

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08935

研究課題名(和文) 新規自然免疫受容体リガンドを用いたインフルエンザ肺炎の実験的治療に関する研究

研究課題名(英文) Study on experimental treatment of influenza pneumonia using novel innate immune receptor ligands

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・室長補佐

研究者番号：90414060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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)のヘマグルチン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、今回の研究では、主にIgSFR2の*in vivo*における機能的阻害によりインフルエンザ肺炎を実験的に治療できるか否かを検討した。その結果、IgSFR2リガンドである糖鎖モチーフを投与したIFV感染モデルマウスでは、IFV感染のみの実験対照群と比較して肺中ウイルス力価が有意に減少した。また、実験動物用CTを用いた解析により肺組織障害の発生も顕著に抑制されていることが明らかになった。

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リガンド投与条件の最適化を行うことにより、IFV感染症の重篤例などにみられるインフルエンザ肺炎の新たな基礎的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、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の原因であるSARS-CoV-2の表層に存在するSタンパクも豊富な糖鎖修飾を受けることが知られている。このため、IFVと同様にSARS-CoV-2に対するIgSFR2依存的なウイルス認識機構が成立する可能性も示唆されることから、本研究を発展させることにより、COVID-19に対する基礎的治療アプローチをも提供できる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies have shown that IgSFR2, a novel innate immune receptor, binds influenza virus (IFV) hemagglutinin in a glycosylation-dependent manner. Therefore, in this study, we mainly investigated whether *in vivo* functional inhibition of IgSFR2 could experimentally treat influenza pneumonia. The results showed that viral titers in the lungs of IFV-infected mouse models treated with the IgSFR2 ligand, glycosylation motif, were significantly reduced compared to the experimental control group. Analysis using CT for experimental animals also revealed that the development of lung tissue damage was also significantly suppressed.

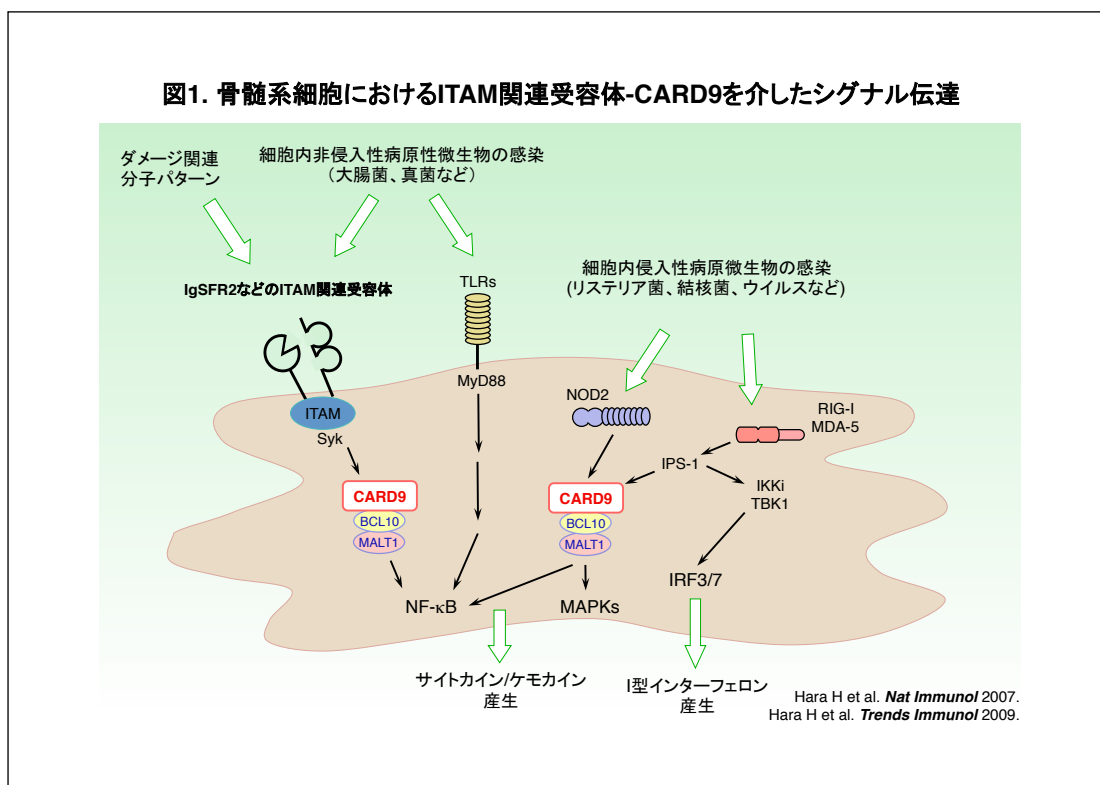
研究分野：免疫学

キーワード：インフルエンザウイルス 自然免疫 呼吸器感染症 シグナル伝達

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。この考え方は 2019 年末より世界的に拡大している新型コロナウイルス感染症(COVID-19)についても同様であり、COVID-19 重篤例においても宿主の自然免疫の過剰な活性化が認められることが明らかとなっている。

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、IgSFR2 は自然免疫系において中心的な役割を果たすマクロファージにおいて高い発現を認めること、さらには *Igsf2* 欠損マウスでは *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 による IFV HA 認識機構の障害がインフルエンザ肺炎の実験的な治療に繋がるか否かを検証すべく、免疫担当細胞のみならず、非免疫担当細胞における IgSFR2 の発現様式と機能についても明らかにすること、さらには IFV 感染モデルマウスを用いて IgSFR2 の *in vivo* における機能的障害によりインフルエンザ肺炎を実験的に治療できるかどうかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 非免疫担当細胞における IgSFR2 依存的な IFV の吸着および侵入機構の解析

本研究で注目する IgSFR2 は、骨髄系細胞のマクロファージなどに高い発現を認めることが確認されている。しかし、その一方で、我々の予備的検討により、IgSFR2 は IFV の直接的な感染標的となる気道上皮細胞などの非免疫担当細胞にも、一定量の発現を認める可能性が示唆されている。そこで、IgSFR2 がこれらの非免疫担当細胞における普遍的な IFV 受容体として機能するか否かを検討した。具体的には、気道上皮細胞株である LA-4、細胞表面上にシアル酸を発現しない CHO 細胞変異株である CHO Lec2 株を用い、これらの細胞にレトロウイルスベクターを用いて IgSFR2 やその下流分子などを強制発現させた。続いて、樹立した細胞に pH インジケータで標識した IFV を感染させ、細胞表面における IFV の吸着と細胞内への侵入について、蛍光顕微鏡を用いて解析した。

### (2) IgSFR2 欠損細胞における IFV の吸着および侵入機構の解析

*Igsf2* 欠損マウスおよび関連分子欠損マウスに由来するマクロファージおよび胎児由来線維芽細胞を用いた実験を行った。具体的には、それぞれのマウスに由来するマクロファージおよび胎児由来線維芽細胞をマウス生体より調製し、これらの細胞に pH インジケータで標識した IFV を感染させ、細胞表面における IFV の吸着と細胞内への侵入について、蛍光顕微鏡を用いて解析した。

### (3) IFV 感染モデルマウスに対する IgSFR2 リガンド投与による実験的治療効果の検討

IgSFR2 の *in vivo* における機能的障害によりインフルエンザ肺炎を実験的に治療できるか否かを検討するため、まず IgSFR2 が結合する糖鎖モチーフを単回 (10 $\mu$ M の濃度にて初回のみ投与)あるいは複数回 (10 $\mu$ M の濃度にて 1 日 1 回、5 日間投与) マウスに経鼻投与した場合の安全性を確認した。その後、マウス馴化 IFV A/PR/8/34 (H1N1)株を C57BL/6 系統マウスに感染させることにより作出した IFV 感染モデルマウスに糖鎖モチーフを経鼻投与した場合の *in vivo* における治療効果について、臨床的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 非免疫担当細胞における IgSFR2 依存的な IFV の吸着および侵入機構の解析

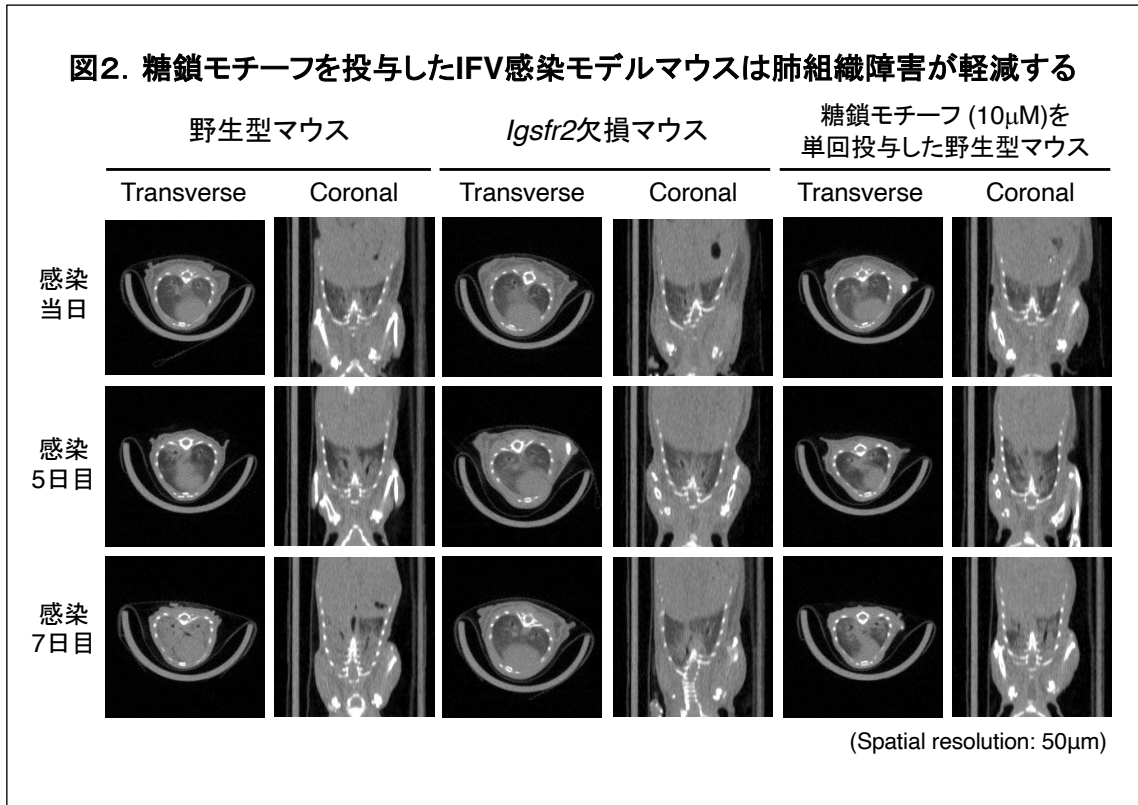
LA-4 および CHO Lec2 株にレトロウイルスベクターを用いて IgSFR2 を強制発現させた場合、IFV の細胞表面への吸着や細胞内侵入は IgSFR2 の発現量依存的に有意に増加することが明らかとなった。また、IgSFR2 の強制発現による IFV の細胞表面への吸着や細胞内侵入の増強はウイルス株の違いには依存しなかったことから、IgSFR2 を介した IFV 認識は宿主シアル酸非依存的であり、広範な IFV 系統に対して普遍的であると示唆された。一方で、DAP12, Syk や CARD9 などの IgSFR2 の下流に位置するシグナル伝達分子の強制発現は、IFV の細胞表面への吸着や細胞内侵入に対して明確な作用を与えなかった。

### (2) IgSFR2 欠損細胞における IFV の吸着および侵入機構の解析

*Igsf2* 欠損マウスおよび関連分子欠損マウスに由来するマクロファージおよび胎児由来線維芽細胞を用いて前項と同様の実験を実施したところ、*Igsf2* 欠損マウスに由来するマクロファージや線維芽細胞では、IFV の細胞表面への吸着や細胞内侵入が有意に抑制されることを確認することができた。しかし、DAP12, Syk や CARD9 などを欠損するマクロファージや線維芽細胞では、培養細胞株を用いた検討の場合と同様に、IFV の細胞表面への吸着や細胞内侵入に対して明確な差異を認めなかった。

### (3) IFV 感染モデルマウスに対する IgSFR2 リガンド投与による実験的治療効果の検討

IgSFR2 が結合する糖鎖モチーフを単回あるいは複数回 C57BL/6 系統マウスに経鼻投与した場合、マウスには外見所見上および剖検上の著変が認められないことを確認した。続いて、作出した IFV 感染モデルマウスに糖鎖モチーフを単回経鼻投与した場合の *in vivo* における実験的治療効果を検討したところ、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肺中ウイルス力価が有意に減少するとともに、肺組織障害の発生も顕著に抑制されていることが明らかになった(図 2 参照)。



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を抑制する可能性を有することが確認された。今後は、IFV 感染モデルマウスに対する IgSFR2 リガンド投与条件のさらなる最適化を行うことにより、IFV 感染症の重篤例などにみられるインフルエンザ肺炎の新たな基礎的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、COVID-19 の原因である SARS-CoV-2 の表層に存在する S タンパクも豊富な糖鎖修飾を受けることが知られている。このため、IFV と同様に SARS-CoV-2 に対する IgSFR2 依存的なウイルス認識機構が成立する可能性も示唆されることから、本研究をさらに発展させることにより、COVID-19 に対する基礎的治療アプローチをも提供できる可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 9件）

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤、森 雅亮、日本小児リウマチ学会	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 328
3. 書名 小児リウマチ学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原 博満 (Hara Hiromitsu) (20392079)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	
研究協力者	飯笹 英一 (Iizasa Eiichi) (20631998)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教  (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	University of Washington	Emory University	Harvard University