

性器ヘルペスウイルス感染を制御する生体防御機構のしくみ

第 14 回ウイルス学キャンプ in 湯河原

飯島 則文

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 サブプロジェクトリーダー

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 招聘教員

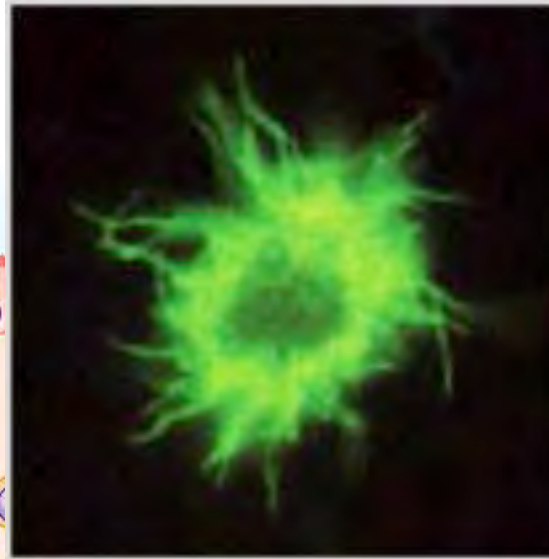
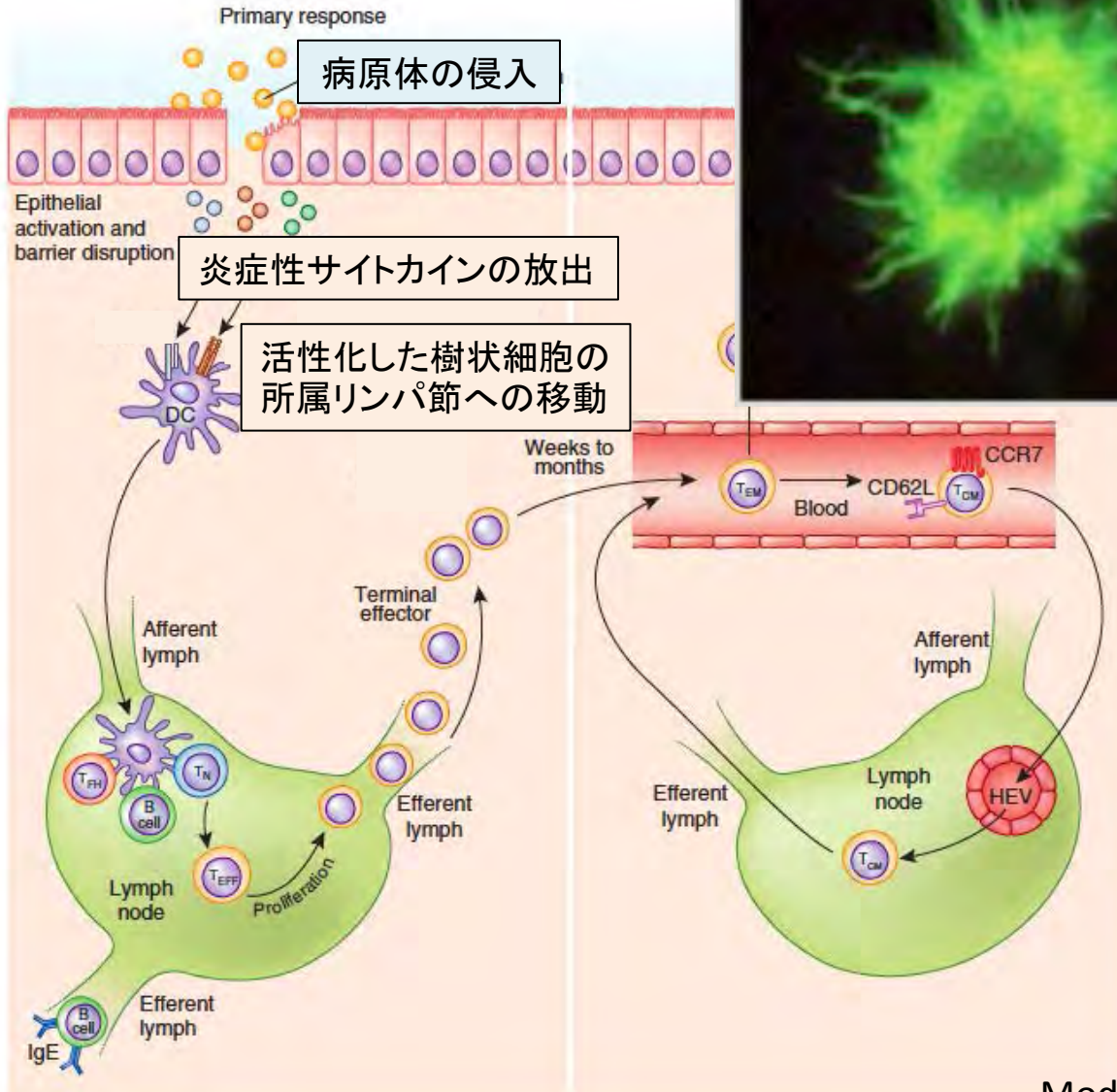
何故性器ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス 2 型; Herpes simplex virus type 2 [HSV-2]) に対する生体防御機構の研究を始めることになったのか？

博士課程 (2001-2004) ⇒ ポスドク



北海道大学 遺伝子病制御研究所
Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University

小田原 和典 研究室



樹状細胞の機能を制御する細胞内情報伝達機構の仕組みに関する研究 (*in vitro*)



病原体 (ウイルス) 感染後における樹状細胞の役割に興味 (*in vivo*)

何故性器ヘルペスウイルスに対する生体防御機構の研究を始めることになったのか？

Vaginal Submucosal Dendritic Cells, but Not Langerhans Cells, Induce Protective Th1 Responses to Herpes Simplex Virus-2

Xinyan Zhao,¹ Eszter Deak,¹ Kelly Soderberg,¹ Melissa Linehan,¹ David Spezzano,² Jia Zhu,² David M. Knipe,² and Akiko Iwasaki¹

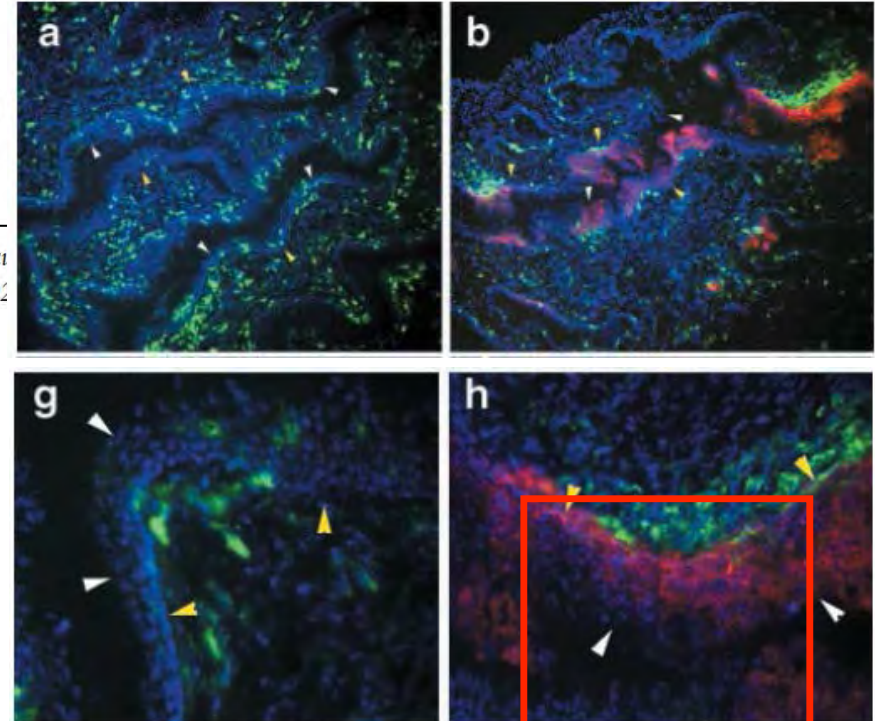
¹Department of Epidemiology and Public Health, Yale University School of Medicine, New Haven, CT

²Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

J Exp Med. 2003 197: 153-162

1. 粘膜組織: HSV-2 感染部位 (腔粘膜組織) の理解
2. HSV-2 ウィルスの特徴の理解
3. HSV-2 感染部位における生体防御機構を解析する方法の開発

CD11c: Green HSV-2: Red



HSV-2 マウス腔粘膜感染
24 時間後

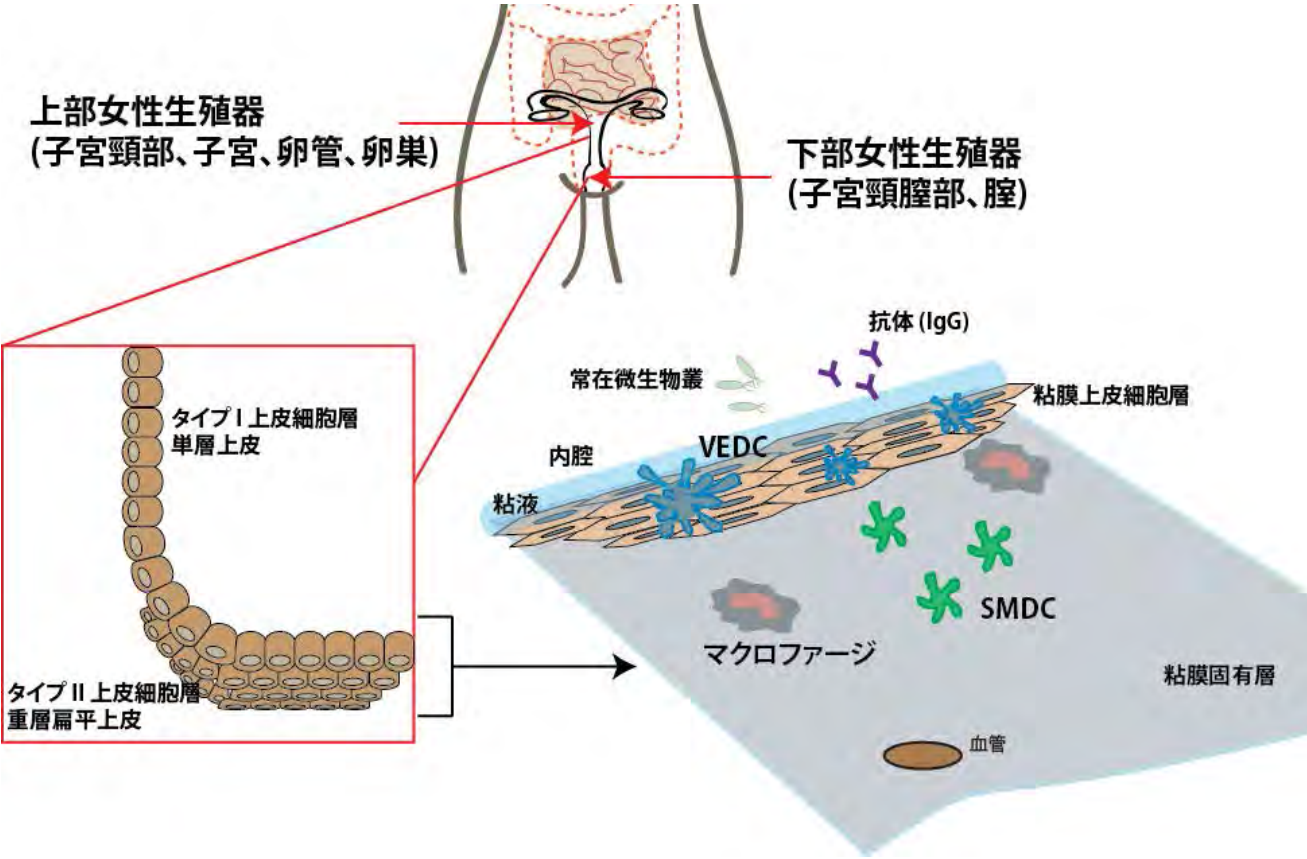
1. HSV-2 感染部位で何が起きているのか？
2. HSV-2 ウィルスがどのように粘膜組織に侵入するのか？
3. HSV-2 感染部位における生体防御機構？

1. 粘膜組織: HSV-2 感染部位(腔粘膜組織)の理解

Unique features of immune response in genital tissues against invading pathogens which cause sexually transmitted diseases

Immune response in female reproductive tract

- Affected by menstrual cycle
- Affected by sex hormones
- Affected by unique resident bacterial communities



VEDC: 腔粘膜上皮樹状細胞
SMDC: 腔粘膜固有層樹状細胞

1. 粘膜組織: HSV-2 感染部位(腔粘膜組織)の理解

性感染症を引き起こす病原体とその治療方法の現状

The World Health Organization (WHO) estimates that in 2008 there were at least 498 million new cases of the more than 30 known sexually transmitted infections.

| 病原体 | 病原体の分類 | 現状・治療 |
|---------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| HSV: 単純ヘルペスウイルス 1 型及び 2 型 | DNA ウィルス | 抗ヘルペスウイルス薬が効果を示すが、根治できず |
| HIV: 免疫不全ウイルス | レトロウィルス | 抗HIV薬が有効。慢性的に進行し、死に至るが、近年治療による延命が進む |
| HPV: ヒト乳頭腫ウイルス | DNA ウィルス | HPV16, 18 に関しては、予防ワクチンが有効 |
| HBV (Hepatitis B virus): B 型肝炎ウイルス | DNA ウィルス | 予防にはワクチンが有効。 HCV も生殖器感染する。 |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> : クラミジア | 細菌 | 抗菌薬(マクロライド系、ニューキノロン系が中心)が有効だが、ワクチンはない |
| <i>Treponema pallidum</i> : 梅毒トレポネーマ | 細菌 | 抗菌薬(主としてペニシリン系)が有効 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> : 淋菌 | ナイセリア属のグラム陰性双球菌 | 抗菌薬が有効だが、耐性率が増加している |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> : トリコモナス | 原生生物 | メトロニダゾールが有効だが、根治できず |

In 2012, HSV vaccine trial (gD2-subunit vaccine with MPL-alum) was not effective in HSV-2 infection. The vaccine induced cellular and humoral immunity systemically.

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

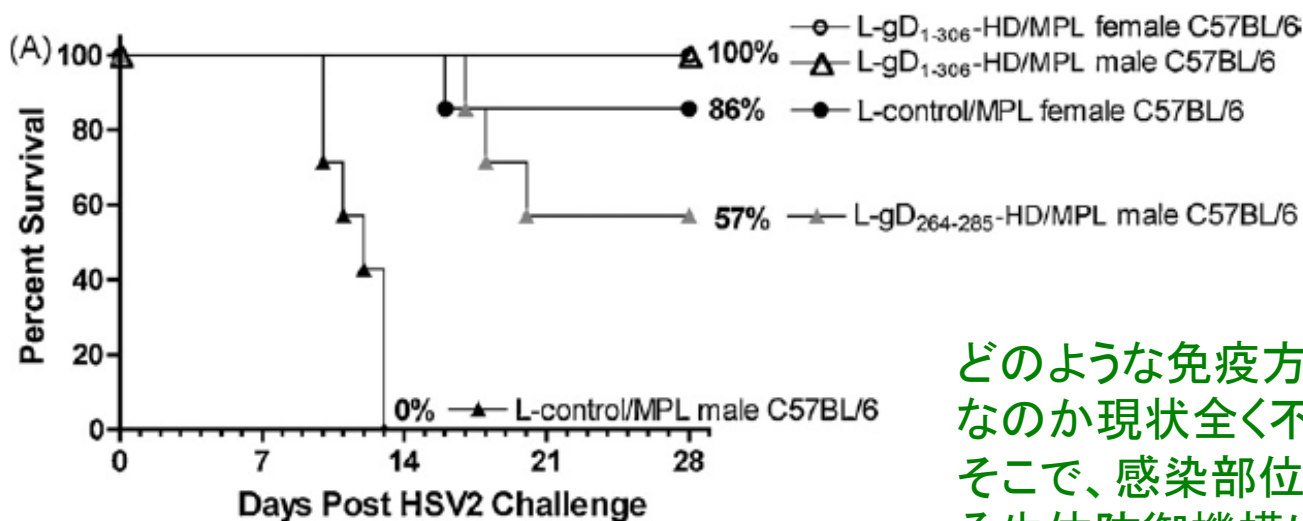
ORIGINAL ARTICLE

Efficacy Results of a Trial of a Herpes Simplex Vaccine

Robert B. Belshe, M.D., Peter A. Leone, M.D., David I. Bernstein, M.D.,
Anna Wald, M.D., Myron J. Levin, M.D., Jack T. Stapleton, M.D.,
Iris Gorfinkel, M.D., Rhoda L. Ashley Morrow, Ph.D., Marian G. Ewell, Sc.D.,
Abbie Stokes-Riner, Ph.D., Gary Dubin, M.D., Thomas C. Heineman, M.D., Ph.D.,
Joann M. Schulte, D.O., and Carolyn D. Deal, Ph.D.,
for the Herpevac Trial for Women

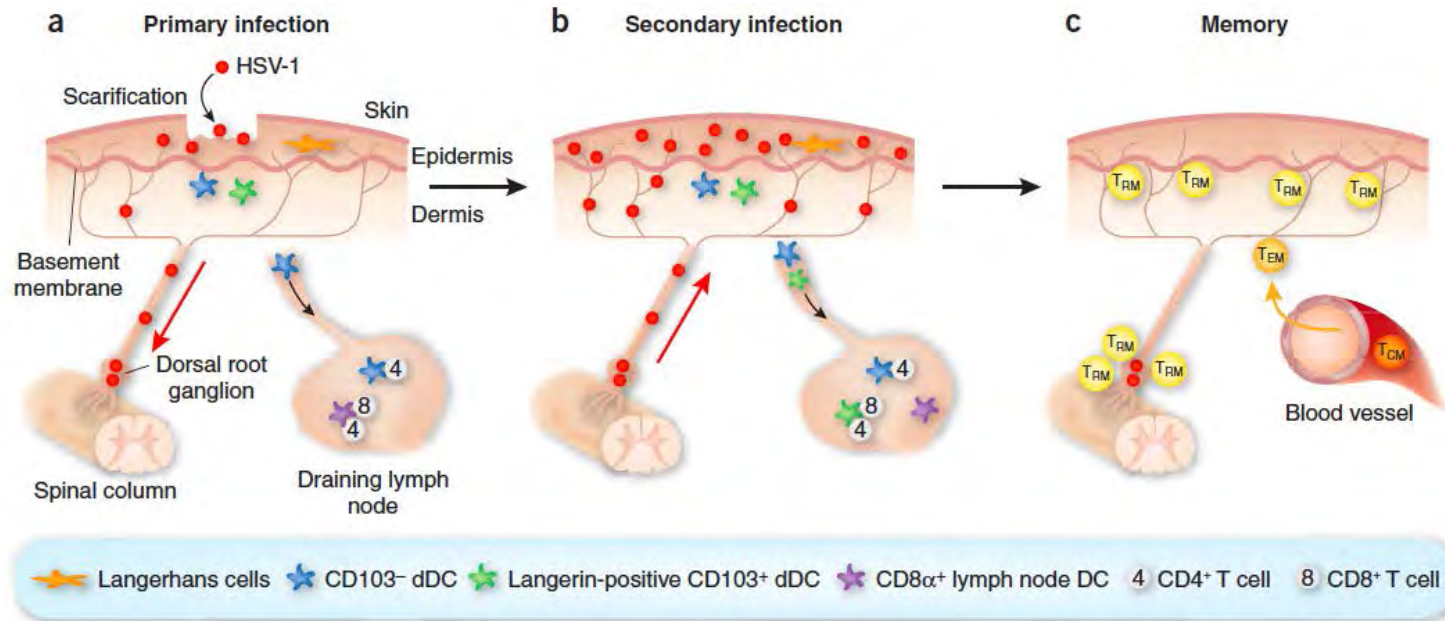
The latest randomized, double-blinded efficacy field trial with its focus on the subgroup involving 8,223 women produced the result that this gD2 subunit vaccine was effective in preventing HSV-1 genital disease and infection but not HSV-2.

マウスモデルやモルモットモデルでは、gD2-サブユニットワクチン(筋肉内注射)はHSV-2感染を防ぐワクチン効果を示すにもかかわらず、ヒト臨床試験では全く効果を示していない。



どのような免疫方法がワクチン効果に必要なのか現状全く不明である。そこで、感染部位(粘膜組織)に形成される生体防御機構に着目した。

Herpes simplex virus type-2 (HSV-2) infection causes a lifelong infection



-Mouse model of genital herpes infection-

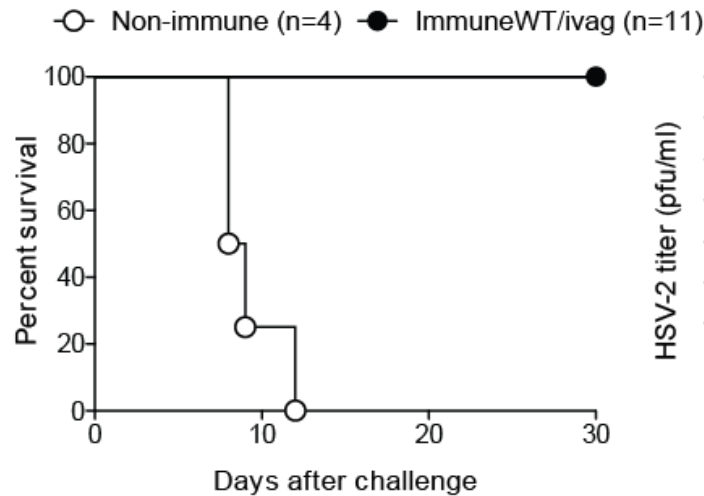
Iwasaki A. Nat. Immunol. 2009

Intravaginal WT HSV-2 infection:

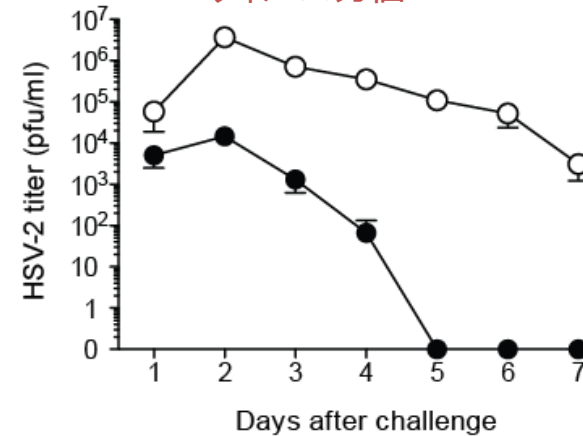
Mice are succumbed within 10 da

Intravaginal TK⁻ HSV-2 infection:

[Thymidine kinase (TK) is required for replication in neuronal tissues]
 Mice are alive and immunized.



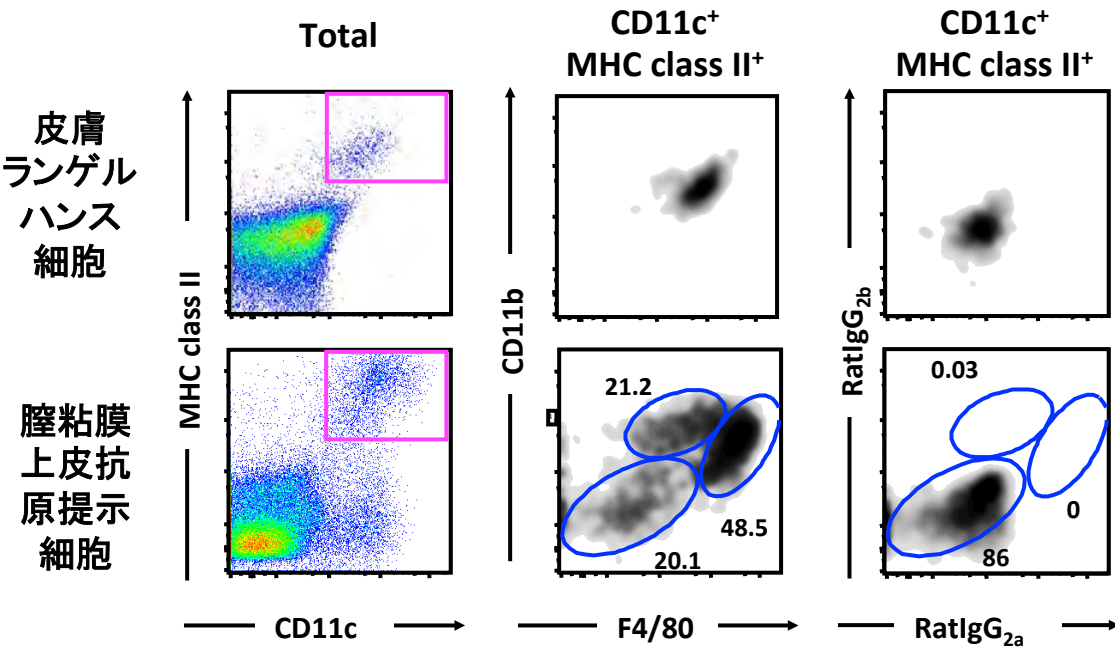
膣粘膜組織におけるウイルスカ価



HSV-2 感染部位である膣粘膜組織で何が起きているのか？

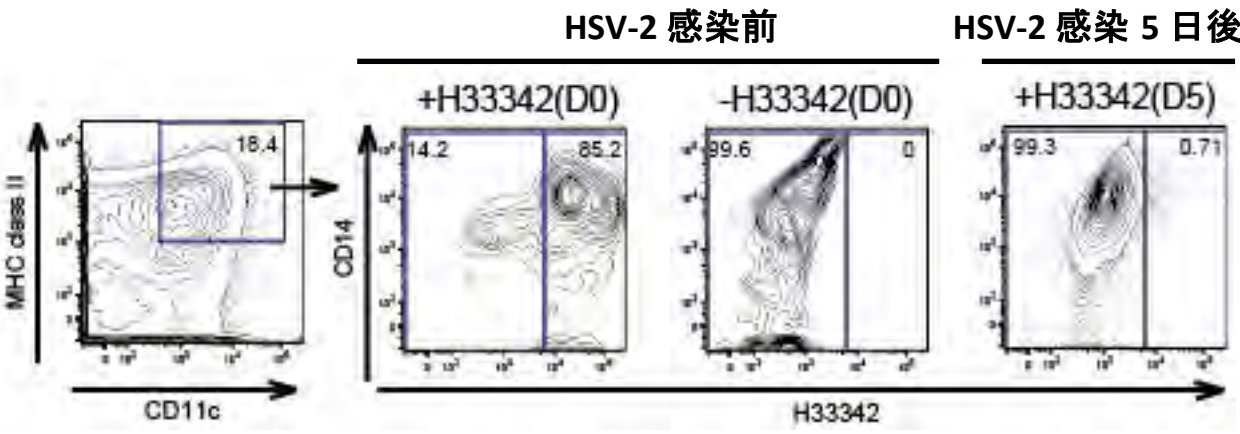
3. HSV-2 感染部位における生体防御機構を解析する方法の開発

HSV-2 感染部位 (腔粘膜組織) における免疫担当細胞の解析



腔粘膜組織では、皮膚とは異なり、3種類の異なる抗原提示細胞集団が局在していることが明らかとなった。

Iijima N. et al. 2007

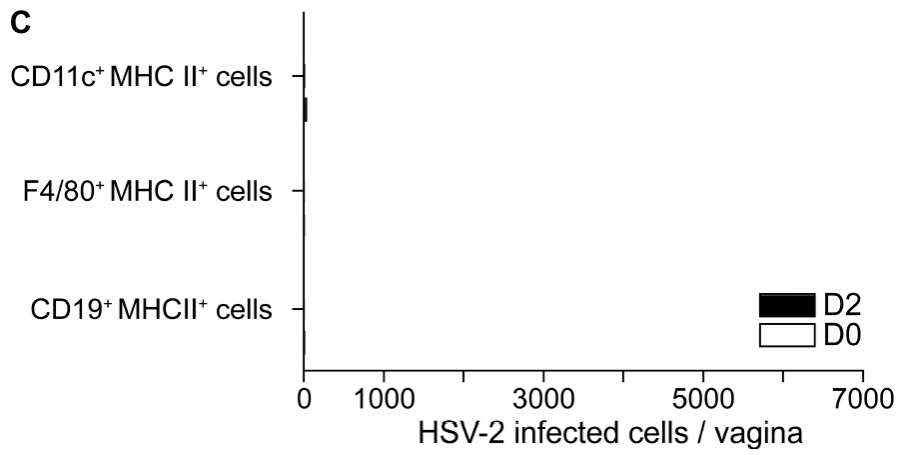
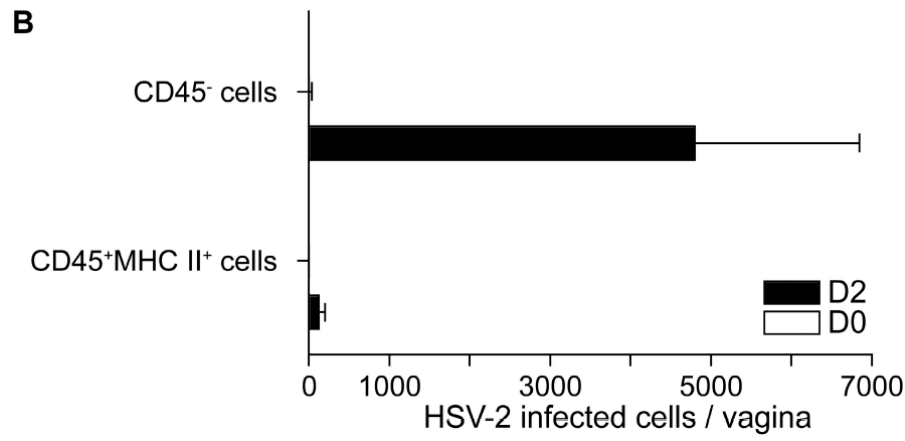
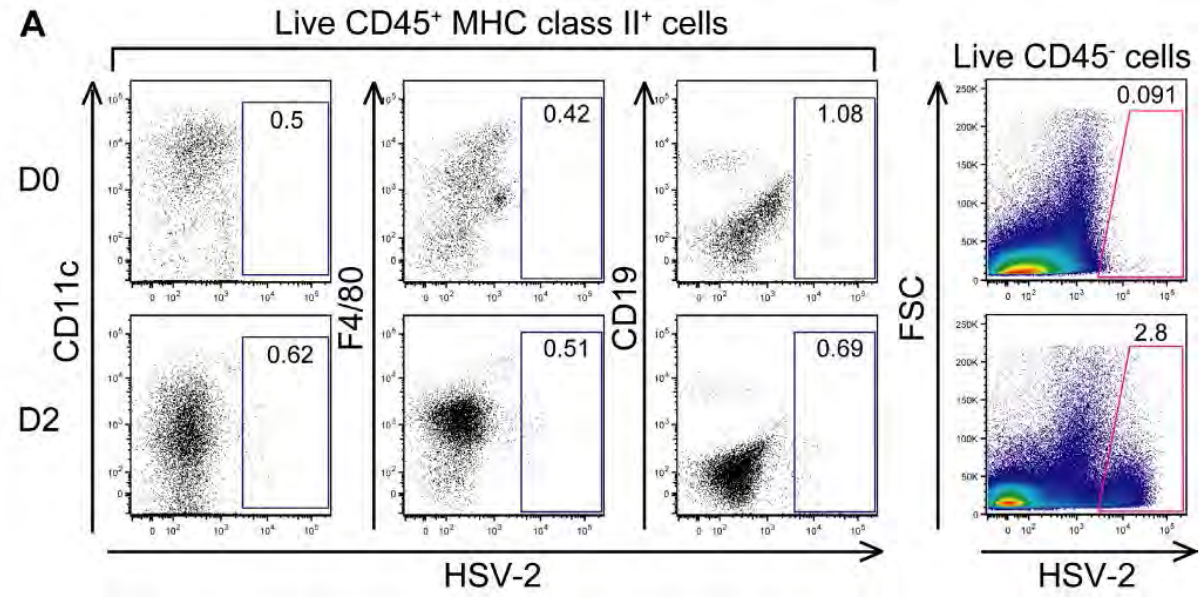


HSV-2 感染後、腔粘膜組織では、抗原提示細胞集団は所属リンパ節へと移行し、その代わりに血中から新たに抗原提示細胞が流入することが明らかとなった。

3. HSV-2 感染部位における生体防御機構を解析する方法の開発

膣粘膜組織における HSV-2 感染細胞の解析

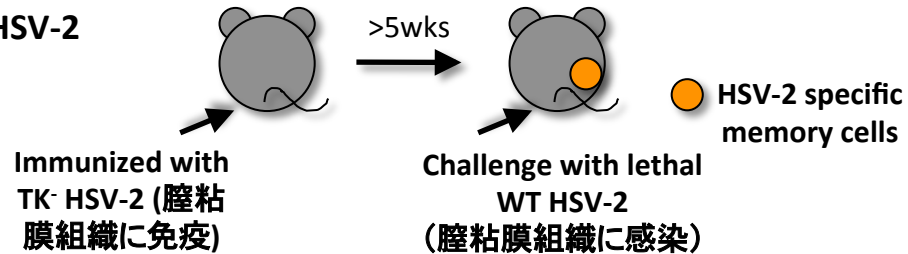
HSV-2 は、膣粘膜組織において主に膣上皮細胞を含む非造血細胞群に感染することが明らかとなった。



Memory CD4 T cells mediate protection against HSV-2 secondary challenge

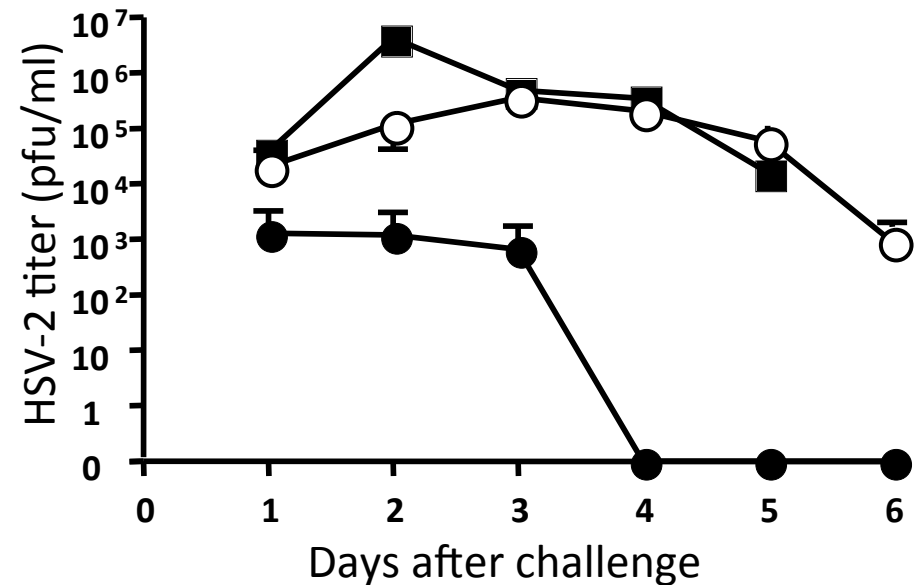
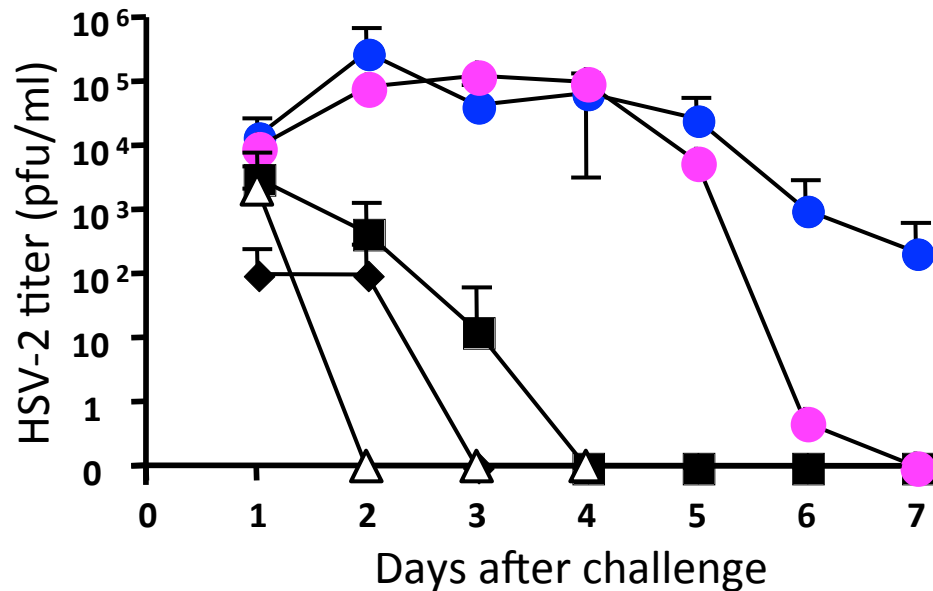
TK: thymidine kinase

TK-HSV-2: reactivation-defective strain of HSV-2



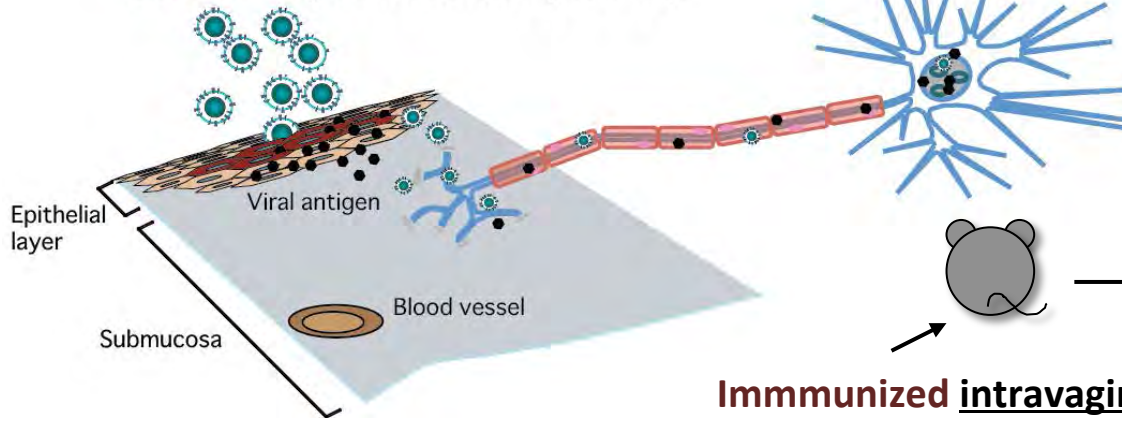
- Immune WT+ anti-CD4 Ab
- ◆ Immune IFN- $\alpha\beta$ R^{-/-}
- Immune WT + anti-IFN- γ
- Immune WT
- △ Immune WT + anti-NK1.1

- Non-immune
- Imm (13wks) + Control Ab
- Imm (13wks) + anti-CD4



Memory CD4 T cells mediate protection against HSV-2 secondary challenge

Genital herpes infection (HSV-2)



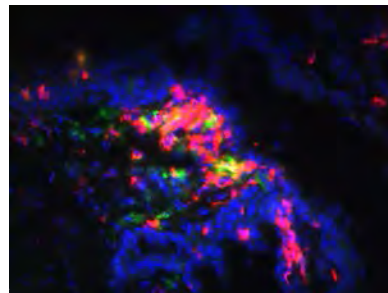
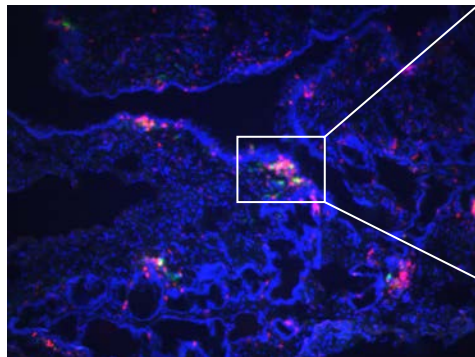
TK⁻ HSV-2 infected (5 wk)

Immunized intravaginally (ivag)
with Thymidine kinase⁻ (TK⁻) HSV-2

5 wks

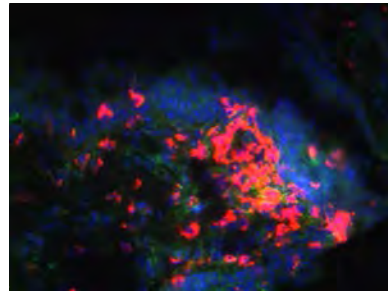
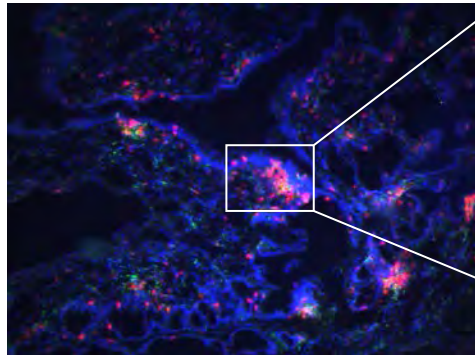
Challenge ivag
with WT HSV-2

<6 days after challenge>

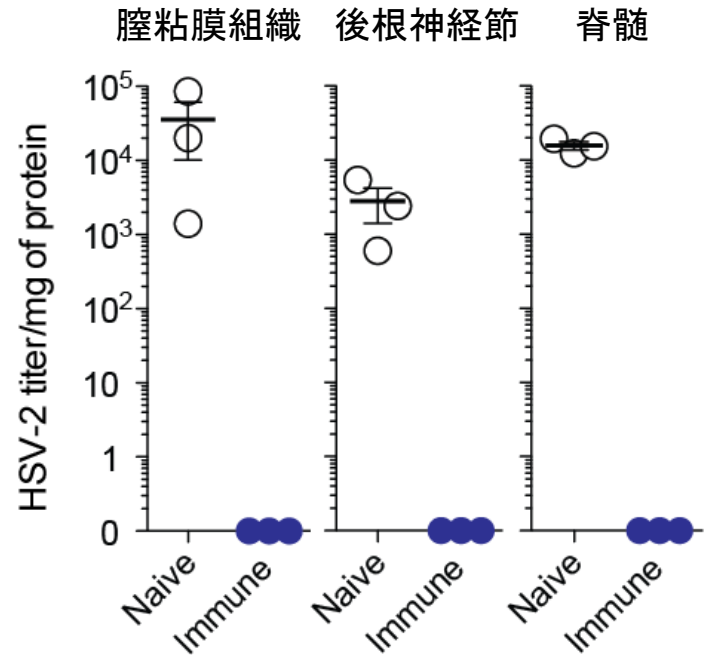


Red: CD4 Green: CD11c

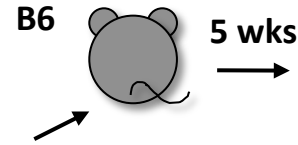
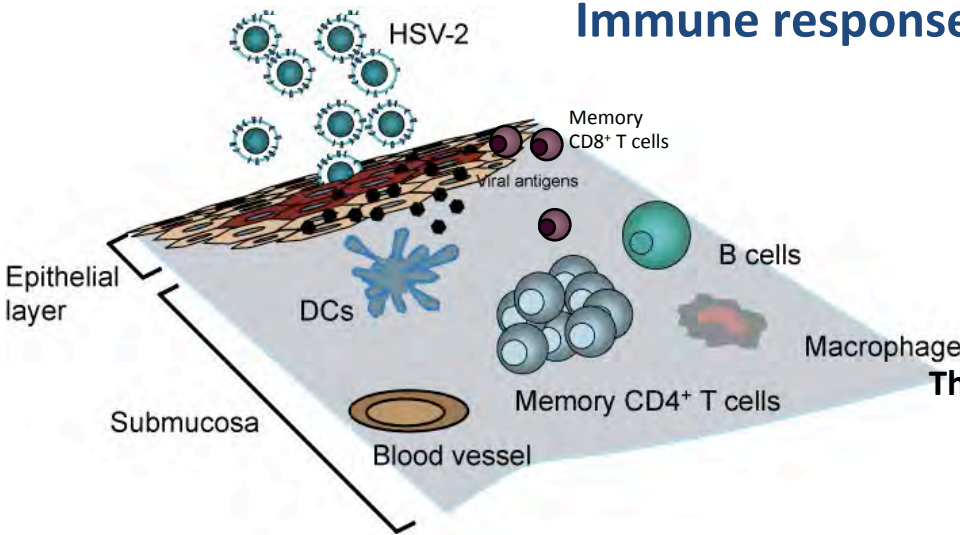
TK⁻ HSV-2 infected (5wk)



Red: CD4 Green: MHCII

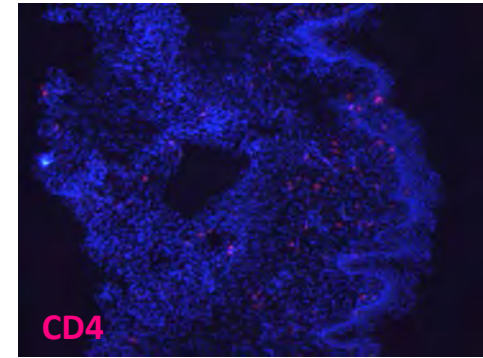


Immune response in genital tissues of mice infected with HSV-2

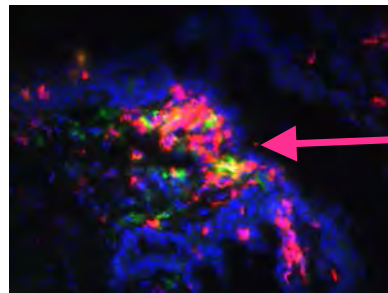
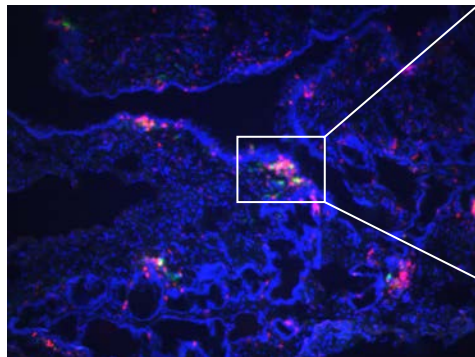


Immunized ivag with Thymidine kinase⁻ (TK⁻) HSV-2

Naive



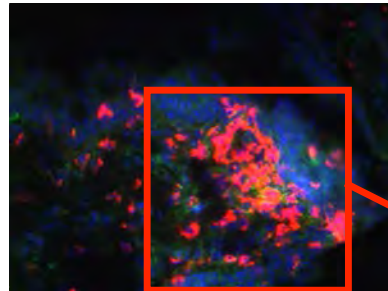
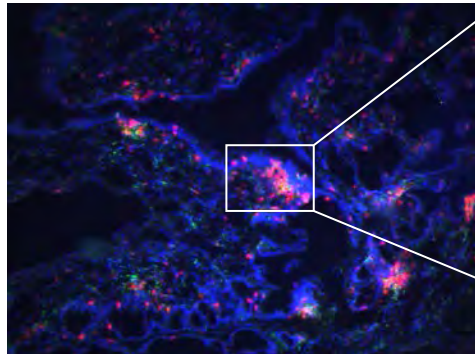
TK⁻ HSV-2 immunized (5 wk)



Memory Lymphocyte Cluster (MLC)
メモリーリンパ球クラスター

Red: CD4 Green: CD11c

TK⁻ HSV-2 immunized (5wk)



Red: CD4 Green: MHCII

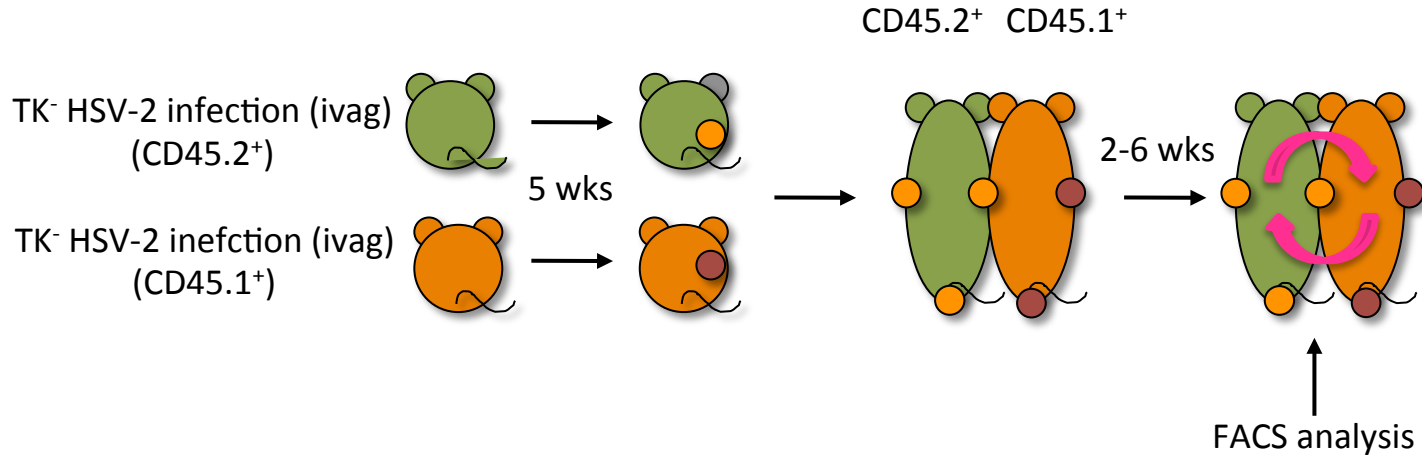
Questions

1. What are the phenotypic and functional characteristics of lymphocyte clusters?
2. What is the physiological importance of the of lymphocyte clusters against HSV-2 infection?

Question:

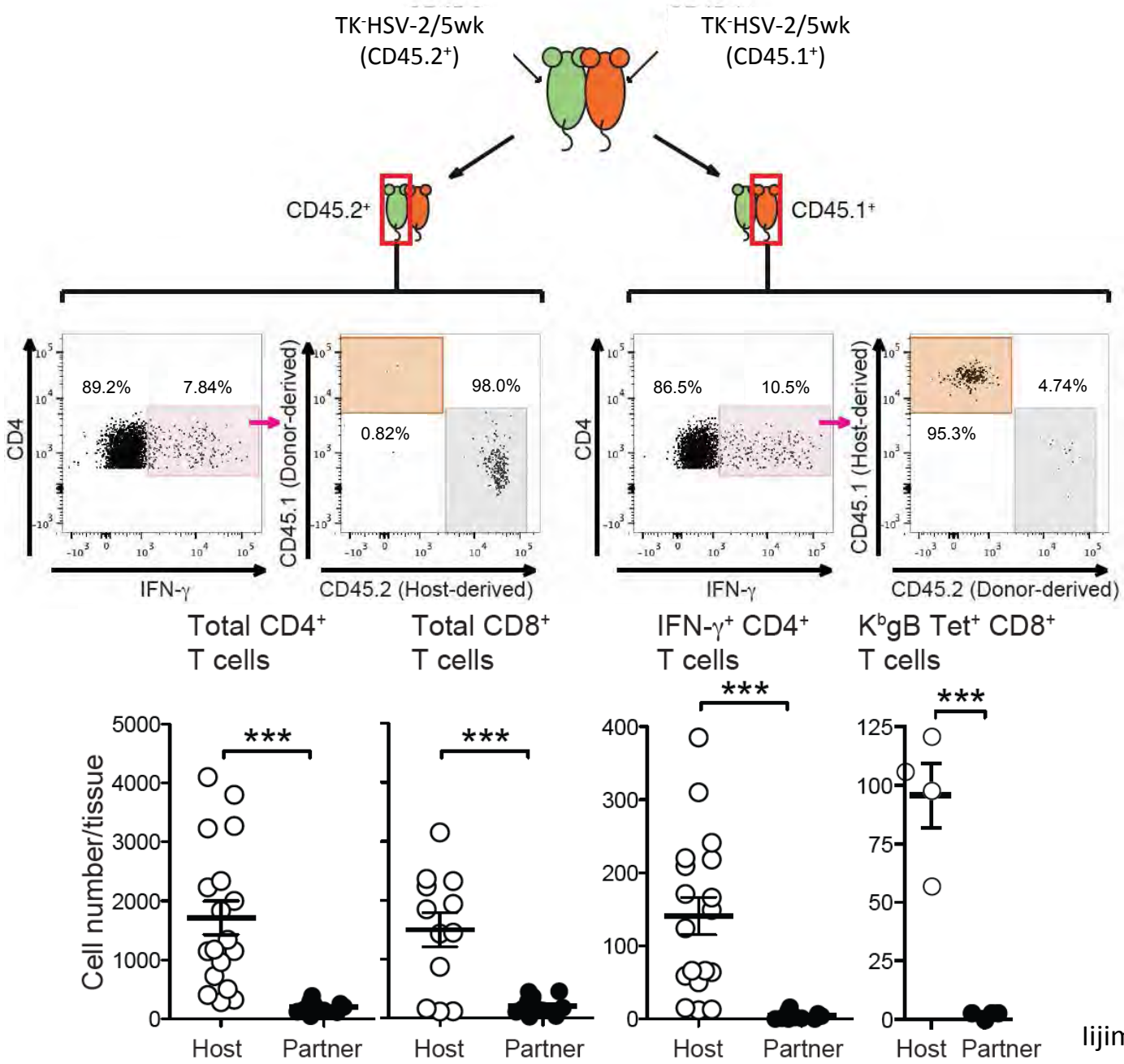
1. How are these memory T cells in MLC maintained in the genital tissues?

Generation of parabiotic pairs (TK-HSV-2 infected x TK-HSV-2 infected)



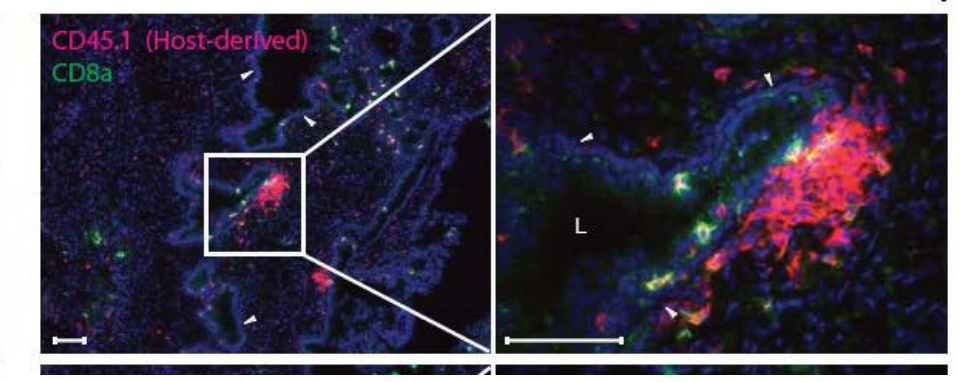
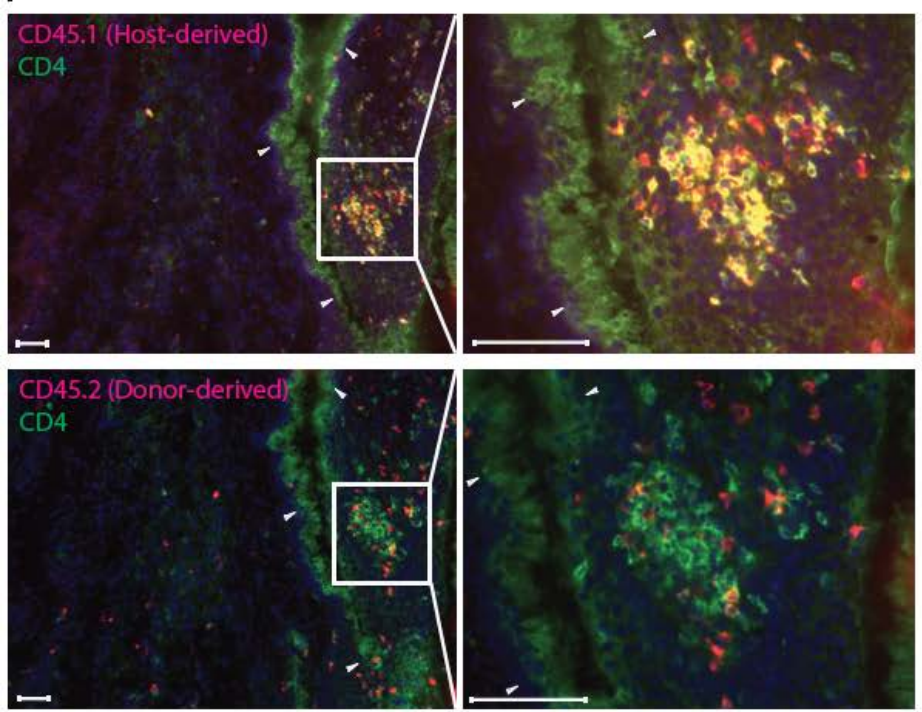
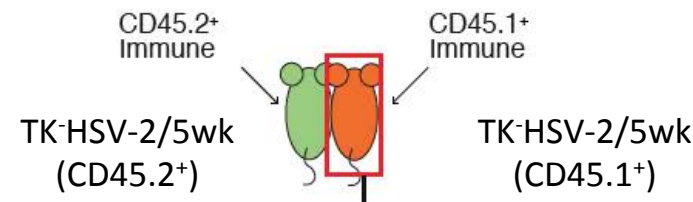
Question:

1. How are these memory T cells in MLC maintained in the genital tissues?

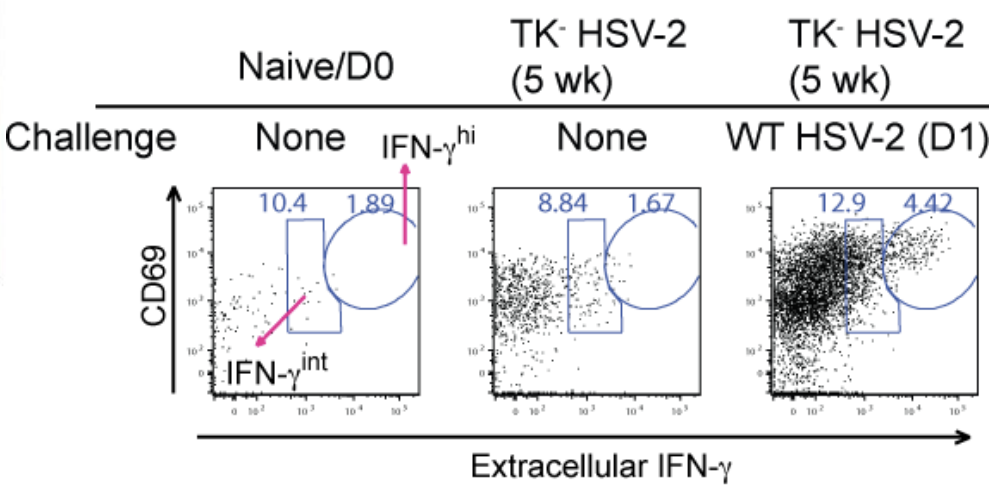


Question:

1. How are these memory T cells in MLC maintained in the genital tissues?



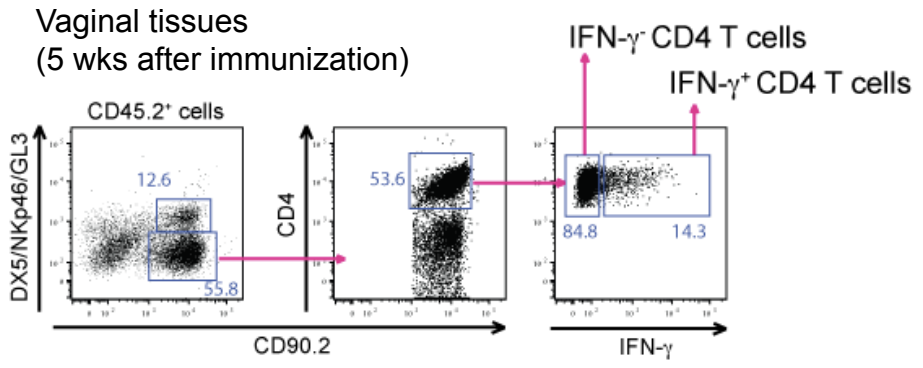
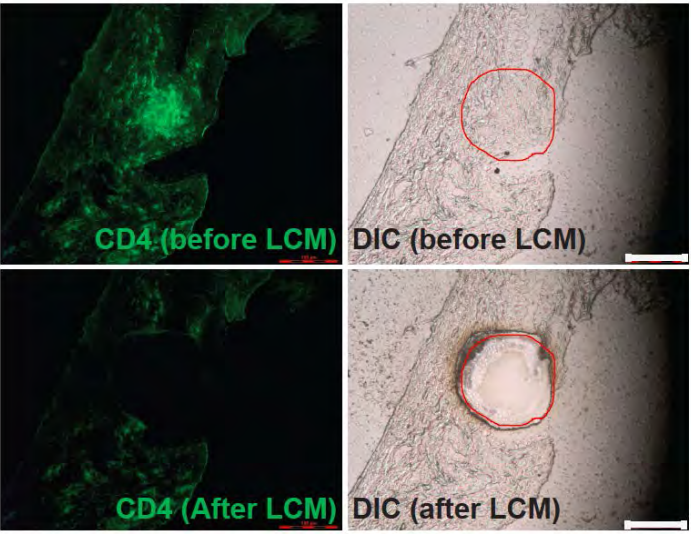
CD4 T cells (CD45.2⁺Tcrβ⁺)



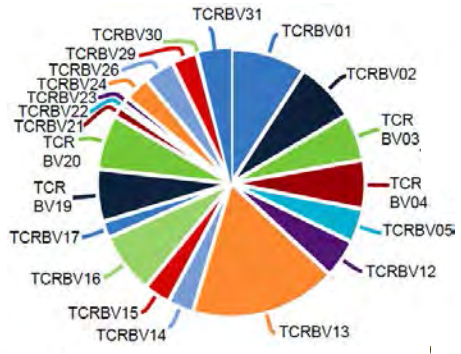
Iijima N. et al. 2014

組織局在型 CD4 陽性メモリー T 細胞 (tissue-resident CD4⁺ memory T cells: CD4⁺T_{RM}) は、HSV-2 再感染後早期に、高濃度の IFN-γ を産生する

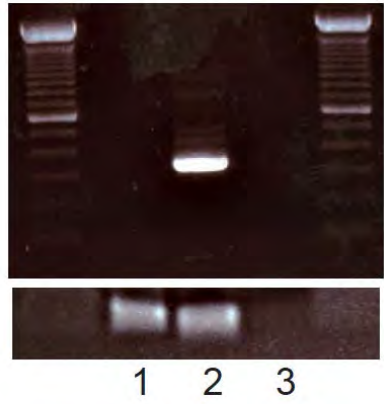
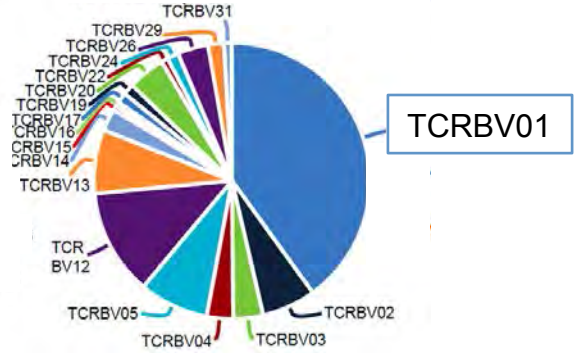
Question:1-3 What kind of memory CD4⁺ T cells are retained in MLCs?



Vaginal tissue (TK-HSV-2 5wk)

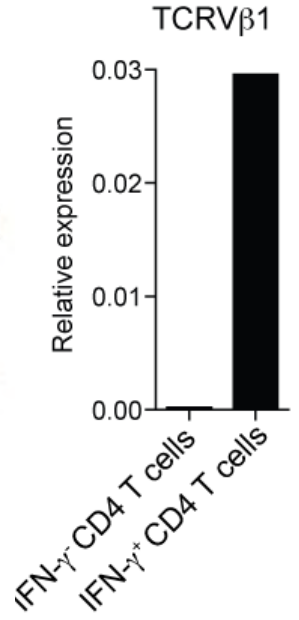


CD4⁺ T cells in MLC (LCM) (5wk)



1. IFN- γ ⁻ CD4 T cells
2. IFN- γ ⁺ CD4 T cells
3. Water

-TCRV β 1
-GAPDH



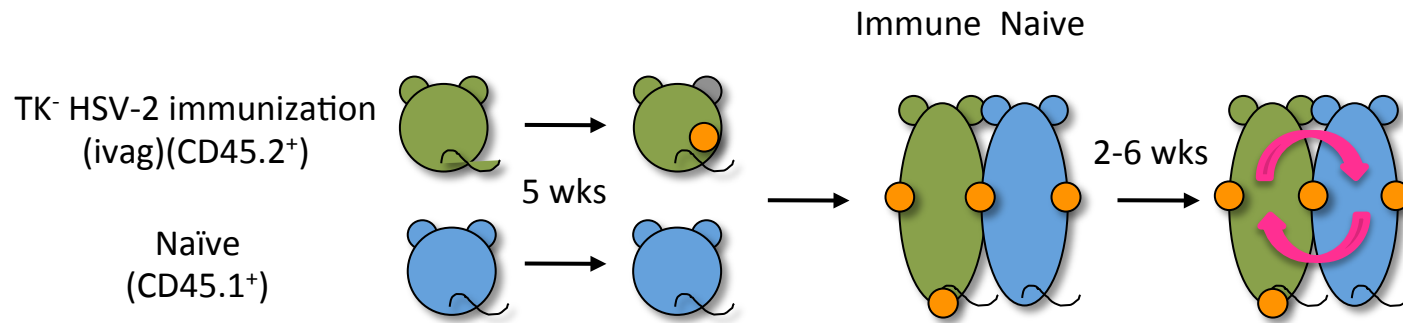
Iijima N. et al. 2014

MLCs are highly enriched for TCRV β 1⁺ HSV-2-specific CD4 T_{RM} following HSV-2 immunization (>5 wk).

Question:

2. What is the physiological importance of the MLC including tissue-resident Th1 cells against HSV-2 infection?

Generation of parabiotic pairs (Immunized x Naïve)



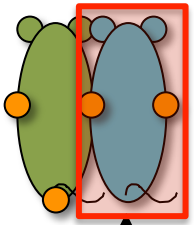
| Group # | Symbol | CD45.2 ⁺ | CD45.1 ⁺ | Viral challenge | Number of pairs |
|---------|--------|---------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| 1 | ■ | Naive WT | Naive WT | CD45.1 ⁺ | 9 |
| 2 | ◆ | Immune WT | Immune WT | CD45.1 ⁺ | 12 |
| 3 | ○ | Immune WT | Naive WT | CD45.1 ⁺ | 20 |
| 4 | ▽ | Immune CD4 ^{-/-} | Naive WT | CD45.1 ⁺ | 3 |
| 5 | □ | Immune WT | Naive IFN- γ R ^{-/-} (CD45.2 ⁺) | Naive IFN- γ R ^{-/-} | 6 |

Question:

2. What is the physiological importance of the MLC including tissue-resident Th1 cells against HSV-2 infection?

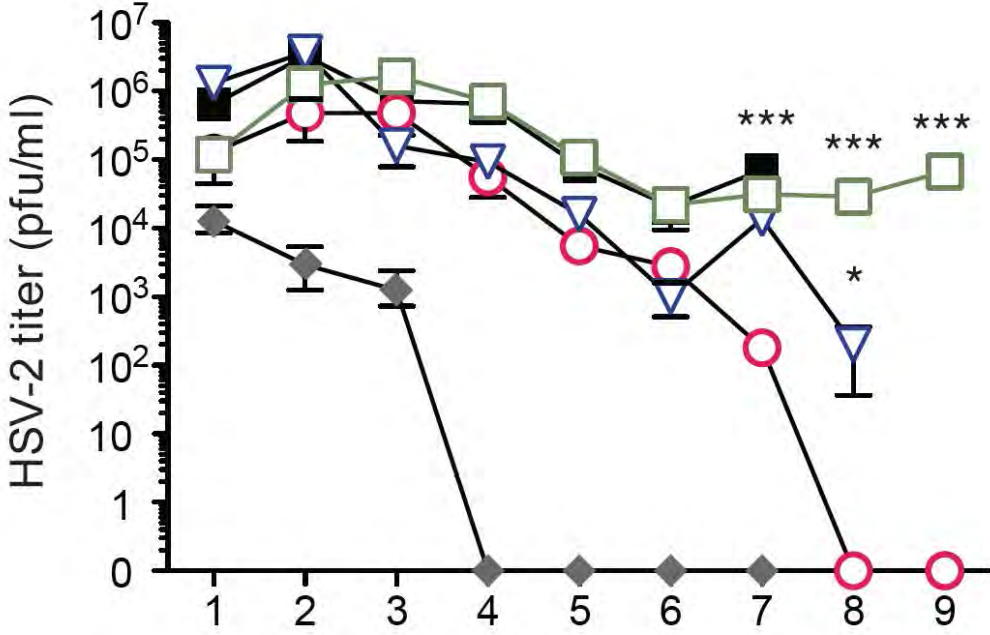
Circulating memory cell-mediated protection against lethal HSV-2 challenge

Immunized Naïve
(CD45.2+) (CD45.1+)



HSV-2 challenge (ivag)

| Group # | Symbol | CD45.2+ | ↔ | CD45.1+ | Viral challenge | Number of pairs |
|---------|--------|---------------------------|---|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| 1 | ■ | Naive WT | | Naive WT | CD45.1+ | 9 |
| 2 | ◆ | Immune WT | | Immune WT | CD45.1+ | 12 |
| 3 | ○ | Immune WT | | Naive WT | CD45.1+ | 20 |
| 4 | ▽ | Immune CD4 ^{-/-} | | Naive WT | CD45.1+ | 3 |
| 5 | □ | Immune WT | | Naive IFN- γ R ^{-/-} (CD45.2 ⁺) | Naive IFN- γ R ^{-/-} | 6 |

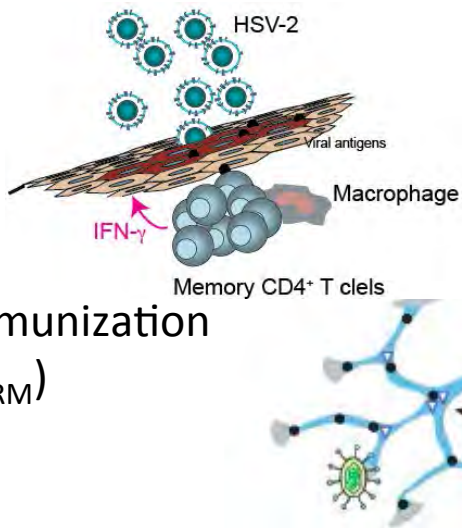


Circulating memory cells are inferior to T_{RM} in suppressing viral replication in genital mucosa.

Summary No.2

Block virus spread
to neuronal tissues

ivag immunization
(with T_{RM})



Axonal compartment

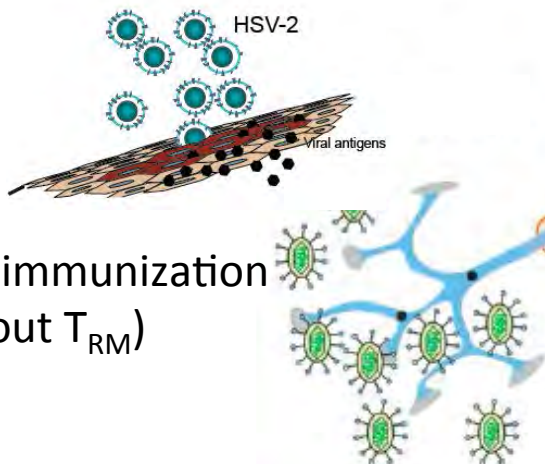
Cell body compartment

Diffusion barrier

Soma (cell body & nucleus)

Circulating memory
 $CD4^+$ T cells

distal immunization
(without T_{RM})



Virus spread to
neuronal tissues

Vascular permeability \uparrow

Blood-Nerve Barrier

