

令和元年5月28日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09585

研究課題名(和文)新規自然免疫受容体による糖鎖依存的なインフルエンザウイルス認識機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of glycosylation-dependent influenza virus recognition mechanism by novel innate immune receptor

研究代表者

植松 崇之 (UEMATSU, Takayuki)

北里大学・北里大学メディカルセンター・上級研究員

研究者番号：90414060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究により、新規自然免疫受容体であるIgSFR2は、インフルエンザウイルス(IFV)のヘマグルチニン(HA)を糖鎖修飾依存的に認識することが明らかになっている。そこで、IgSFR2が認識するHA由来の糖鎖モチーフを化学合成し、*in vitro*および*in vivo*における作用を検討した。その結果、糖鎖モチーフの投与は宿主細胞におけるIgSFR2を介したIFVの吸着もしくは取込機構を競合的に阻害することにより、IFVの細胞への侵入を減少させた。さらに、宿主細胞から産生される炎症性サイトカイン/ケモカイン量が抑制されたため、IFV感染マウスの生存率が改善することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、IFV感染モデルマウスに対するIgSFR2リガンド投与の免疫学的作用を詳細に検討することにより、IFV感染症の重篤例にみられるインフルエンザ肺炎の新たな治療アプローチを開発することができると期待される。また、今後の研究により、IgSFR2を介したHA依存的な宿主細胞へのIFV吸着・侵入機構などの生理的な意義が解明された場合には、HAワクチン副反応の効果的な予測やHAワクチン効果増強への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have revealed that IgSFR2, a novel innate immune receptor, recognizes the hemagglutinin (HA) of influenza virus (IFV) in a glycosylation-dependent manner. Therefore, carbohydrate motifs derived from HA recognized by IgSFR2 were chemically synthesized, and *in vitro* and *in vivo* effects were examined. As a result, administration of carbohydrate motifs reduced the entry of IFV into cells by competitively inhibiting the mechanism of IFV adsorption or uptake via IgSFR2 in host cells. Furthermore, it has been shown that the survival rate of IFV-infected mice is improved because the amount of inflammatory cytokines/chemokines produced from host cells is suppressed.

研究分野：免疫学

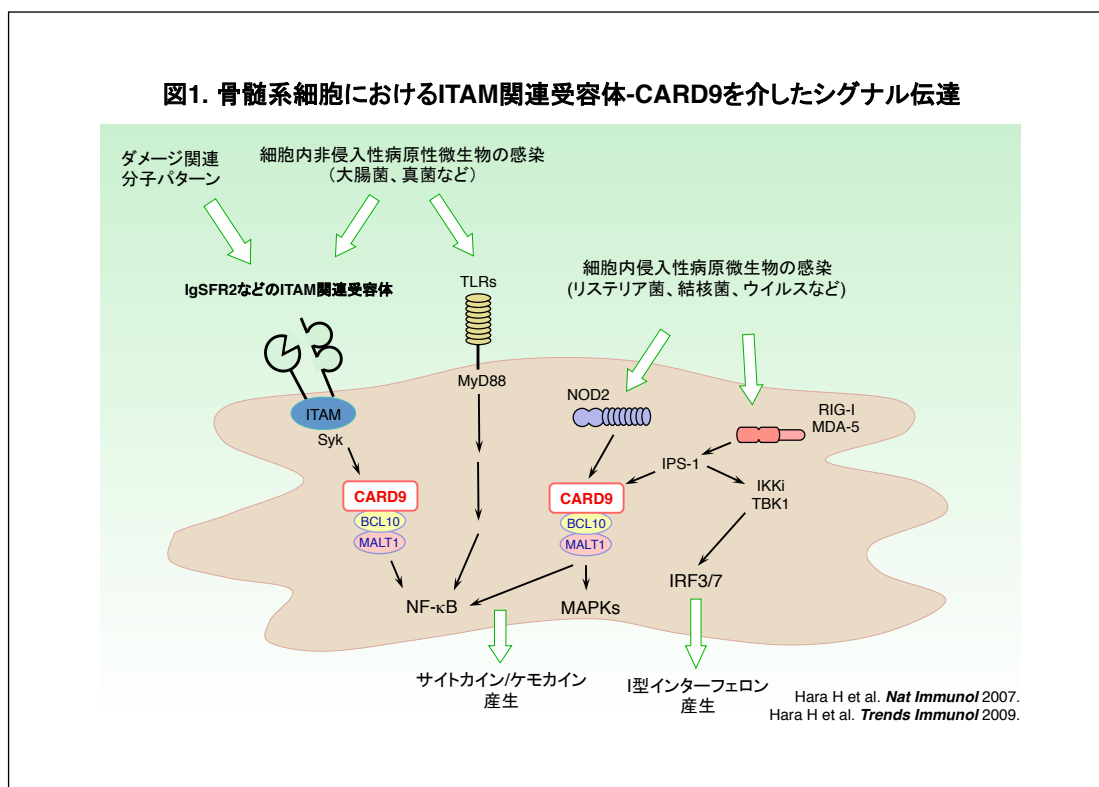
キーワード：インフルエンザウイルス 自然免疫 感染症 シグナル伝達 免疫学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス(IFV)感染症は、小児や高齢者では肺炎や急性脳症を合併する例も多く、注意すべき感染症の一つである。このうち、インフルエンザ肺炎重篤化の要因については、これまで肺炎球菌や黄色ブドウ球菌などによる細菌性複合感染によるところが大きいとされてきたが、近年 IFV 感染マウス肺炎モデルを用いた解析や IFV 感染により急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を発症したヒト検体などを用いた解析の結果、宿主の自然免疫の過剰な活性化が IFV 感染症の重篤化の新たな一因として挙げられている。つまり、しばしば致死的な転帰を辿る IFV 感染症を征圧するためには、感染の時間軸に沿った宿主側の自然免疫系の動態への理解を、より一層深める必要があると言える。

骨髄由来の樹状細胞やマクロファージは、自然免疫系の主要な機能を担っている。これらの細胞は広く生体に分布し、病原微生物と遭遇した場合には病原微生物に由来する様々な分子構造を検知する。樹状細胞やマクロファージに存在するこれらの受容体はパターン認識受容体(PRRs)と呼ばれ、Toll-like receptor (TLR)などが最も良く知られている。IFV 感染時の自然免疫応答に関わる分子については、TLR や RIG-like receptors (RLRs)などの PRRs が良く解析されており、これらの PRRs はウイルスRNAを検知することでI型インターフェロン系を発動させ、効率的なウイルス排除に寄与する。一方、近年活性化モチーフ ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) を有する ITAM 関連受容体が、他の PRRs とは全く異なる病原体関連分子構造 (PAMPs) を認識し、共通のアダプター分子である CARD9 を通じて活性化シグナルを伝達することで、新たな PRRs として機能することが報告されており、注目を集めている(図1参照)。



これに関連して、我々はこの CARD9 シグナルに注目して解析を進めた結果、IFV 感染に伴う自然免疫の過剰な活性化に、樹状細胞における CARD9 シグナルを介した自然免疫応答機構が関与し、*Card9* 欠損マウスでは野生型マウスに比較してインフルエンザ肺炎に付随する症状が軽減することを明らかにしている(Uematsu T. et al. *Sci Rep.* 2015.)。こうした背景の元、さらに *in vitro* で IFV と結合する ITAM 関連受容体のスクリーニングを実施したところ、複数の ITAM 関連受容体が IFV と結合することが示された。このうち、IgSFR2 はインフルエンザウイルスの赤血球凝集素(ヘマグルチニン:HA)に付加される糖鎖構造依存的に IFV と結合し、レポーター細胞において NFAT 活性化シグナルを細胞内へと伝達できること、さらには *Igsfr2* 欠損 (*Igsfr2*^{-/-}) マウスでは *Card9* 欠損マウスと同様にインフルエンザ肺炎に付随する症状が軽減されることが明らかとなった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、ITAM 関連受容体 IgSFR2 が認識する IFV HA の具体的な糖鎖修飾構造とその認識機構を、生化学的手法および細胞生物学的的手法により詳細に明らかにすることを目的とした。続いて、IFV 感染モデルマウスに対する糖鎖モチーフ投与の安全性および免疫学的作用を検討する

ことにより、IFV 感染症の重篤例にみられるインフルエンザ肺炎の新たな治療アプローチを開拓することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IgSFR2 が認識する糖鎖モチーフの大量合成

糖鎖アレイ解析の結果既に明らかとなっている、IgSFR2 が認識すると考えられる糖鎖モチーフの大量合成を民間企業に委託し、これを実施した。

(2) 質量分析計を用いた IFV HA の糖鎖修飾構造の網羅的解析

先行する研究でこれまで使用してきた亜型の異なる複数の IFV (H1N1, N5N1, H7N9 など) に由来する HA について、脱糖鎖処理によって回収された N 型糖鎖に関する網羅的な質量分析を実施し、IgSFR2 が認識する糖鎖修飾構造が、実際に IFV HA に存在するか否かを解析した。

(3) 樹状細胞およびマクロファージに由来する炎症性サイトカイン/ケモカイン産生に対する糖鎖モチーフの生理作用および免疫学的作用に関する解析

マウス生体および組織に由来する複数の樹状細胞およびマクロファージを準備し、糖鎖モチーフで細胞を刺激した場合の炎症性サイトカイン/ケモカイン産生を、ELISA にて解析した。また、これらの細胞を IFV で刺激した際に糖鎖モチーフが共存する場合、炎症性サイトカイン/ケモカインの産生がどのように増減するかを合わせて検討した。

(4) マウス生体に対する糖鎖モチーフ投与の生理活性および安全性に関する検討

野生型 C57BL/6 マウスの気道を外科的に切開し、糖鎖モチーフを投与した後、体重測定を含む経日的な状態観察を 28 日間連続で実施した。なお、実験には単回投与群 (10 μ M の濃度にて初回のみ投与) および反復投与群 (10 μ M の濃度にて週 1 回、合計 4 回投与) を設定した。投与最終日には全例を解剖し、各臓器の所見を目視で観察した。

(5) IFV 経気道感染モデルマウスに対する糖鎖モチーフ投与の免疫学的作用の検討

野生型 C57BL/6 マウスにマウス馴化 IFV を経気道感染させ、IFV 感染マウス肺炎モデルを構築した。実験では、マウス馴化 IFV A/PR/8/34 (H1N1) 株を経気道感染させると同時に糖鎖モチーフを 10 μ M の濃度にて単回投与し、経日的な状態観察に加えて、段階的に CT (Computed Tomography) 像を撮影した。

4. 研究成果

(1) IgSFR2 が認識する糖鎖モチーフの大量合成

研究の過程において、糖鎖の大量合成には多額の費用がかかることが判明したため、前年度までにエモリー大学およびハーバード大学との国際共同研究の結果実施した糖鎖アレイ解析の結果を基に、IgSFR2 が認識すると考えられる最小の糖鎖モチーフを再度精査し、注目する 1 種類のアジアロ糖鎖構造について東京化成工業(株)に化学合成を依頼した。化学合成の結果、mg オーダーでの糖鎖モチーフを得ることに成功した。

(2) 質量分析計を用いた IFV HA の糖鎖修飾構造の網羅的解析

HEK293 細胞で発現させた亜型の異なる複数の IFV (A/PR/8/34(H1N1) 株、A/California/07/2009(H1N1) 株、A/HongKong/483/97(H5N1) 株、A/Shanghai/1/2013(H7N9) 株) に由来する HA について、脱糖鎖処理によって回収された N 型糖鎖に関する網羅的な質量分析を実施したところ、株毎の存在量は異なるものの、IgSFR2 によって認識されるアジアロ糖鎖構造は全ての株に由来する HA に共通して存在することが確認された。

(3) 樹状細胞およびマクロファージに由来する炎症性サイトカイン/ケモカイン産生に対する糖鎖モチーフの生理作用および免疫学的作用に関する解析

マウス生体および組織に由来する複数の樹状細胞およびマクロファージを準備し、糖鎖モチーフで細胞を刺激した場合の炎症性サイトカイン/ケモカイン産生を、ELISA にて解析した。その結果、糖鎖モチーフ単体ではこれらの細胞に対する免疫刺激活性を有さず、炎症性サイトカイン/ケモカインの産生は全く認められなかった。次に、これらの細胞を IFV で刺激すると同時に、(1)にて合成した糖鎖モチーフを添加したところ、糖鎖モチーフの濃度依存的に IFV 刺激によって産生される炎症性サイトカイン/ケモカイン量が減弱することが明らかとなった。

(4) マウス生体に対する糖鎖モチーフ投与の生理活性および安全性に関する検討

野生型 C57BL/6 マウスの気道を外科的に切開し、糖鎖モチーフを投与した後、体重測定を含む経日的な状態観察を実施した。糖鎖モチーフを単回のみ投与、あるいは複数回投与したいずれの場合においても、マウスに目立った変化は認められなかった。

(5) IFV 経気道感染モデルマウスに対する糖鎖モチーフ投与の免疫学的作用の検討

野生型 C57BL/6 マウスにマウス馴化 IFV を経気道感染させると同時に糖鎖モチーフを単回投与し、経日的な状態観察に加えて、段階的に CT(Computed Tomography)像を撮影した。その結果、IFV 感染時に糖鎖モチーフを同時に投与したマウスでは、IFV 感染のみの実験対照に比較して生存率が改善し、肺組織障害も顕著に抑制されていることが明らかになった。

以上のことから、IgSFR2 結合糖鎖モチーフは *in vitro* のみならず *in vivo* においても、IFV の吸着もしくは取込機構を競合的に阻害することにより IFV の感染効率を低下させ、結果としてインフルエンザ肺炎の増悪化を抑制する作用があることが確認された。今後は特に *in vivo* における IgSFR2 依存的な IFV 感染成立機構の効率的な阻害に目を向け、IgSFR2 を標的としたインフルエンザ肺炎の治療法開発に向けた基礎的知見を集積していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Yokomori H., Obu M., Uematsu T., Okada T., Yamazaki H., Oda M. Activating dendritic cell of endotheliitis is a significant finding in acute presentation of autoimmune hepatitis. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(52):e13873.
DOI:10.1097/MD.0000000000013873.
- ② Yasuoka Y., Izumi Y., Nagai T., Fukuyama T., Nakayama Y., Inoue H., Horikawa K., Kimura M., Nanami M., Yanagita K., Oshima T., Yamazaki T., Uematsu T., Yamamura R., Kobayashi N., Shimada Y., Nagaba Y., Nakanishi T., Yamashita T., Mukoyama M., Sato Y., Kawahara K., Nonoguchi H. Fludrocortisone stimulates Erythropoietin production in the intercalated cells of the collecting ducts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(4):3121-7.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.102.
- ③ Yamazaki T., Hatano Y., Handa T., Kato S., Hoida K., Yamamura R., Fukuyama T., Uematsu T., Kobayashi N., Kimura H., Yamagata K. Targeted DNA Methylation in Pericentromeres with Genome Editing-Based Artificial DNA Methyltransferase. *PLoS One* 2017;12(5):e0177764.
DOI: 10.1371/journal.pone.0177764.
- ④ Asama T.*, Uematsu T.*, Kobayashi N., Tatefuji T., Hashimoto K. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus kunkeei* YB38 improves murine influenza pneumonia with enhancing IgA production. *Biosci Microbiota Food Health.* 2017;36(1):1-9. *These authors contributed equally to this work.
DOI: 10.12938/bmfh.16-010.
- ⑤ Uematsu T., Fujita T., Nakaoka J.H., Hara T., Kobayashi N., Murakami Y., Seiki M., Sakamoto T. Mint3/Apba3 depletion ameliorates severe murine influenza pneumonia and macrophage hyperactivation mediated by the influenza virus. *Sci Rep.* 2016;6:37815.
DOI: 10.1038/srep37815.

[学会発表] (計 1 3 件)

- ① Uematsu Takayuki, Iizasa Ei-ichi, Kobayashi Noritada, Yoshida Hiroki, Hara Hiromitsu. Regulation of innate immunity through ITAM-coupled receptors in influenza virus infection. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology 2018 年
- ② 植松 崇之、飯笹 英一、小林 憲忠、吉田 裕樹、原 博満 インフルエンザウイルス感染における ITAM 関連受容体を介した自然免疫調節機構の解析 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 2018 年
- ③ 植松 崇之、藤田 智子、中岡 寛樹、原 敏朗、小林 憲忠、村上 善則、清木 元治、坂本 毅治 インフルエンザウイルス感染における HIF-1 活性化因子 Mint3 を介した自然免疫応答機構の解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年
- ④ 植松 崇之、藤田 智子、中岡 寛樹、原 敏朗、小林 憲忠、村上 善則、清木 元治、坂本 毅治 インフルエンザウイルス感染における HIF-1 活性化因子 Mint3 を介した自然免疫応答機構の解析 第 28 回日本生体防御学会学術総会 2017 年
- ⑤ Uematsu Takayuki, Iizasa Ei-ichi, Kobayashi Noritada, Yoshida Hiroki, Hara Hiromitsu. Regulation of innate immunity through ITAM-coupled receptors in influenza virus infection. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Immunology 2016 年

- ⑥ 植松 崇之、飯笹 英一、小林 憲忠、吉田 裕樹、原 博満 インフルエンザウイルス感染における ITAM 関連受容体を介した自然免疫調節機構の解析 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年
- ⑦ 植松 崇之、飯笹 英一、小林 憲忠、吉田 裕樹、原 博満 インフルエンザウイルス感染における ITAM 関連受容体シグナルを介した自然免疫調節機構の解析 第 27 回日本生体防御学会学術集会 2016 年

[その他]

- ① 植松 崇之 ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI 研究成果の社会還元・普及事業「ウイルスってなあに？～目には見えないウイルスを検出してみよう！～」2018 年
- ② 植松 崇之 静岡県立浜松大平台高等学校 免疫学・感染症に関する特別講義「感染症と人類の戦い～感染症が歴史を作る～」2018 年
- ③ 植松 崇之 静岡県立浜松大平台高等学校 免疫学・感染症に関する特別講義「感染症と人類の戦い～感染症が歴史を作る～」2017 年
- ④ 植松 崇之 ひらめき☆ときめきサイエンス～ようこそ大学の研究室へ～KAKENHI 研究成果の社会還元・普及事業「ワクチンのふしぎ～体のなかでインフルエンザウイルスと戦う抗体を検出してみよう！～」2016 年

ホームページ等

<https://researchmap.jp/tuematsu/>

6. 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：飯笹 英一

ローマ字氏名：(IIZASA, Ei-ichi)

研究協力者氏名：原 博満

ローマ字氏名：(HARA, HHiromitsu)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。