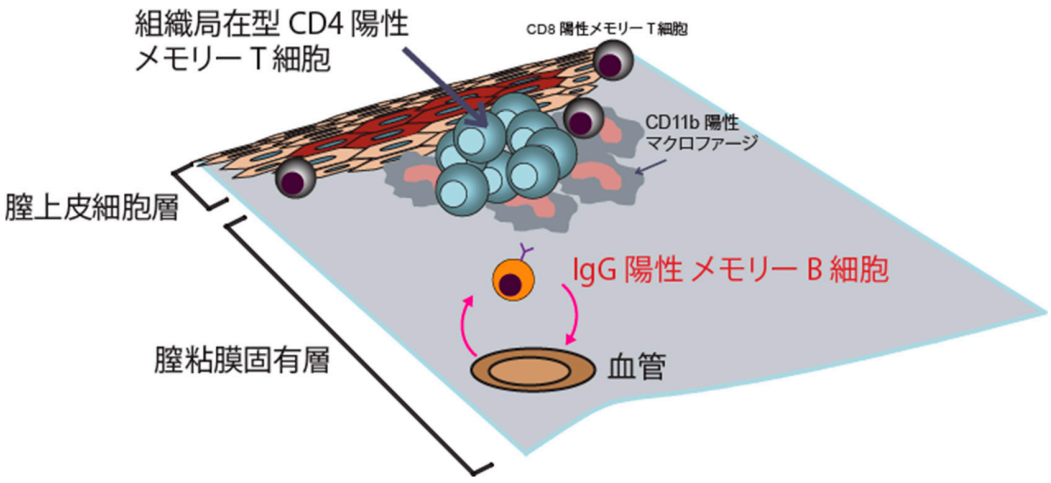
19　感染後早期に粘膜組織に移行するメモリーB細胞の役割	飯島　則文

【目的】粘膜組織より分泌される抗体は、様々な病原体から生体を防御するために重要な役割を果たす。腸管粘膜組織では、形質細胞が抗体分泌を促すが、膣粘膜組織を含む他の粘膜組織では、B 細胞及び形質細胞の重要性は以前不明である。そこで、単純ヘルペスウィルス 2 型（herpes simplex virus type 2：HSV-2）膣感染モデルを用いて、膣粘膜組織における B 細胞の役割を解析することを目的とした。

【方法】HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫 5 週間後、感染部位に CD4 陽性 T 細胞がクラスターを形成することが明らかとなっている。これらのマウスに、HSV-2 野生株を再感染させると、ウィルスの感染部位から神経組織への移行を完全に阻害することを以前に報告している。一方で、HSV-2 弱毒株をマウス膣粘膜組織に免疫後、血液中に CD4 陽性メモリー T 細胞のみならず、HSV-2 特異的抗体やメモリー B 細胞が形成される。しかしながら、膣粘膜組織における役割に関しては不明である。フローサイトメトリー解析や免疫組織染色法により抗体やメモリー B 細胞の局在を明らかにした。

【結果】HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫 5 週間後、膣粘膜組織におけるメモリー B 細胞は、血中から絶えず循環する細胞群であること、メモリー B 細胞は CD4 陽性 T 細胞クラスターに局在していないことが明らかとなった。また、HSV-2 再感染後早期に IgG 陽性メモリー B 細胞が集積することが確認された。

HSV-2 感染後の膣粘膜組織における IgG 陽性メモリー B 細胞の局在



19. 感染後早期に粘膜組織に移行するメモリー B 細胞の役割

飯島　則文

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

Key words：粘膜免疫，B 細胞，IgG

緒　言

単純ヘルペスウィルス 2 型（Herpes simplex virus-2 : HSV-2）は、性感染症を発症する病原体の一つで、現在のところ、HSV-2 を予防するワクチンおよび治療するワクチンは存在せず、根治治療が困難である［1］。

そのため、様々なワクチン候補薬が試験されている段階であるが、申請者はこれまで、HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫後、感染部位に CD4 陽性 T 細胞がクラスターを形成し、HSV-2 を膣粘膜組織に再感染させると、ウィルスの感染部位から神経組織への移行を完全に阻害することを報告している［2］。その後、クラスターに局在する CD4 陽性メモリー T 細胞は、並体結合を用いた解析から、組織に局在する形で粘膜組織に長期間維持されていることを明らかにした。また、CD4 陽性メモリー T 細胞を中心としたクラスターは、CD11b 陽性マクロファージが CCL5 を産生し、クラスターを維持していること、クラスターに局在する HSV-2 特異的 CD4 陽性メモリー T 細胞が HSV-2 再感染後早期に、IFN-γを産生し、ウィルスの除去に大きく貢献していることを明らかにした［3］。以上の結果から、HSV-2 膣粘膜感染に対して、組織局在型 CD4 陽性メモリー T 細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。一方で、HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫後、血液中に CD4 陽性メモリー T 細胞のみならず、HSV-2 特異的抗体やメモリー B 細胞が形成されることが明らかとなっている。さらには、HSV-2 で再感染後、膣粘膜組織に抗体や B 細胞の局在が報告されている［4］が、膣粘膜組織における役割に関しては不明である。そこで、本研究課題より、下記のことを明らかにすることを目的とした。

方　法

1. HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫後 5 週間で形成される CD4 陽性 T 細胞を中心としたクラスターにメモリー B 細胞は含まれるのか？

HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫 5 週間後、B220 陽性 B 細胞の局在はすでに報告されている［4］が、IgG 陽性メモリー B 細胞が実際にメモリーリンパ球クラスターに局在しているかどうか不明である。そこで、IgG を認識する抗体を用いて、CD4 陽性細胞との位置関係を免疫組織染色によって解析した。

2. 膣粘膜組織に局在する メモリー B 細胞は、絶えず血液―組織を循環しているのか、または組織に常在する形で局在しているのか？

HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫 5 週間後に検出されるメモリー B 細胞の局在を解析する目的で、免疫したマウスを FTY720 で処理した。FTY720 は、S1PR1 agonist で結合後に、S1P 受容体の発現を低下させるため、B 細胞はリンパ節から血中へ循環することができず、血中の B 細胞数は顕著に減少する。FTY720 を用いて、免疫したマウスの膣粘膜組織に局在する IgG 陽性メモリー B 細胞が血液循環型かどうか解析した。

結　果

1. HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫後 5 週間で形成される CD4 陽性 T 細胞を中心としたクラスターにメモリー B 細胞は含まれるのか？

HSV-2 弱毒株をマウス膣粘膜組織に免疫 5 週間後、CD4 陽性 T 細胞が膣粘膜組織粘膜固有層にクラスターを形成することを確認した（図 1）。一方で、IgG 陽性メモリー B 細胞は、CD4 陽性 T 細胞クラスター内には存在せず、わずかではあるが、クラスターの近傍に局在していることが明らかとなった（図 1）。また、これらの免疫したマウスに、HSV-2 を再感染させると、再感染 16 時間後に IgG 陽性メモリー B 細胞の数が増加し、粘膜固有層に局在していることが明らかとなった（図 1）。これらの IgG 陽性メモリー B 細胞も CD4 陽性 T 細胞クラスター内には局在が認められなかった（図 1）。

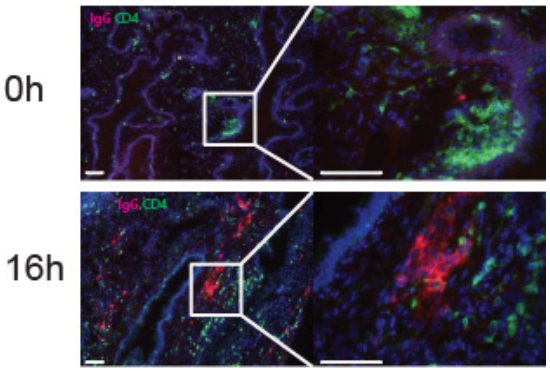


図 1. HSV-2 弱毒株で免疫したマウス膣粘膜組織における CD4 陽性 T 細胞と IgG 陽性メモリー B 細胞の局在
0 h：HSV-2 ウィルスを膣粘膜組織に再感染する前、16h：HSV-2 ウィルスを膣粘膜組織に再感染 16 時間後
（スケールバー：100 μm）

2. 膣粘膜組織に局在するメモリー B 細胞は、絶えず血液―組織を循環しているのか、または組織に常在する形で局在しているのか？

HSV-2 弱毒株をマウスの膣粘膜組織に免疫 5 週間後に、FTY720 を含む飲み水で 2 週間飼育した。その後、膣粘膜組織における IgG 陽性 MHC class Ⅱ陽性細胞の数をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、FTY720 処理後、IgG 陽性 MHC class Ⅱ陽性細胞の数が著しく減少した（図 2）。一方で、CD11c 陽性 MHC class Ⅱ陽性抗原提示細胞の数は、FTY 720 処理後もほぼ変化しなかった（図 2）。以上の結果から、HSV-2 弱毒株で免疫後に局在する IgG 陽性メモリー B 細胞は、血中を絶えず循環している細胞群であることが明らかとなった。

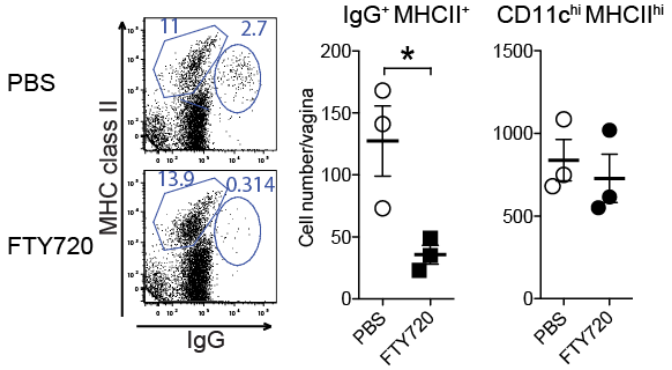


図 2. 膣粘膜組織に局在する IgG 陽性メモリー B 細胞による FTY720 感受性
$IgG^{+}MHCII^{+}$：IgG 陽性 MHC class Ⅱ陽性細胞、$CD11c^{hi}MHC\,II^{hi}$：CD11c 高発現 MHC class Ⅱ高発現細胞
* $p < 0.05$（two-tailed unpaired Student's *t*-test）

考　察

本研究提案における実験から、HSV-2弱毒株をマウスの腟粘膜組織に免疫5週間後、腟粘膜組織におけるメモリー B細胞は、血中から絶えず循環する細胞群であること、メモリー B細胞はCD4陽性T細胞クラスターに局在していないことが明らかとなった。また、HSV-2再感染後早期にIgG陽性メモリー B細胞が集積することが確認された。今後、これらのB細胞がどのような機能（抗体分泌や抗原提示能）を発揮するのか詳細に解析することによって、予防的ワクチン効果をもたらすことが可能であるかどうか明らかにすることができる。また、これらの解析結果によりHSV-2弱毒株以外のあらゆるワクチン候補薬にも応用でき、新しい治療の基盤となる方法を示すことができる。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に関しましては、医薬基盤・健康・栄養研究所ワクチン・アジュバント研究センターの石井健センター長ならびに Yale 大学免疫生物学分野の岩崎明子教授に深く御礼申し上げます。

文　献

1） Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, Wald A, Levin MJ, Stapleton JT, Gorfinkel I, Morrow RL, Ewell MG, Stokes-Riner A, Dubin G, Heineman TC, Schulte JM, Deal CD; Herpevac Trial for Women. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. N Engl J Med. 2012 Jan 5;366(1):34-43. PMID:22216840 DOI: 10.1056/NEJMoa1103151.

2） 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):3041-52. Epub 2008 Dec 1. PMID:19047439 DOI: 10.1084/jem.20082039.

3） Iijima N, Iwasaki A. T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. Science. 2014 Oct 3;346(6205):93-8. Epub 2014 Aug 28. PMID:25170048 DOI: 10.1126/science.1257530.

4） Parr EL, Parr MB. Immunoglobulin G, plasma cells, and lymphocytes in the murine vagina after vaginal or parenteral immunization with attenuated herpes simplex virus type 2. J Virol. 1998 Jun;72(6):5137-45. PMID:9525585