

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17461

研究課題名(和文)新規インフルエンザワクチンアジュバント開発を目指したC型レクチン受容体の機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of C-type lectin receptors for the development of novel influenza vaccine adjuvant

研究代表者

山本 秀輝 (Yamamoto, Hideki)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：90799082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではC型レクチン受容体がインフルエンザウイルス主要抗原であるヘマグルチニン(HA)により開始される炎症応答にどう関与するかについて検討した。マウスおよびヒトDectin-2はHAと結合し、特にA/H3N2亜型由来HAと高い結合性を示した。また、HA投与による血清抗体価はA/H3N2亜型由来HA投与によりDectin-2遺伝子欠損マウスにおけるIgG産生が野生型マウスと比較して有意に増加した。以上から、Dectin-2はHAを認識し、さらにHA特異的抗体産生に影響を及ぼす何らかの機序に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、Dectin-2遺伝子欠損下ではインフルエンザウイルスHA投与による抗体産生応答が増強される結果が得られた。これはDectin-2がHA特異的抗体産生を抑制するメカニズムが存在する可能性が示唆され、従来知られている機序とは異なる宿主免疫応答が関与していることが予想される。今後、さらに詳細な細胞動態や分子間相互作用が明らかになれば、Dectin-2を標的としたインフルエンザ予防戦略構築へ応用可能であり、社会的意義が非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated whether influenza virus hemagglutinin (HA) is involved in the initiation of inflammatory responses, particularly of HA-specific antibody responses, induced by C-type lectin receptors. Each HA, especially HA derived from A/H3N2 subtype, was bound to murine or human Dectin-2 carbohydrate domain. Total IgG titer was significantly increased in Dectin-2 gene-deficient mice compared to wild-type mice upon intraperitoneal administration with HA derived from A/H3N2 subtype. These results suggested that Dectin-2 recognizes influenza virus HA and may be involved in some mechanism that further affects HA-specific antibody production.

研究分野：感染症内科学

キーワード：インフルエンザ C型レクチン受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザワクチンは、流行株の種類や年齢などにより予防効果が異なり、特にインフルエンザ既往歴のない人には効果が薄い (*Vaccines*, 6(2): 28, 2018)。また、膜表面抗原であるヘマグルチニン (HA) を主成分とするスプリットワクチンのため自然免疫誘導能が弱く (*モダンメディア*, 61(10): 283-89, 2015)、ワクチン効果向上のための適切なアジュバントの必要性が指摘されている。近年、自然免疫受容体として知られる Toll 様受容体アゴニストが、効果的な自然免疫応答を誘導するアジュバント物質として注目されている (*Curr. Opin. Pharmacol.* 41: 104-13, 2018)。同様の自然免疫受容体として、微生物糖鎖を認識する C 型レクチン受容体 (CLRs) が脚光を浴びており、真菌を始めとする各感染症領域において精力的に研究がなされている。

CLRs は抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージに高発現するパターン認識受容体で、多糖との結合により炎症反応を誘導する (*Curr. Opin. Microbiol.* 40: 123-30, 2017)。近年、CLRs 下流のシグナル伝達分子である CARD9 の欠損によりインフルエンザが軽減するという注目すべき報告がなされた (*Sci. Rep.* 5: 17577, 2015)。この報告は CLRs がインフルエンザ発症病態に関与している可能性を示唆するが、CLRs を介した詳細な宿主免疫機序は明確でない。

そこで申請者は、「インフルエンザ宿主防御機構に CLRs の概念を導入することで、CLRs を介した新規機序によるインフルエンザ予防基盤の確立が可能になる」という仮説を立て、高マンノース糖鎖を認識する CLRs として知られる Dectin-2 に着目した研究に取り組んできた。一連の解析で、インフルエンザウイルス膜表面の主要抗原であるヘマグルチニン (HA) 刺激による樹状細胞からのサイトカイン産生が Dectin-2 遺伝子欠損 (KO) マウスにおいて顕著に低下することを見出した。すなわち、Dectin-2 が HA により開始される炎症応答において重要な分子であることが考えられる。そこでこの知見を元に、Dectin-2 を標的とした新規インフルエンザ予防基盤の確立を目指す研究を着想した。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究では CLRs のうち高マンノース糖鎖を認識する Dectin-2 に着目する。はじめに、Dectin-2 と HA の相互作用についてさらに詳細な解析を行い、HA 認識における Dectin-2 の関与を明確にする。その上で、産生される各抗体クラスの解析や HA 特異的なリンパ球応答を中心とした宿主抗体産生応答における Dectin-2 の役割について明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) CLR 遺伝子導入細胞を用いたレポーターアッセイによる結合能の解析

CLR 遺伝子、緑色蛍光タンパク (GFP) 遺伝子、シグナル伝達分子 FcR 鎖、および転写因子 Nuclear factor of activated T cells (NFAT) を 2B4 細胞に導入した NFAT-GFP レポーター細胞を実験に用いた。本実験では、CLR 遺伝子としてマウス Dectin-2 またはヒト Dectin-2 遺伝子を導入した細胞を用いた。また、陰性コントロールとして FcR 鎖のみを導入した細胞を用いた。さらに、マウス Dectin-2 の糖鎖認識ドメインのアミノ酸が Glu-Pro-Asn から Gln-Pro-Asp に置換された細胞を用いた。これらの細胞を各種 HA (由来株: A/Singapore/GP1908/2015 (IVR-180) (H1N1)pdm09、A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (IVR-186) (H3N2)、B/Maryland/15/2016 (NYMC BX-69A) (Victoria 系統)、および B/Phuket/3073/2013 (Yamagata 系統)、デンカ生研株式会社 (新潟県五泉市) より入手) 由来 HA で刺激した。刺激後の GFP 発現をフローサイトメーターにて解析し、Dectin-2 と HA との相互作用を調べた。

#### (2) 樹状細胞からのサイトカイン産生におけるマンノース糖鎖の関与

HA 表面にはマンノース糖鎖が豊富に存在することが知られている (*J. Biol. Chem.* 260: 14771-74, 1985)。そこで、HA 刺激による樹状細胞からのサイトカイン産生に関与する糖鎖がマンノース糖鎖であるかどうかについて解析した。まず、C57BL/6J (野生型) マウスより骨髓細胞を採取し、分化誘導因子 GM-CSF との共培養により骨髓由来樹状細胞 (BM-DCs) を作製した。各種 HA に対しては、マンノースと結合するレクチンであるコンカナバリン A (Con A) を吸着させたセファロース粒子と各種 HA を反応させた。反応後に遠心し、その上清を刺激物として野生型マウス由来 BM-DCs を刺激し、24 時間後の上清中炎症性サイトカイン濃度を ELISA にて測定した。さらに、吸着処理後の粒子に対し、マンノースとの結合を阻害する物質である  $\alpha$ -メチル-D-マンノピラノシド (ManP) を作用させ、遠心後の上清を回収した。この上清を刺激物として BM-DCs を刺激し、ManP によるリカバリー効果を検討した。

### (3) HA 特異的抗体産生における Dectin-2 の関与の解析

野生型マウスおよび Dectin-2 KO マウスに対し、各種 HA をそれぞれ単独で腹腔内投与した。コントロール群では RPMI1640 培地を腹腔内投与した。初回投与から 7 日後に同じ投与スケジュールで再度腹腔内投与を行った。14 日後に血清を採取し、血清中の HA 特異的抗体価 (IgM、総 IgG、IgA) を測定した。IgG については各サブクラスの測定も行った。

### (4) 抗原特異的リンパ球応答における Dectin-2 の解析

野生型マウスおよび Dectin-2 KO マウスの足蹠に各種 HA を投与した。投与 7 日後に鼠径リンパ節および脾臓を採取し、細胞液を調製した。各々の細胞を投与した HA で再刺激し、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA にて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) CLR 遺伝子導入細胞を用いたレポーターアッセイによる結合能の解析

#### マウス Dectin-2 との結合能

はじめにマウス Dectin-2 と HA との相互作用について、マウス Dectin-2 遺伝子を導入したレポーター細胞を用いて検討した。HA とマウス Dectin-2 の結合について解析したところ、すべての HA において GFP 発現がみられた。各々の刺激による GFP 発現は、A/H1N1pdm09 亜型が約 1.0%、A/H3N2 亜型が約 12%、B/Victoria 系統が約 3.0%、B/Yamagata 系統が約 3.3% であり、A/H3N2 亜型由来 HA 刺激での GFP 発現量が最も高かった。一方で、Dectin-2 抗原結合部位のアミノ酸遺伝子が変異したマウス Dectin-2 を発現したレポーター細胞を各種 HA で刺激したところ、いずれの HA においても GFP 発現が低下した。特に、A/H3N2 亜型における発現低下が顕著であり、GFP 発現はほぼ消失した。A/H1N1pdm09 亜型、B/Victoria 系統、および B/Yamagata 系統においても、GFP 発現は非変異細胞と比較して 50% 以下に低下した。以上から、マウス Dectin-2 は HA との結合に関与しており、特に A/H3N2 亜型との相互作用に関与していることが示唆された。

#### ヒト Dectin-2 との結合能

HA とヒト Dectin-2 との反応性についても同様に解析した。ヒト Dectin-2 を発現したレポーター細胞を各種 HA で刺激したところ、いずれの HA 刺激においても GFP 発現がみられた。それぞれの刺激における GFP 発現量は、A/H1N1pdm09 亜型が約 5.4%、A/H3N2 亜型が約 3.6%、B/Victoria 系統が約 1.3%、B/Yamagata 系統が約 4.0% であり、A/H1N1pdm09 亜型の発現量が最も高かった。また、マウス Dectin-2 およびヒト Dectin-2 と HA との反応性を比較すると、A/H1N1pdm09 亜型と B/Yamagata 系統ではマウス Dectin-2 よりヒト Dectin-2 において GFP 発現量が高かった。以上から、HA はマウスにおいてもヒトにおいても Dectin-2 との結合性を示すことが示唆された。一方で、ヒト Dectin-2 と HA との反応性はマウス Dectin-2 とは異なることが明らかとなった。

### (2) 樹状細胞からのサイトカイン産生におけるマンノース糖鎖の関与

Con A を吸着させたセファロース粒子と HA をインキュベートし、遠心後の上清で BM-DCs を刺激したところ、全ての HA において上清中の IL-12p40 産生がほぼ完全に消失した。遠心後に残存した粒子と ManP をインキュベートし、遠心後の上清で BM-DCs を刺激したところ、A/H3N2 亜型由来 HA を除く HA において、消失した IL-12p40 産生がほぼ完全に回復した。A/H3N2 亜型由来 HA では IL-12p40 産生の回復は 50% 程度にとどまった。以上から、HA に含まれる糖類は Con A と結合する物質であり、その物質は ManP の作用によって Con A から剥離することからマンノース糖鎖であることが明らかとなった。

### (3) HA 特異的抗体産生における Dectin-2 の関与

HA 投与による抗体産生における Dectin-2 の関与を検討するために、野生型マウスおよび Dectin-2 KO マウスに HA を腹腔内投与し、14 日後の血清抗体価を測定した。IgM および総 IgG については、全ての HA 投与において両マウスともコントロール群と比較して有意な抗体価の上昇がみられた。一方で、IgA はいずれの HA 投与においても検出できなかった。IgM 産生は全ての HA において野生型マウスと Dectin-2 KO マウスの間に有意差はなかった。総 IgG 産生は A/H1N1pdm09 由来 HA 投与においては両群間で有意差がみられなかったが、A/H3N2 亜型由来 HA および B/Yamagata 系統由来 HA 投与においては、野生型マウスと比較して Dectin-2 KO マウスにおいて IgG 産生が有意に増加した。

全ての HA 投与において総 IgG が検出できたため、さらに各 IgG サブクラスについても解析を行った。A/H1N1pdm09 亜型由来 HA 投与においては、IgG3 産生が Dectin-2 KO マウスにおいて有意に増加したが、その他のサブクラスでは有意差はみられなかった。A/H3N2 亜型由来 HA 投与においては、有意差はみられなかったものの IgG1、IgG2b、および IgG3 産生が Dectin-2 KO マウスにおいて野生型マウスと比較して増加傾向であった。B/Yamagata 系統由来 HA 投与においては、IgG2b 産生が Dectin-2 KO マウスにおいて野生型マウスと比較して有意に増加した。以上から、HA 特異的抗体産生応答において Dectin-2 欠損下では IgG 抗体産生が増加し、特に IgG1 と IgG2b がその責任因子であることが示唆された。

#### (4) 抗原特異的リンパ球応答における Dectin-2 の関与

HA 特異的抗体産生応答に關与する因子について明らかにするために、抗原特異的リンパ球応答に着目し、所属リンパ節におけるリンパ球応答について解析した。各種 HA を足蹠に投与し、7 日後の鼠径リンパ節細胞および脾細胞を回収後、投与抗原で再刺激を行った。刺激後の培養上清中の IFN- $\gamma$ 、IL-4、および IL-17A の濃度を ELISA にて測定したところ、A/H3N2 亜型由来 HA 投与後の細胞刺激による上清中 IFN- $\gamma$  濃度が野生型マウスと比較して Dectin-2 KO マウスにおいて有意に増加した。一方で、IL-4 濃度は両群間で有意差はみられなかった。IL-17A はいずれの群においても検出されなかった。以上から、Dectin-2 欠損下では A/H3N2 亜型由来 HA 投与により Th1 免疫応答が増強する何らかのメカニズムが存在する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hideki Yamamoto, Chikako Tomiyama, Ko Sato, Jun Kasamatsu, Kazuki Takano, Aya Umeki, Nana Nakahata, Tomomitsu Miyasaka, Emi Kanno, Hiromasa Tanno, Sho Yamasaki, Shinobu Saijo, Yoichiro Iwakura, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami	4. 巻 42
2. 論文標題 Dectin-2-mediated initiation of immune responses caused by influenza virus hemagglutinin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 53-66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.53	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hideki Yamamoto, Chikako Tomiyama, Sho Yamasaki, Yoichiro Iwakura, Kazuyoshi Kawakami
2. 発表標題 Involvement of Dectin-2 in the host recognition and specific antibody response triggered by influenza virus hemagglutinin
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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