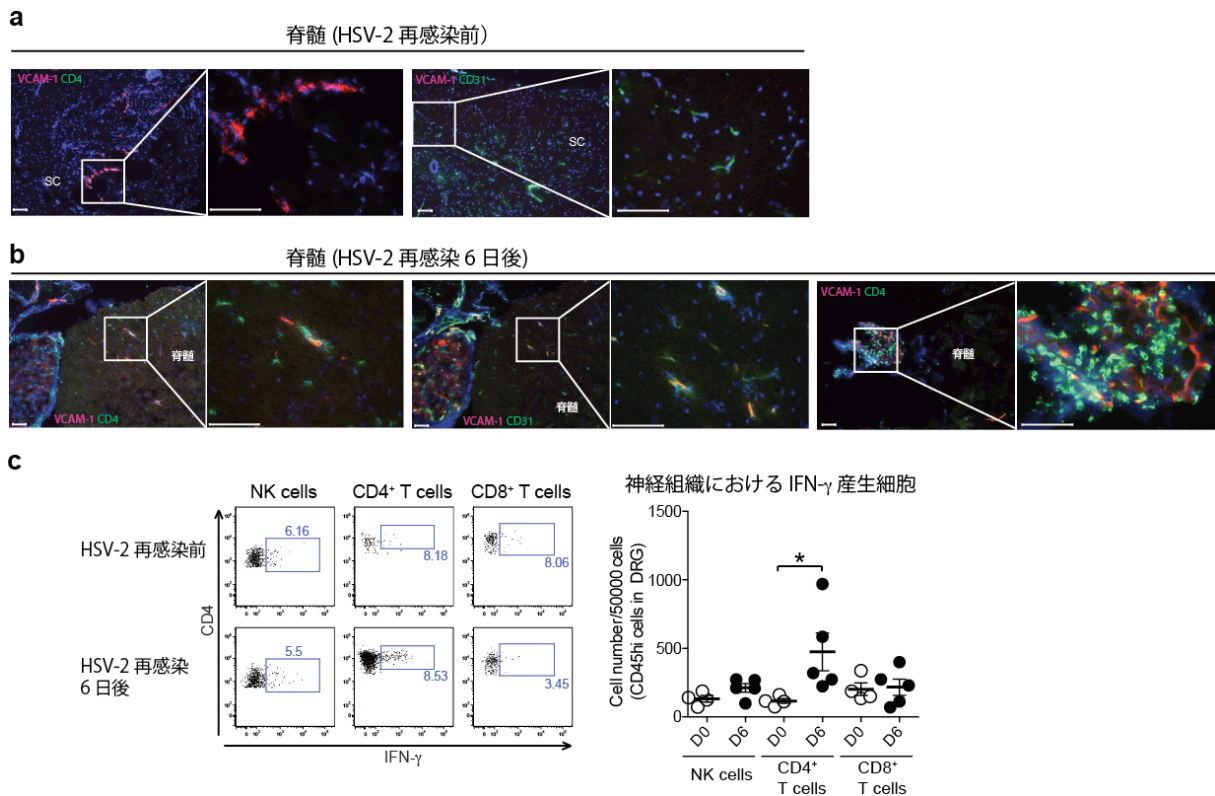
### (1) 神経組織および腔粘膜組織における HSV-2 ウィルス産物の遺伝子発現解析

HSV-2 弱毒株腔感染 5 週間後のマウス後根神経節および腔粘膜組織から total RNA を調製して定量的 RT-PCR 法を用いて解析した (Fig. 1)。その結果、HSV-2 感染 5-7 日後の腔粘膜組織ではウィルス DNA (Fig. 1a) およびウィルス産物 (Fig. 1b) が検出された。しかしながら、感染 5 週間後の腔粘膜組織では、ウィルス DNA およびウィルス産物ともに検出されなかった。また、感染 5 週間後の後根神経組織でもウィルス産物が検出されなかった (Fig. 1c)。現在、次世代シーケンスを実施し、ウィルス由来および宿主側の遺伝子発現を網羅的に解析中である。



(2) 神経組織における抗ヘルペス抗体を介した生体防御機構における CD4 陽性メモリー T 細胞の役割

HSV-2 ワクチン候補薬を経鼻感染 5 週間後、致死量の HSV-2 野生株をマウス膣粘膜に感染させ、脊髄における CD4 陽性 T 細胞の分布について蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、HSV-2 再感染後 6 日で CD31 陽性血管内皮細胞上に VCAM1 の発現上昇が認められた (Fig. 2a & b)。同時に、VCAM1 を発現する血管内皮細胞および脊髄白質に CD4 陽性 T 細胞の流入が認められた。また、HSV-2 再感染 6 日後、神経組織で IFN- $\gamma$  産生細胞をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、CD4 陽性 T 細胞が IFN- $\gamma$  を産生することが明らかとなった。



4. 考察 まとめ

今回、我々は HSV-2 感染部位である膣粘膜組織および免疫学的特権部位である神経組織において、ウィルス感染に対する CD4 陽性メモリー T 細胞の役割を解析した。膣粘膜組織では HSV-2 のウィルスゲノムおよびウィルス産物が検出されないにも関わらず、CD4 陽性メモリー T 細胞が長期間膣粘膜組織に維持されることが示唆された。現在、ウィルス由来および宿主側の遺伝子発現を網羅的に解析中である。また、神経組織では、HSV-2 再感染後 6 日で、CD4 陽性メモリー T 細胞の流入が観察され、CD4 陽性メモリー T 細胞が神経組織内で IFN- $\gamma$  を産生することが明らかとなった。

5. 発表論文、参考文献

1. **Iijima N**, Linehan MM, Zamora M, Butkus D, Dunn R, Kehry MR, Laufer TM, Iwasaki A. Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *J Exp Med*. 2008 Dec 22; 205(13): 3041-3052.
2. **Iijima N**, Iwasaki A. T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science* 2014 346(6205):93-98.
3. **Iijima N**, Iwasaki A. Access of protective antiviral antibody to neuronal tissues requires CD4 T cell help. *Nature* 533(7604): 552-556, 2016.