

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870127

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染によるIgA分泌機構解明

研究課題名(英文) The mechanism of virus-specific IgA induction in nasal mucosa

研究代表者

山崎 達也 (Yamazaki, Tatsuya)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：50624087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：鼻腔粘膜へインフルエンザウイルス(IAV)が感染すると、粘膜上にウイルス特異的IgA抗体が分泌される。このIgA抗体は感染そのものを阻止するので、ウイルス防御においてとても重要である。そこで本研究ではIgA抗体誘導において、どのような因子が重要か明らかにすることを目的とした。

外科的手術により血流を共有させた並体結合マウスを用いた実験より、IAV特異的IgA分泌には鼻粘膜へのウイルス感染の痕跡が重要であることが分かった。更に詳細な解析の結果、IgA分泌には粘膜上の同種抗原が重要な因子であることも明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：Nasal IgA responses have been shown to play an important role in cross protection against influenza virus infection. In this study, we show a critical role for virus antigen in IgA induction using parabiotic mice.

A/PR8-infected mice and naive mice were joined. Two weeks later, A/PR8 specific serum IgG and nasal IgA were measured. Although serum IgG was shared between parabionts, nasal IgA was detected from only infected mice. It was suggested that nasal infection played an important role in the induction of mucosal IgA. When A/PR8-infected mice and B/Ibaraki-infected mice were joined, A/PR8-specific IgA was not shared between parabionts. However, when A/PR8-HA injected mice were joined, specific IgA was shared. Moreover, splenocytes were obtained from A/PR8-infected mice and transferred to recipient mice that were injected with A/PR8-HA. Two weeks later, specific IgA was significantly detected. These results indicated that cognate antigen in nasal mucosa was important to IgA induction.

研究分野：感染免疫

キーワード：IgA インフルエンザウイルス 並体結合マウス 抗原 HA

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス (IAV) は抗原変異しやすいウイルスである。その結果、宿主の免疫応答を逃れることが問題となっている。近年の経鼻ワクチンの研究から、鼻腔粘膜に誘導される IgA 抗体は交差防御性に優れていることが知られている (Ichinohe T et al. J Virol 2005)。よって IgA 抗体を効率的に粘膜上に誘導することができれば、高い IAV 防御効果が期待できると考えられる。

また研究開始当初において、マウス並体結合法を用いて局所に常在するメモリー CD8 陽性 T 細胞 (resident memory T cell) は、血流を循環しているメモリー CD8 陽性 T 細胞よりも局所の感染防御に重要な役割を果たしているという報告があった (Jiang X et al. Nature 2012)。マウス並体結合法とは、2 匹のマウスを皮膚切開して結合し、血流を共有させる手法である。この手術によって、血流を循環する免疫系 (全身性) と循環しない免疫系 (局所性) を区別して解析することができる。そこで本研究では、並体結合マウスを用いて、IAV 感染による鼻腔粘膜局所への IgA 抗体誘導メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

鼻腔粘膜へ IAV が感染すると、粘膜上に IAV 特異的 IgA 抗体が分泌される。この IgA 抗体は感染そのものを阻止するので、IAV 防御においてとても重要である。そこで本研究では IgA 抗体誘導において、どのような因子が重要か明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) **並体結合マウス間でウイルス伝播しないことを確認**：まず前提実験として、感染マウスと非感染マウスを並体結合し、非感染マウスにウイルスが伝播しないことを確認した。片方のマウスに IAV (A/PR8 株) を経鼻感染 (1000 PFU/2 μ l /鼻腔) させ、同時にペアとなる非感染マウスと並体結合させた。感染後 3~14 日目に経時的に鼻腔洗浄液を回収し、ブランクアッセイにてウイルス価の測定をおこなった。
- (2) **ウイルス特異的 IgA 抗体は並体結合マウス間で共有されるか局所的応答か**：A/PR8 感染マウスと非感染マウスを並体結合し、その 2 週間後に血清と鼻腔洗浄液を回収した。それぞれ A/PR8 特異的な血清中 IgG 抗体 (力価) と鼻腔洗浄液中 IgA 抗体を ELISA にて測定した。
- (3) **ウイルス特異的 IgA 抗体誘導にはどのような因子が重要か**：つづいて、感染履歴の

ない非感染並体結合マウスに、どのような因子を投与したら、感染並体結合マウスレベルの IgA 抗体が誘導されるか解析を行った。

) **ウイルス刺激**：まず、A/PR8 と抗原性の異なる B 型インフルエンザウイルス (B/Ibaraki) をペアとなるマウスに感染させた。A/PR8 で誘導される IgA 抗体と B/Ibaraki で誘導される IgA 抗体において、それぞれ交差反応性はほとんどない (Ichinohe et al J Virol 2005)。感染と同時に並体結合し、結合後 4 週目、24 週目で鼻腔洗浄液中の A/PR8 特異的 IgA 抗体レベルを測定した。

) **炎症誘導物質**：同様に炎症誘導物質である、IL-1、LPS、コレラトキシン B サブユニット (CTB)+LPS をペアとなるマウスに投与した。CTB、IL-1 には IgA 抗体レベルを上昇させるアジュバント作用があることは知られている (Tamura S et al Vaccine 1988, Kayamuro H et al J Virol 2010)。また LPS は B 細胞を強力に活性化できるマイトジェン (分泌促進因子) である。これらの炎症誘導物質を投与し、同時に並体結合した。結合後 4 週目で鼻腔洗浄液中の A/PR8 特異的 IgA 抗体レベルを測定した。

) **同種抗原**：A/PR8 ウイルスからアフィニティ精製した同種抗原 (ヘマグルチニン, HA) をペアとなるマウスに投与した。HA は IAV の膜タンパク質の 1 つである。ウイルスは HA で細胞レセプターを認識し細胞内へ侵入する。よって HA はワクチンの主要ターゲットとなっている。HA 投与と同時に並体結合し、結合後 4 週目で鼻腔洗浄液中の A/PR8 特異的 IgA 抗体レベルを測定した。

- (4) **異なるモデルによる (3) 結果の検証**：(3) で IgA 抗体誘導に重要な因子を同定できたので、違う実験モデルでも再現性があるか確認した。A/PR8 を感染させたマウス (ドナー) から感染 4-8 週後に脾臓細胞を採取した。あらかじめ線処理して免疫細胞を破壊したレシピエントマウスに、その脾臓細胞を移入し、同時に同種抗原 (HA) を投与した。細胞移入後、2 週目で鼻腔洗浄液を回収し、A/PR8 特異的 IgA 抗体レベルを測定した。さらに別の抗原でも同様の現象が得られるかを確かめるため、NP (核タンパク) 抗原をレシピエントマウスに投与する実験も行った。

(5) **ヒト免疫モデルマウスによる(3)結果の検証**：(3)の現象がヒト免疫細胞でも見られるかも検証した。まず被験者の血清に、使用する抗原（ヒト用ワクチン）に対して反応性が見られるか確かめた。ワクチンをELISA プレートにコーティングし、被験者血清を反応させ、ワクチン特異的 IgG レベルを ELISA で測定した。

次に、被験者（ドナー）末梢血 からリンパ球を精製した。それをヒト化マウスモデルとしてよく用いられる NOG マウス（レシピエント）に移入して抗原（ヒト用ワクチン）を経鼻投与した。NOG マウスは超免疫不全マウスなので、ヒト細胞が着生しやすい(Ito R et al J Immunol 2012)。細胞移入から 2 週間後、鼻腔洗浄液を回収し、ワクチン特異的 IgA 抗体レベルを ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1) **並体結合マウス間で IAV は伝播しない**：感染させた並体結合マウスにおいては、感染後 7 日目までウイルスが検出され、14 日目においてウイルスは検出限界以下のレベルになった。一方で、非感染マウスにおいては、感染後 14 日目までウイルスは全く検出されなかった。よって、並体結合マウス間においてウイルスは伝播しないことが確かめられた。このことから、非感染マウスで検出された A/PR8 特異的免疫応答は、A/PR8 感染マウス由来であると考えられる。

(2) **ウイルス特異的 IgA 抗体誘導には同所への感染履歴が重要**：A/PR8 感染マウスと非感染マウスを並体結合し、その 2 週間後に血清中のウイルス特異的 IgG もしくは鼻腔洗浄液中の IgA 抗体レベルを解析した (Fig.1)。まず血清中の IgG 抗体レベルについて、A/PR8 感染マウスと非感染マウスのどちらでも IgG 抗体が検出され、両者で有意なレベルの差は認められなかった。よって並体結合マウス間でウイルス特異的 IgG 抗体は共有されていることが分かった。次に鼻腔洗浄液中の IgA 抗体に関し

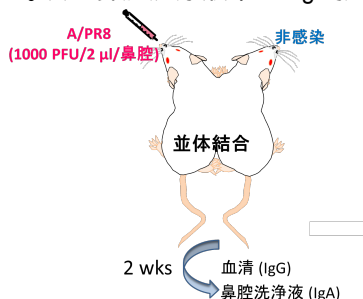


Fig.1 並体結合マウス実験図

て解析した。A/PR8 感染マウスにおいては有意に抗原特異的 IgA 抗体が検出された。しかし非感染マウスにおいては有意なレベルの IgA 抗体は認められなかった。これより IgA が誘導されるためには局所のウイルス感染が重要であることが分かった。

(3) ウイルス特異的 IgA 抗体誘導には、粘膜における同種抗原が重要

まず抗原性の異なる B/Ibaraki ウイルスをペアとなるマウスに感染させ並体結合した。結合後 4 週目もしくは 24 週目で鼻腔洗浄液中の A/PR8 特異的 IgA 抗体レベルを測定したところ、B/Ibaraki 感染マウスからは有意な A/PR8 特異的 IgA 抗体は誘導されなかった。B/Ibaraki 感染マウスにおいて、B/Ibaraki 特異的 IgA 抗体は検出されたので、ウイルス感染は成立していると考えられる。以上より、ウイルス感染刺激だけでは有意なレベルの IgA 抗体誘導はされないことが分かった。

同様に炎症誘導物質の IL-1、LPS、CTB+LPS をペアとなるマウスに投与して並体結合した。結合後 4 週目で鼻腔洗浄液中の A/PR8 特異的 IgA 抗体レベルを測定した。その結果、いずれの刺激物質を投与しても有意なレベルの IgA 抗体は誘導されなかった。よって、炎症を惹起する刺激だけでは有意なレベルの IgA 抗体誘導はされないことが分かった。

最後に同種抗原 (HA) をペアとなるマウスに投与して並体結合した。結合後 4 週目で鼻腔洗浄液中の A/PR8 特異的 IgA 抗体レベルを測定した。まず単体のマウスに HA だけを投与しても有意なレベルの IgA 抗体は検出されなかった。一方で HA 投与並体結合マウスからは A/PR8 感染並体結合マウスと同等のレベルの IgA 抗体が検出された。よって粘膜上に特異的 IgA 抗体が誘導されるためには、粘膜局所の同種抗原が重要であることが分かった。

(4) 感染マウス脾臓細胞移入実験で (3)結果の再現性得られた

別の実験系でも(3)の現象を見られるか解析を行った。A/PR8 感染マウスから脾臓細胞を採取し、レシピエントマウスに移入して HA 抗原を投与した。細胞移入後、2 週目で鼻腔洗浄液中のウイルス特異的 IgA 抗体レベルを測定した (Fig.2)。その結果、脾臓細胞を移入して HA 抗原を投与したマウスにおいて、有意なレベルで IgA 抗体が検出された。さらに別のウイルス抗原 (NP) でも同様の結果が再現できた。よって別な実験系でも IgA 抗体が誘導されるためには粘膜局所の同種抗原が重要であることが確認された。

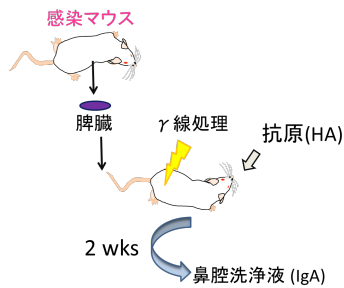


Fig.2 感染マウス脾細胞の移入実験図

(5) ヒト化マウスモデルで (3) 結果の再現性

得られた: まず被験者血清中にワクチン特異的抗体が検出されるか解析し、ワクチンと反応性があることを確認した。次に被験者の末梢血 からリンパ球を精製し、それを NOG マウス (レシピエント) に移入してワクチンを経鼻投与した。その結果、限定的なレベルではあるが、非投与群に比べ抗原投与群で有意に IgA が検出された。よってヒト免疫細胞においても、鼻腔粘膜の抗原に反応して粘膜中に特異的 IgA 抗体が分泌されることが分かった。

(6) 総括

並体結合マウスの解析から、ウイルス特異的 IgA 抗体誘導は粘膜局所的な応答であることが分かった。さらに IgA 抗体誘導のためには粘膜局所における同種抗原が重要であることも明らかにできた。

過去の文献から (Ichinohe T et al JEM 2009)、研究計画時には、IgA 抗体誘導にはウイルス感染刺激や炎症を惹起する物質 (IL-1 など) が重要であると予想していた。しかし予想に反して、ウイルス刺激や炎症誘導物質だけでは IgA 抗体誘導には不十分であった。

以前の報告で、抗原非特異的な IgA 産生 B 細胞そのものは並体結合マウス間で共有されるということは知られていた (Suzuki K et al Proc Natl Acad Sci U S A 2003)。本研究では、抗原特異的な IgA 抗体に関して評価し、その誘導に重要な因子を特定できたことは意義深いと考えられる。さらにヒト免疫細胞についても評価できたことにより、ワクチン研究への貢献も期待できる。本研究成果の内容に関しては学术论文に発表予定である。

今後の課題として、抗原投与だけでなぜ IgA 抗体が誘導されるのか詳細なメカニズム解析が必要である。ウイルス特異的 IgA 抗体誘導における責任細胞の同定や、宿主がどのように抗原を認識しているか、その責任因子を同定することも重要であると考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

山崎達也、一戸猛志、並体結合マウスを用いたインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体応答の解析、第 14 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学本郷キャンパス、4 月、2014 年

山崎達也、小柴琢己、一戸猛志、ミトコンドリア品質管理タンパク質 PINK1/Parkin による NLRP3 inflammasome の制御機構、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜、11 月、2014 年

山崎達也、並体結合マウスにおけるインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体分泌機構の解析、4th Negative Strand Virus-Japan、ラグナガーデンホテル(沖縄)、1 月、2015 年

山崎達也、A 型インフルエンザウイルス M42 タンパク質による NLRP3 inflammasome の制御機構の解析、4th Negative Strand Virus-Japan、ラグナガーデンホテル(沖縄)、1 月、2015 年

山崎達也、並体結合マウスを用いたインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体応答の解析、第 29 回インフルエンザウイルス研究者交流会、東京大学医科学研究所 (東京都) 5 月、2015 年

山崎達也、インフルエンザウイルス特異的 IgA 応答における上気道常在菌の役割、5th Negative Strand Virus-Japan、ホテルモントレ沖縄(沖縄)、1 月、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山崎達也 (Yamazaki, Tatsuya)
東京大学医科学研究所・特任研究員
研究者番号: 50624087

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし