

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15296

研究課題名(和文)腸内細菌によるインフルエンザ防御抗体の制御

研究課題名(英文)Regulation of influenza protective antibody responses by microbiota

研究代表者

高橋 宜聖 (Takahashi, Yoshimasa)

国立感染症研究所・免疫部・部長

研究者番号：60311403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インフルエンザヘマグルチニン(HA)に結合するモノクローナル抗体パネルと、腸内細菌ライブラリーとの結合性を調べた結果、特定の腸内細菌に結合する交叉性HA抗体を特定した。この交叉性HA抗体を変異前の状態(germline型)に戻した抗体でも腸内細菌への結合性が損なわれないことが確認され、腸内細菌への結合性は抗原刺激を受ける前の抗体レパトアにおいて獲得された性質と考えられた。無菌マウスや抗生物質の経口投与により腸内細菌を除去したマウスを用い、交叉性B細胞の分化・維持に及ぼす腸内細菌の役割を調べたところ、腸内細菌が一部組織の交叉性B細胞に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have investigated cross-reactivity of influenza hemagglutinin-binding monoclonal antibody panel to microbiota and identified several HA-binding monoclonal antibodies that are reactive to particular microbiota. Germline-reverted forms of antibodies possessed the cross-reactivity, indicating that the reactivity was already acquired in pre-immune status. Removal of microbiota using germ-free mice or antibiotics-treated mice elucidated the possible links between antigen-driven B cell development and microbiota. Thus, microbiota shapes the antibody repertoires to influenza viruses in both pre-immune and post-immune status.

研究分野：感染免疫学

キーワード：インフルエンザ 腸内細菌

#### 1. 研究開始当初の背景

近年、変異インフルエンザウイルスを広範囲に中和する交叉防御抗体の存在が明らかとなり、この抗体の誘導を目的としたワクチン開発が国内外で精力的に進められている。しかし、抗原特異的な抗体レパトアにシめる交叉性抗体の割合はわずかと推定され、この抗体の誘導が困難な要因として、交叉性抗体の認識する抗原エピトープが、抗体がアクセスできないように物理的に隠れていることや(低抗原性)この抗原エピトープが自己抗原に擬態している可能性(自己擬態)が示唆されているが、詳細は不明である。我々は、非特異的な細胞吸着性が高いことから困難とされてきたインフルエンザヘマグルチニン(HA)結合性B細胞を特殊なプローブを用いて同定・単離する技術開発に成功し、その後、プローブに更なる改良を加えることにより、変異ウイルスに交叉可能なB細胞の分離法を確立した。このB細胞の抗体遺伝子を分離し交叉性HAモノクローナル抗体パネルを作製したところ、この抗体が腸内細菌と何らかの相互作用を行う可能性を見出された。そのため、抗原エピトープの低抗原性・自己擬態といった要因に加えて、腸内細菌が交叉性HA抗体の産生制御に関わる可能性が推察されていた。

#### 2. 研究の目的

本研究では、交叉性HA抗体ならびに発現B細胞が腸内細菌とクロストークすることによって、この抗体産生が負に制御されている可能性について検証した。特に、交叉性HA抗体と腸内細菌がどのようにクロストークするのか、モノクローナル抗体を用いて結合性を詳細に解析するとともに、腸内細菌の存在しないマウスを用いることで、交叉性HA抗体産生がどのような影響を受けるのか、明らかにする目的で研究を実施した。

#### 3. 研究の方法

1)交叉性HAモノクローナル抗体パネルと種々の腸内細菌属に属する菌株を使用して、交叉性HA抗体の中から、腸内細菌株に結合する抗体と菌株のペアを特定した。さらに、交叉性抗体の体細胞突然変異前の状態(germline型)と変異後(mutation型)のどの段階で交叉性を獲得するのか明らかにするため、mutation型の交叉性HA抗体とともに、germline型の交叉性HA抗体を組換えモノクローナル抗体として作成し、腸内細菌との結合性を詳細に比較解析した。

2)無菌マウスや確立されているプロトコルに従って抗生物質の経口投与により腸内細菌を除去したマウスを作成した。これにインフルエンザワクチンを接種した後、交叉性B細胞の産生kineticsを様々な組織で追跡するとともに、抗体産生分化能を詳細に解析することで、腸内細菌が交叉性HA抗体産生に及ぼす影響を評価した。

#### 4. 研究成果

1)特定の腸内細菌に結合する交叉性HAモノクローナル抗体を特定した。この交叉性HA抗体を変異前の状態(germline型)に戻した抗体でも腸内細菌への結合性が損なわれないことが確認され、腸内細菌への結合性は抗原刺激を受ける前の抗体レパトアに獲得されている性質であると考えられた。実際、抗原刺激を与えていない通常マウスの血液中でも、交叉性HAポリクローナル抗体が含まれていることも確認された。

2)無菌マウスや抗生物質の経口投与により腸内細菌を除去したマウスを用い、交叉性B細胞の分化・維持に及ぼす腸内細菌の役割を調べたところ、腸内細菌が一部組織の交叉性B細胞に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、無菌マウス等を用いた解析から、腸内細菌がインフルエンザワクチンで誘導される獲得性B細胞応答にも影響を与えることを見出した。

以上の結果から、腸内細菌は、抗原刺激を受ける前の免疫系に作用して、交叉性HA抗体レパトアの形成・維持に影響を与えるとともに、インフルエンザワクチン接種後に誘導される抗体産生応答とクロストークすることが明らかとなった。このことは、腸内細菌によって交叉性HA抗体産生を制御し、インフルエンザ感染防御能を調節する新しい戦略の可能性を示唆するものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1) Takahashi, Y. and Kelsoe, G. Role of germinal centers for the induction of broadly-reactive memory B cells. *Curr. Opin. Immunol.* 45:119-125. 2017 doi: 10.1016/j.coi.2017.03.002.

2) Miyachi, K., Sugimoto-Ishige, A., Harada, Y., Adachi, Y., Usami, Y., Kaji, T., Hasegawa, H., Watanabe, T., Hijikata, A., Fukuyama, S., Maemura, T., Ohara, O., Kawaoka, Y., Takahashi, Y., Takemori, T., Kubo, M. Protective neutralizing influenza antibody response in the absence of T follicular helper cells. *Nat. Immunol.* 17:1447-1458, 2016.

3) Shinnakasu, R., Inoue, T., Kometani, K., Moriyama, S., Adachi, Y., Nakayama, M., Takahashi, Y., Fukuyama, H., Okada, T., Kurosaki, T. Regulated selection of germinal center B cells into the memory compartment. *Nat. Immunol.* 17:861-869, 2016.

4) Shiokawa, A., Kotaki, R., Takano, T., Nakajima-Adachi, H., Hachimura S. Mesenteric lymph node CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>PD-L1<sup>High</sup> dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology* 152:52-64, 2017.

〔学会発表〕(計 16 件)

- 1) Adachi, Y., Nithichanon, A., Kuraoka, M., Kelsoe, G., Ato, M., Takahashi, Y. Influenza hemagglutinin epitopes emerging at viral replication sites promote the clonal selection and plasma cell development of broadly protective B cells. Keystone symposia, Emerging Technologies in Vaccine Discovery and Development, Banff, Canada, 2018 年 1 月 31 日
- 2) Takahashi, Y. Induction of broadly-protective B cell responses to mutating viruses. 第 46 回日本免疫学会総会シンポジウム 仙台 2017 年 12 月 14 日
- 3) Takahashi, Y., Adachi, Y., Onodera, T., Ato, M.: Regulation of antibody breadth to mutating viruses through distinct germinal center selection. The 16<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity 淡路島 2017 年 9 月 7 日
- 4) Onodera, T., Ato, M., Takahashi, Y. Broadly cross-reactive human memory B cells against norovirus express dual B cell antigen receptors. 第 45 回日本免疫学会総会 沖縄 2016 年 12 月 7 日
- 5) Adachi, Y., Ato, M., Takahashi, Y. Different accessibility of strain-specific versus cross-reactive BCRs to virus particles regulates site-specific germinal center selection. 第 45 回日本免疫学会総会 沖縄 2016 年 12 月 7 日
- 6) Nakahara, M., Takatsuka, S., Ueno K., Onodera, T., Takahashi, Y., Kawakami, K., Kubo, M., Kinjo, Y. Follicular helper NKT cells induce protective effect of a protein-based pneumococcal vaccine through stimulation of IgG production by B cells. 第 45 回日本免疫学会総会 沖縄 2016 年 12 月 7 日
- 7) 糸賀翔大, 新井聡, 岩淵紀介, 上滝隆太郎, 佐藤風太, 芝原恭子, 清水金忠, 阿部文明, 八村敏志 . 乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849 による濾胞性ヘルパーT 細胞誘導機構の解析 . 第 20 回腸内細菌学会 東京 2016 年 6 月 10 日
- 8) 高野智弘, 遠藤龍之助, 利光孝之, 足立(中嶋)はるよ, 八村敏志. *Lactobacillus plantarum* OLL2712 株による腸管免疫系および脂肪組織における IL-10 産生誘導効果. 日本食品免疫学会 2016 年度大会 東京 2016 年 11 月 9 日
- 9) 畑井俊哉, 上滝隆太郎, 津田真人, 高橋恭子, 細野朗, 八村敏志 . 腸管関連リンパ組織 (GALT) における自然リンパ球 (ILCs) 応答性の組織特異性解析: 大腸・小腸免疫系の比較 . 日本食品免疫学会 2016 年度大会 東京 2016 年 11 月 9 日
- 10) 芝原恭子, 高橋宜聖, 八村敏志 . 経口免疫寛容において誘導される抗原特異的濾胞性ヘルパーT 細胞の解析 . 日本食品免疫学会 2016 年度大会 東京 2016 年 11 月 9 日
- 11) 畑井俊哉, 上滝隆太郎, 津田真人, 高橋恭子, 細野朗, 八村敏志. 大腸リンパ節特徴的に存在する自然リンパ球の解析 . 日本農芸

化学会 2017 年度大会 京都 2017 年 3 月 19 日

- 12) 芝原恭子, 高橋宜聖, 八村敏志 . 経口免疫寛容における抗原特異的濾胞性ヘルパーT 細胞の解析 . 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都 2017 年 3 月 19 日
- 13) 顧文婷, 森永真実子, 高野智弘, 平出恵利華, 内田健治, 鳥居剛史, 元島英雅, 片野直哉, 足立(中嶋)はるよ, 八村敏志 . 日本食品免疫学会 2017 年度大会 東京 2017 年 11 月 9 日
- 14) 高野智弘, 遠藤龍之助, WANG YIMEI, 利光孝之, 足立(中嶋)はるよ, 八村敏志. *Lactobacillus plantarum* OLL2712 株による腸管免疫系および脂肪組織における抗炎症作用の検討. 日本食品免疫学会 2017 年度大会 東京 2017 年 11 月 9 日
- 15) 寺内篤史, 安達悠, 津田真人, 細野 朗, 八村敏志, 高橋宜聖. インフルエンザに対する B 細胞応答の腸内細菌による制御. 日本食品免疫学会 2017 年度大会 東京 2017 年 11 月 9 日
- 16) 遠藤龍之助, 高野智弘, WANG YIMEI, 利光孝之, 足立(中嶋)はるよ, 八村敏志. *Lactobacillus plantarum* OLL2712 株による腸管免疫系樹状細胞における IL-10 産生誘導効果. 日本農芸化学会 2018 年度大会 名古屋 2018 年 3 月 16 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 宜聖 (Takahashi Yoshimasa)  
国立感染症研究所・免疫部・部長

研究者番号：60311403

(2)研究分担者

八村 敏志 (Hachimura Satoshi)  
東京大学・農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：40238019

(3)連携研究者

小野寺 大志 (Onodera Taishi)  
国立感染症研究所・免疫部・主任研究官  
研究者番号：90513143

(4)研究協力者

( )