

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03491

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス特異的な免疫応答を高める上気道常在菌の探索

研究課題名(英文) Search for upper respiratory tract bacteria that enhance influenza virus-specific immune responses

研究代表者

一戸 猛志 (Ichinohe, Takeshi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：10571820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：上気道常在菌がウイルス特異的な免疫応答の誘導やワクチン効果に与える影響は不明である。そこで本研究では、上気道常在菌がインフルエンザウイルス特異的な免疫応答の誘導やワクチン効果に与える影響を解析した。マウスの上気道常在菌を抗生物質で死滅させるとインフルエンザウイルス感染後に誘導されるウイルス特異的な抗体応答が増加することを見出した。培養した口腔菌をワクチンと混合して経鼻投与すると、ワクチン接種群ではウイルスに対する抗体が誘導され、インフルエンザウイルスやSARS-CoV-2の増殖量が有意に抑制されていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究から、経鼻インフルエンザワクチンはウイルスの感染の場となる上気道粘膜にウイルス特異的なIgA抗体を誘導するため、ウイルスの感染そのものを阻止することができる有効なワクチンであることが明らかになっている。このことから、日本でも経鼻投与型のインフルエンザワクチンが実用化する予定である。本研究成果はこのような経鼻ワクチンの効果を高めるために必要な重要な知見であり、より少ない量のワクチンで最大限の効果を発揮する経鼻ワクチンの開発研究に役立つと期待される。今後は新型コロナウイルスの感染そのものを阻止することができる有効な経鼻ワクチンを開発することを目指す。

研究成果の概要(英文)：Therefore, understanding how mucosal immune responses are elicited following viral infection is important for developing better vaccines. Here, we focused on the role of nasal commensal bacteria in the induction of immune responses following influenza virus infection. To deplete nasal bacteria, we intranasally administered antibiotics to mice before influenza virus infection and found that antibiotic-induced disruption of nasal bacteria could release bacterial components which stimulate the virus-specific antibody responses. Intranasal supplementation of cultured oral bacteria from a healthy human volunteer enhanced antibody responses to the intranasally administered vaccine. Therefore, both integrity and amounts of nasal bacteria may be critical for an effective intranasal vaccine.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

経鼻インフルエンザワクチンに関するこれまでの研究から、経鼻ワクチンはウイルスの感染の場となる上気道粘膜にウイルス特異的な IgA 抗体を誘導するため、ウイルスの感染そのものを阻止する有効なワクチンであることが分かっていました。しかしスプリットワクチンであるインフルエンザウイルスの HA ワクチンだけを経鼻投与しても十分な抗体応答を誘導できないため、ワクチンにアジュバントを添加する必要性がありました。また腸内細菌がワクチン効果に与える影響は解明されてきた一方、上気道常在菌が経鼻ワクチンの効果に与える影響については不明でした。

### 2. 研究の目的

本研究では、上気道常在菌が経鼻インフルエンザワクチンの効果に与える影響について解析することを目的としました。

### 3. 研究の方法

#### 1. Mice.

Age- and sex-matched BALB/c mice obtained from Japan SLC, Inc., were used as WT controls. MyD88-deficient BALB/c mice were purchased from Oriental Bioservice (Kyoto, Japan). All animal experiments were performed in accordance with the University of Tokyo's Regulations for Animal Care and Use, which were approved by the Animal Experiment Committee of the Institute of Medical Science, the University of Tokyo (approval number PA17-69).

#### 2. Cells.

Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells were grown in Eagle's minimal essential medium (E-MEM; Nacalai Tesque) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100  $\mu$ g/ml). VeroE6 cells stably expressing transmembrane protease serine 2 (VeroE6/TMPRSS2; JCRB Cell Bank 1819) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose (catalog [cat] number 08456-65; Nacalai Tesque) supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml), and G418 (1 mg/ml).

#### 3. Depletion of nasal bacteria in vivo.

The antibiotic cocktail consisted of ampicillin sodium salt (1 g/liter), neomycin sulfate (1 g/liter), metronidazole (1 g/liter), vancomycin hydrochloride (0.5 g/liter), gentamicin (10 mg/liter), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 U/ml), and amphotericin B (0.25 mg/liter) (40). For intranasal treatment, mice were anesthetized and 5  $\mu$ l of antibiotic was administered dropwise into each nostril using a pipette tip. All antibiotics with the exception of vancomycin hydrochloride were obtained from Nacalai Tesque. Vancomycin hydrochloride was obtained from Duchefa Biochemie.

#### 4. Virus infection.

WT A/Puerto Rico/8/34 (A/PR8) and A/Narita/1/09 (pdm09) influenza viruses were grown in allantoic cavities of 10-day-old fertile chicken eggs at 35°C for 2 days. Viral titer was quantified by a standard plaque assay using MDCK cells, and the viral stock was stored at -80°C. For intranasal infection, mice were fully anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of a pentobarbital sodium (Somnopentyl; Kyoritsu Seiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) and then infected by intranasal application of 30  $\mu$ l of virus suspension (1,000 PFU of A/PR8 or pdm09 in phosphate-buffered saline (PBS)). This procedure leads to an upper and lower respiratory tract infection.

SARS-CoV-2/UT-NCGM02/Human/2020/Tokyo and a QK002 variant (lineage B.1.1.7) were amplified on VeroE6/TMPRSS2 cells and stored at -80°C until use. The infectious titer was determined by a standard plaque assay using VeroE6/TMPRSS2 cells, as described previously. For intranasal infection, 1-month-old female Syrian hamsters (Japan SLC Inc.) were fully anesthetized by i.p. injection of a pentobarbital sodium (Somnopentyl; Kyoritsu Seiyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan) and then infected intranasally with  $2 \times 10^6$  or 1,000 PFU (in 100  $\mu$ l) of SARS-CoV-2. All experiments with SARS-CoV-2 were performed in enhanced biosafety level 3 (BSL3) containment laboratories at the University of Tokyo, in accordance with the institutional biosafety operating procedures.

#### 4. 研究成果

研究グループは、マウスの上気道常在菌を抗生物質で死滅させるとインフルエンザウイルス感染後に誘導されるウイルス特異的な IgG および IgA 抗体応答が増加することを見出しました。同様に上気道常在菌をリゾチームで破壊することにより、同時に経鼻投与したインフルエンザ HA ワクチンに対する抗体応答が増加することを確認しました。MyD88 欠損マウスではこの効果が認められなかったことから、死滅した上気道常在菌由来の病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) がアジュバントとして機能し、ウイルスやワクチン特異的な抗体応答を増加させていることが分かりました。またマウスやヒトの鼻腔内に生息する常在菌数は口腔内の 1/10 ~ 1/100 と少ないことが分かり、スプリットワクチンだけを経鼻投与しても十分な抗体を誘導できない理由が上気道常在菌の数や質によるものであることが示唆されました。そこで培養した口腔菌をワクチンと混合して経鼻投与すると、ワクチン接種群ではウイルスに対する抗体が誘導され、インフルエンザウイルスや SARS-CoV-2 の増殖量が有意に抑制されていることを確認しました (図 1)。

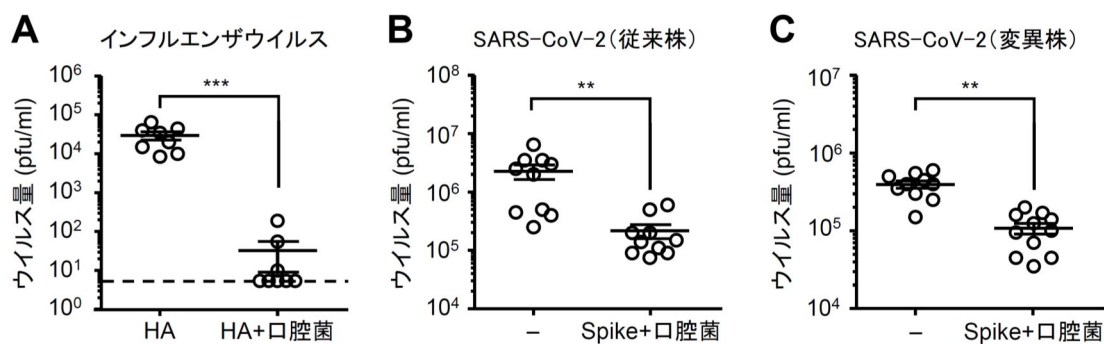


図 1 . 経鼻ワクチンによるインフルエンザウイルスおよび SARS-CoV-2 の増殖抑制効果

(A) インフルエンザウイルス HA ワクチン単独または口腔菌とともに 3 週間隔で 2 回経鼻投与したマウスにインフルエンザウイルスを感染させ、感染 3 日後の肺胞洗浄液中のウイルス量を測定した。(B, C) 新型コロナウイルスのスパイクタンパク質 (Spike) と口腔菌を 3 週間隔で 2 回経鼻投与したハムスターに、SARS-CoV-2 の従来株 (B)、変異株 (C) を感染させ、感染 3 日後の肺胞洗浄液中のウイルス量を測定した。点線はウイルス量の検出限界値 (5 pfu/ml) を示す。 \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

これまでの研究から、経鼻インフルエンザワクチンはウイルスの感染の場となる上気道粘膜にウイルス特異的な IgA 抗体を誘導するため、ウイルスの感染そのものを阻止することができる有効なワクチンであることが明らかになっています。このことから近い将来、日本でも経鼻投与型のインフルエンザワクチンが実用化する予定です。本研究成果はこのような経鼻ワクチンの効果を高めるために必要な重要な知見であり、より少ない量のワクチンで最大限の効果を発揮する経鼻ワクチンの開発研究に役立つと期待されます。また現在、世界中で問題となっている新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) もインフルエンザウイルスと同様、呼吸器を標的としたウイルスであるため、今後は SARS-CoV-2 の感染そのものを阻止することができる有効な経鼻ワクチンを開発することを目指します。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagai Minami, Moriyama Miyu, Ichinohe Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Oral Bacteria Combined with an Intranasal Vaccine Protect from Influenza A Virus and SARS-CoV-2 Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0159821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01598-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Liu Kaiwen, Sato Ryota, Shibata Takuma, Hiranuma Ryosuke, Reuter Tatjana, Fukui Ryutarō, Zhang Yun, Ichinohe Takeshi, Ozawa Manabu, Yoshida Nobuaki, Latz Eicke, Miyake Kensuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Skewed endosomal RNA responses from TLR7 to TLR3 in RNase T2-deficient macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 479 ~ 490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Moriyama M, Nagai M, Maruzuru Y, Koshiba T, Kawaguchi Y, Ichinohe T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Influenza Virus-Induced Oxidized DNA Activates Inflammasomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101270	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 長井みなみ、森山美優、一戸猛志
2. 発表標題 上気道常在菌がウイルス特異的な免疫応答に与える影響の解析
3. 学会等名 第34回インフルエンザ研究者交流の会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長井みなみ、森山美優、一戸猛志
2. 発表標題 上気道常在菌がウイルス特異的な免疫応答に与える影響の解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長井みなみ、森山美優、一戸猛志
2. 発表標題 上気道常在菌がウイルス特異的な免疫応答に与える影響の解析
3. 学会等名 第25回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Minami Nagai, Miyu Moriyama, Takeshi Ichinohe
2. 発表標題 Oral bacteria-combined intranasal vaccine protects from influenza A virus and SARS-CoV-2 infection
3. 学会等名 第19回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一戸猛志
2. 発表標題 外気温とウイルス感染症
3. 学会等名 慶應義塾大学医学部第9回新次元開拓セミナーシリーズ（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一戸猛志
2. 発表標題 体温とインフルエンザ
3. 学会等名 第34回インフルエンザ研究者交流の会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一戸猛志
2. 発表標題 外気温とウイルス感染症
3. 学会等名 第1回腸内デザイン学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 一戸猛志
2. 発表標題 外気温がインフルエンザウイルスに対する抵抗性に与える影響の解析
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本地方会学術集会/第67回日本化学療法学会東日本支部総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 一戸猛志
2. 発表標題 腸内細菌とウイルス感染
3. 学会等名 日本食品免疫学会 第1回オンラインシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 長井みなみ、一戸猛志	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社近代出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床と微生物	

1. 著者名 長井みなみ、一戸猛志	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本臨床ウイルス学会	5. 総ページ数 9
3. 書名 臨床とウイルス	

1. 著者名 長井みなみ、一戸猛志	4. 発行年 2021年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 炎症と免疫	

1. 著者名 長井みなみ、一戸猛志	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本農芸化学会	5. 総ページ数 7
3. 書名 化学と生物	

1. 著者名 長井みなみ、一戸猛志	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床免疫・アレルギー科	

1. 著者名 長井みなみ、一戸猛志	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 生体の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>上気道常在菌が経鼻ワクチンの効果に与える影響を解析  <a href="https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/about/press/page_00110.html">https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/about/press/page_00110.html</a></p>
---

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

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
---------	---------