

〈総 説〉**粘膜ウイルス感染に対する
末梢組織生体防御機構の解明に取り組んで**飯島則文^{1,2)}

- 1) 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
アジュバント開発プロジェクト サブプロジェクトリーダー
- 2) 大阪大学免疫フロンティア研究センターワクチン学 招聘研究員

(2018年11月2日受付)

我々の体は、病原体が生体内に侵入した際に速やかに反応し、多様な機能を持つ細胞群を活性化することにより生体を防御する免疫システムを備えている。様々な重篤な疾患を引き起こす病原体から生体を長期間防御するために重要な役割を果たす免疫記憶とは、投与された抗原もしくは、感染した病原体由来の抗原に抗原提示細胞を含む免疫担当細胞が反応し、抗原特異的なB細胞およびT細胞の分化を誘導し、末梢組織を含む様々な臓器で抗原特異的な二次反応を増強することである。このような免疫反応は、血中を循環するメモリーT細胞、メモリーB細胞および抗体が全身性に作用すると考えられていた。近年、皮膚組織や粘膜組織を含む末梢組織には、我々の予想を遥かに超える数のメモリーT細胞が長期間局在していることが明らかとなっており、その役割が注目されている。

単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2) は、主に生殖粘膜組織の上皮細胞に感染後、末梢神経を上行し、後根神経節へ移行することが知られている。これまで試験された全てのワクチン候補薬は、ワクチン投与後、被験者血液中にワクチン抗原に対する細胞性免疫および液性免疫が誘導されるにもかかわらず、HSV-2感染を防御するワクチン効果が認められていない。以上の結果から、HSV-2に対する新たな治療方法を確立するためには、HSV-2に対する生体防御機構の更なる理解が必要であると考えられる。

本稿では、メモリーT細胞を中心とした組織特異的免疫応答の重要性について、最新の知見を紹介します。

はじめに

私は、幸運にも平成16年度に日本抗生物質学

術協議会 (現 公益財団法人日本感染症医薬品協会)・ファイザー感染症研究助成事業で、海外留学助成に採択されてYale大学医学部免疫生物学部岩崎明子研究室に留学することができました。

この紙面をお借りして、心より御礼申し上げます。本海外留学助成に採択された当時は、留学生生活が約12年の長きに渡るとは想像もしませんでした。粘膜ウィルス感染に対する生体防御機構で最先端の研究を展開していた岩崎ラボの規模が年々大きくなっていく様を自分自身の研究の発展と共に経験することができたことは貴重な財産となりました。

本海外留学助成の基盤となった研究に従事した大学院博士課程在籍時は、樹状細胞の細胞生物学や免疫応答全体における樹状細胞の役割を学び、樹状細胞の機能を制御する細胞内情報伝達経路の解明に取り組んでおりました。その過程で、実際に病原体が感染した場合の生体防御機構（特に感染部位）がどのように制御されているのか、生体内での樹状細胞の役割に興味を持つようになりました。岩崎ラボへ留学後は性感染症を引き起こす単純ヘルペスウィルス2型（Herpes simplex virus type 2; HSV-2）をマウス腔粘膜組織に感染させるモデルを用いて末梢組織における生体防御機構の解明に取り組み、主に感染部位である腔粘膜組織やHSV-2が潜伏感染を引き起こす神経組織における生体防御機構の詳細を解明しました。本論文の趣旨が若手研究者に微生物学・抗生物質の興味を持っていただき、感染症の基礎研究の啓発になればとのことで、筆者自身が留学当初に未知の現象を発見した経緯から論文発表までをわかりやすくまとめることができればと思います。

性器ヘルペス感染症

性器ヘルペス感染症は、性感染症（sexually transmitted disease: STD）の一つとして知られており、生殖器官の粘膜を通して病原微生物やウィルスが感染することによって引き起こされます¹⁾。HIV（human immunodeficiency）や単純ヘルペスウィルス2型（herpes simplex virus-2; HSV-2）感染に代表されるように、長期にわたる

慢性感染が多いことが知られています。日本における性感染症の報告件数は、性器ヘルペス感染者数10,258（平成26年）を筆頭に年々増加の一途をたどっています。性感染症は特に若者に感染が広がっており、神経組織に潜伏感染したヘルペスウィルスが再活性化を繰り返し、感染部位や神経組織において激しい痛みを伴うことも報告されており、患者のQOLへの影響が問題となっています。加えて、これまで試験されたヘルペスワクチンはほぼ全て、予防・治療効果がないというヒト臨床試験結果が報告されています²⁾。それ故、現在のところヘルペスウィルスを根治することは困難な状況です。

HSV-2に対する粘膜組織生体防御機構

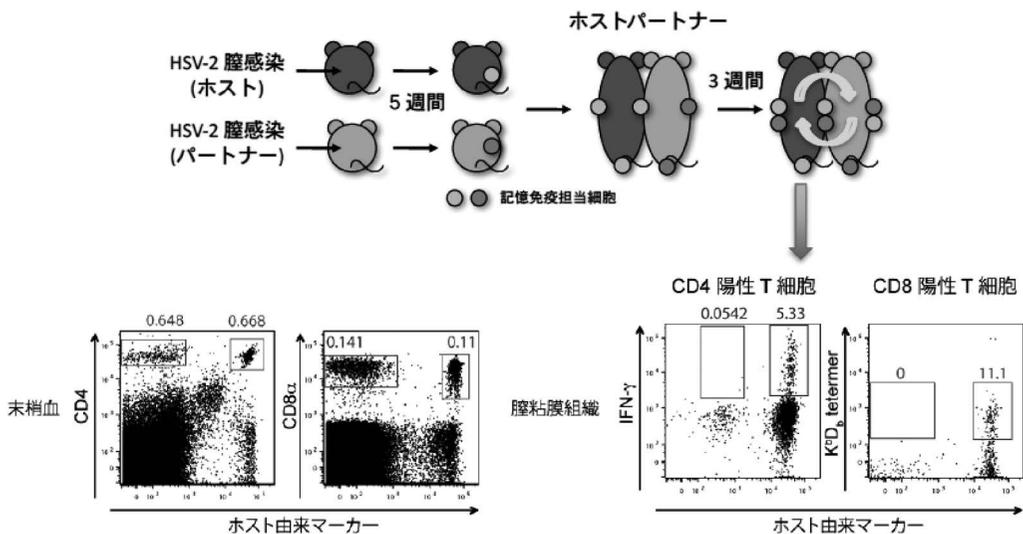
留学当時は、HSVが粘膜組織上皮細胞に感染後、粘膜固有層に局在する樹状細胞が所属リンパ節へと移動し抗原特異的T細胞の形成を誘導するということが知られておりました^{3),4)}。しかしながら、粘膜組織に局在する樹状細胞の役割や免疫担当細胞の機能は全く不明でした。その理由として、感染部位である粘膜組織で何が起きているのか検出する方法や解析する手段が不足しておりました。そこで、様々な消化酵素の利用や組織破碎処理方法を最適化し、微小粘膜組織に局在する細胞群の可視化を可能にしました。最適化した方法を用いて腔粘膜組織に局在する細胞群を解析したところ、腔粘膜上皮には、少なくとも細胞表面抗原の発現が異なる3種類の樹状細胞が局在していることが明らかとなりました⁵⁾。さらには、皮膚ランゲルハンス細胞とは異なり、これらの樹状細胞は、骨髄由来の樹状細胞前駆体から分化する特殊な樹状細胞が局在することを示し、分化系統が異なることがわかりました⁵⁾。この結果より、皮膚上皮に局在するランゲルハンス細胞とは異なるユニークな樹状細胞集団であることが示唆されました。上述したように、ウィルス感染後、腔粘

膜組織に局在する樹状細胞が所属リンパ節に移動し、HSV特異的エフェクターCD4陽性T細胞(T_{EFF})を分化させることは知られていました³⁾が、HSV感染部位である腔粘膜組織にHSV特異的 T_{EFF} が到達後、粘膜組織でどのようにしてウイルスの複製を抑制するエフェクター機能を発揮するか不明でした。筆者らのグループは、HSV-2感染1週間後に粘膜組織に蓄積した単球由来抗原提示細胞がCD4陽性 T_{EFF} に抗原を提示し、これらの細胞がIFN- γ を産生し感染防御に寄与することを証明しました⁶⁾。以上の結果から、CD4陽性 T_{EFF} がHSV-2感染後1週間で腔粘膜上皮における複製を抑制することが明らかとなりました。一方で、HSV-2感染3週間後、4週間後に腔粘膜組織におけるCD4陽性T細胞の局在を免疫組織染色で確認したところ、ウイルスが粘膜組織から除去されたにも関わらず、CD4陽性T細胞が依然として腔粘膜組織に局在しておりました⁷⁾。さらには、HSV-2感染1週間後には認められませんでした

が、HSV-2感染5週間後にはこれらのCD4陽性T細胞が腔粘膜固有層にクラスターを形成しておりました⁷⁾。HSV-2を腔粘膜組織に再感染させた場合に、HSV-2のウイルス複製抑制にCD4陽性T細胞が重要な役割を果たしていることが知られておりました⁸⁾が、腔粘膜組織に形成されたクラスターに局在するCD4陽性メモリーT細胞がウイルス複製抑制に貢献しているのか不明でした。我々がマウス腔粘膜組織におけるCD4陽性T細胞のクラスターを発表後、Corey LらのグループがHSV-2に感染した患者の腔粘膜組織においてもCD4陽性T細胞がクラスターを形成していることを発表しました⁹⁾。これらの結果から、HSV-2感染によって形成されるCD4陽性T細胞のクラスターは何らかの生理的意義があることが示唆されました。

HSV-2を感染5週間後、CD4陽性T細胞は、 T_{EFF} からメモリーT細胞へと分化していることが知られており、主にCD62L^{hi}CD44^{hi}CD4陽性メモ

図1. 並体結合のしくみ



HSV-2をホスト及びパートナーマウスの腔粘膜組織に感染5週間後、これら2匹のマウスを並体結合の手術によって、両者の体循環を共有させた。その3週間後、ホストマウスの末梢血中を循環するCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の由来をホスト由来マーカーを用いてフローサイトメトリーによって解析した。また、同様にホストマウスの腔粘膜組織に局在するHSV-2特異的IFN- γ 産生CD4陽性メモリーT細胞及びHSV-2特異的CD8陽性メモリーT細胞(K^D_b tetramer陽性)の由来をホスト由来マーカーを用いてフローサイトメトリーによって解析した。(文献¹¹⁾より引用改変)

リーT細胞 (Central memory T cells; T_{CM}) は所属リンパ節に局在し, $CD62L^{lo}CD44^{hi}CD4$ 陽性メモリーT細胞 (Effector memory T cells; T_{EM}) は, リンパ節から組織へと移行し血中を循環していることが報告されておりました¹⁰⁾。そこで, クラスターに局在する $CD4$ 陽性T細胞が血中を絶えず循環している $CD4$ 陽性メモリーT細胞かどうかを明らかにする目的で, 並体結合の技術を用いて2匹のマウスの血液循環を共有させました (図1)。その結果, クラスターに局在する $CD4$ 陽性T細胞はこれまで報告されていた T_{EM} ではなく, 組織に長く局在する組織局在型 $CD4$ 陽性メモリーT細胞 (Tissue resident memory T cells; T_{RM}) であることが明らかとなりました¹¹⁾ (図1)。さらには, HSV-2再感染後12時間以内に高濃度のIFN- γ を産生することが明らかとなり, 感染後すばやくウィルス複製抑制に大きく貢献していることを証明致しました¹¹⁾。

神経組織内でのHSV-2ウィルス複製抑制における抗体の重要性

前項で示したように, 腔粘膜組織に形成されるクラスターに局在する $CD4$ 陽性メモリーT細胞がHSV-2再感染に対するウィルス複製抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなりました。同じ実験系においては, B細胞を除去してもウィルス複製は抑制されることがわかりましたが, 腔粘膜組織にクラスターが形成されない場合は, B細胞がウィルス複製抑制に大きく関与していることが示唆されました¹²⁾。HSV-2をマウス鼻粘膜組織に感染させると血中に抗HSV-2抗体力価の著しい上昇が認められました。さらには鼻粘膜組織にHSV-2感染5週間後, HSV-2を腔粘膜組織に再感染させると, 後根神経節におけるウィルス複製が著しく抑制されました¹²⁾。その後この生体防御機構には, $CD4$ 陽性メモリーT細胞と抗HSV-2抗体が関与していることが明らかとなりま

した。具体的には, HSV-2再感染後早期に血中から $CD4$ 陽性メモリーT細胞が神経組織へと移行し, IFN- γ を産生することによって血管内皮細胞の血管透過性を上昇させ, ウィルス伝播を抑制する抗HSV-2抗体が神経組織へと移行できることを証明することができました¹²⁾。

終わりに

留学した当時に開始した上記の研究テーマは, その当時に発見が相次いでいたトレンドとはかけ離れたよくわからない未知の分野の研究テーマでした。研究初期の進捗は早くありませんでしたが, じっくりと長い時間をかけていくつかの論文を仕上げることができました。長いスパンでの研究テーマを与えていただいた岩崎先生に深く感謝申し上げます。また, 公益財団法人日本感染症医薬品協会から留学するチャンスや御支援をいただきましたこと, 重ね重ねお礼申し上げます。

利益相反

本論文に関して, 申告すべき利益相反関係にある企業などはありません。

文献

- 1) Schiffer JT, Gottlieb SL: Biologic interactions between HSV-2 and HIV-1 and possible implications for HSV vaccine development. *Vaccine*. 2017 S0264-410X 31273-2.
- 2) Belshe RB *et al.*: Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med*. 2012 366: 34-43.
- 3) Zhao X *et al.*: Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. *J Exp Med*. 2003 197: 153-62.
- 4) Allan RS *et al.*: Epidermal viral immunity induced by $CD8\alpha$ +dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science*. 2003 301: 1925-

- 8.
- 5) Iijima N *et al.*: Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 104: 19061–6.
- 6) Iijima N *et al.*: Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 108: 284–9.
- 7) Iijima N *et al.*: Dendritic cells and B cells maximize mucosal Th1 memory response to herpes simplex virus. *J Exp Med*. 2008 205: 3041–52.
- 8) Milligan GN *et al.*: T lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosae and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2. *J Immunol*. 1998 160: 6093–100.
- 9) Zhu J *et al.*: Persistence of HIV-1 receptor-positive cells after HSV-2 reactivation is a potential mechanism for increased HIV-1 acquisition. *Nat Med*. 2009 15: 886–92.
- 10) Sallusto F *et al.*: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004 22: 745–63.
- 11) Iijima N, Iwasaki A: T cell memory. A local macrophage chemokine network sustains protective tissue-resident memory CD4 T cells. *Science*. 2014 346 (6205): 93–8.
- 12) Iijima N, Iwasaki A: Access of protective antiviral antibody to neuronal tissues requires CD4 T-cell help. *Nature*. 2016 533 (7604): 552–6.

The mechanisms of protective immunity against genital herpes infection

Norifumi Iijima^{1,2)}

¹⁾ National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

²⁾ Immunology Frontier Research Center, Osaka University

Herpes simplex virus-2 (HSV-2) is one of the most common sexually transmitted infections (STIs) with a high prevalence of 417 million in the world. HSV-2 is primarily transmitted through genital epithelial cells followed by the establishment of latency in the sacral ganglia. So far, several pharmacological interventions are available to inhibit virus replication. However, HSV-2 has not been able to be completely cured by them. Furthermore, it's been known that neonatal HSV-2 infection is seriously lethal without the treatment and HSV-2 infection in adults increases the susceptibility of high-risk HPV and HIV infection. Therefore, preventative vaccines or curative medicines are required for this disease. However, all of the current vaccine has been ineffective to prevent HSV-2 disease or infection despite inducing anti-HSV-2 immunity in the circulation. Towards developing vaccines to prevent HSV-2 transmission, a further understanding of the mechanism by which immune responses within peripheral tissues following HSV-2 infection are required. However, the immune mechanism of protection within the female genital mucosa and dorsal root ganglia (DRG) has been poorly understood. Until now, we have found that 1) genital tissue-resident immune response by establishing memory lymphocyte cluster

(MLC) including HSV-2-specific T cell populations was required for preventing the spreading of HSV-2 from genital tissues to dorsal root ganglia (DRG) and 2) IFN- γ rapidly produced by circulating CD4⁺ memory T cells in DRG increased vascular permeability in blood-nerve barrier to allow the entry of anti-HSV antibody within neuronal tissues. Our results shed light on a previously unappreciated role of CD4⁺ memory T cells against genital herpes infection.