

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16669

研究課題名(和文) TLR刺激によるフラビウイルスの病原性亢進メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of TLR stimulation-mediated flavivirus pathogenicity

研究代表者

鈴木 達也 (Suzuki, Tatsuya)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10837272

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)：蚊媒介性フラビウイルスの感染時に、蚊の吸血時にウイルスと共に接種される唾液がもたらす自然免疫応答に着目し、唾液刺激によりToll-like receptorシグナルといった自然免疫応答が活性化されることを見出した。またTLRの中でもTLR2やTLR9刺激によりフラビウイルスの病原性が增强することを示した。特に、TLR2刺激による病原性增强においては、局所に浸潤してくる好中球の作用が重要であることが示された。以上の結果から、フラビウイルス感染ではウイルスが活性化された自然免疫応答を巧みに利用し、効率的な感染を成し遂げていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の対象である日本脳炎ウイルス(JEV)、デングウイルス(DENV)、ジカウイルス(ZIKV)などの蚊媒介性フラビウイルスは、脳炎や出血熱、小頭症など様々な疾患を引き起こす病原体であり、国際的にもフラビウイルスの脅威に対する対応が求められているが、多くのフラビウイルス感染症に対する有効な予防薬、治療薬は未だ確立されていないという課題がある。本研究成果は、昆虫媒介性ウイルスによる効率の良い感染を成立させる機構の理解につながるものであり、また病原性緩和に向けた治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I examined the possibility of utilization of innate immune responses for efficient propagation of flaviviruses in vivo. I found that the ligands of TLR2 significantly enhanced JEV pathogenicity and accumulation of immune cells at the infection site. Moreover, I also found that neutrophils contributed to viral pathogenicity in vivo. Therefore, my data suggested that activation of TLR2 signaling because of mosquito bites might play a crucial role in the efficient viral propagation and pathogenicity of mosquito-borne flaviviruses.

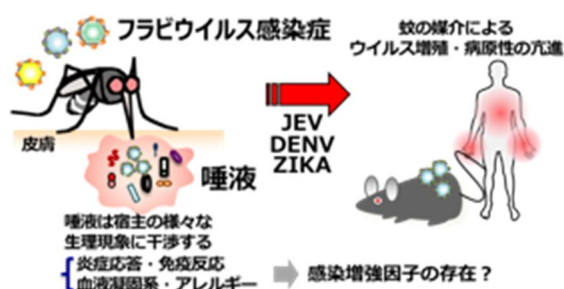
研究分野：ウイルス学

キーワード：フラビウイルス 自然免疫 Toll-like receptor 病原性

1. 研究開始当初の背景

日本脳炎ウイルス (JEV)、デングウイルス (DENV)、ジカウイルス (ZIKV) などの蚊媒介性フラビウイルスは、脳炎や出血熱、小頭症など様々な疾患を引き起こす病原体であるが、ワクチン開発は困難な要因が多いため、広範囲なフラビウイルスに対する治療薬の開発が必要とされている。これらのウイルスは蚊の吸血の際に唾液とともに哺乳動物の皮下に接種され、そこに存在する免疫細胞や皮膚の細胞に感染し、末梢組織で増殖後、脳などの標的臓器に達し重篤な疾病を惹起する。蚊の唾液には様々な生理活性物質が含まれており、宿主の免疫応答やアレルギーを惹起することが知られている。古くからウイルスの単独接種よりも蚊の唾液抽出物との混合接種やウイルス感染蚊の吸血において効率的に感染が成立し、病原性が增強することが知られているがその詳細なメカニズムについては不明瞭である (図 1)。

自然免疫は、非特異的な生体防御システムであり、細菌やウイルス等の病原体の表面抗原や核酸を認識し、これらを排除するための免疫応答が迅速に誘導される。特に、Toll 様受容体 (Toll-like receptor ; TLR) は、病原体成分を特異的に認識するレセプターの代表例であり、自然免疫の中心的役割を果たしており、TLR によるシグナル伝達経路は、病原体感染における防御機構として働くことが知られている。実際にフラビウイルス感染では、ウイルスの RNA による TLR3 シグナル伝達経路の活性化が抗ウイルス応答に重要



であることが報告されている。一方で、元来 TLR によるシグナル伝達経路は、病原体感染における防御機構として働くと考えられていたが、近年、感染症や自己免疫疾患において重症化に関与することが報告されている。フラビウイルス感染において、感染局所で誘導される自然免疫応答がウイルスの感染・病原性に与える影響はよく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、フラビウイルス感染と自然免疫応答に着目し、自然免疫経路の活性化がフラビウイルスの病原性を変化させるかを検討する。これまでに、自然免疫の中でも、TLR2 や TLR9 を活性化させるリガンドとウイルスを混ぜて接種することで、フラビウイルスの病原性を亢進することを見出している。申請者は、この TLR2/9 刺激による病原性増強は、唾液によるものと同じ、または類似したメカニズムで引き起こされていると予想している。よって、本研究では、TLR2/9 刺激がウイルスの病原性を亢進するメカニズムを明らかにし、これに寄与する細胞・細胞集団、遺伝子または下流のシグナル経路の同定を行う。また、TLR2/9 刺激による病原性亢進の詳細なメカニズムを明らかにし、蚊の唾液に対してもその重要性を証明することができれば、蚊媒介性フラビウイルスに対する治療薬やワクチン開発の提案を可能とする基盤研究につながるものと期待される。さらには、昆虫媒介性ウイルスがベクターを利用する意義や戦略の解明の持つ上がることが期待される。

3. 研究の方法

(1). フラビウイルス媒介蚊の唾液を用いた検討：

日本脳炎ウイルスの媒介蚊であるアカイエカから唾液腺を採取し、得られた唾液腺抽出物 (Salivary gland extracts; SGEs) をマウスの Footpad に接種し、RNA-seq により遺伝子発現の網羅的解析を行った。また、アカイエカ由来の SGEs を日本脳炎ウイルスと共にマウスの Footpad に接種し、ウイルスの病原性が增強するかどうかを検討した。

(2). TLR レポーター細胞を用いた検討：

NF- κ B の転写応答配列を持ったレポーター遺伝子が組込まれた細胞に各種 TLR をレンチウイルスベクターを用いて発現させた細胞株を樹立した。これらのレポーター細胞にアカイエカ由来の SGEs を反応させ、TLR 刺激物質が蚊の唾液に含まれるかどうかを検討した。

(3). TLR2 リガンド刺激によるウイルス増殖に与える影響の検討：

TLR2 リガンドがウイルス増殖にどのような影響を与えるかを検討するため、日本脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルスと TLR2 リガンドを混合してマウスの Footpad に皮下接種し、継続的に抹消組織 (Footpad、脾臓、膝窩リンパ節) と脳組織を回収し、RT-PCR によりウイルス RNA 量の定量を行った。

(4). マスサイトメーター (CyTOF) を用いた免疫細胞集団の網羅的解析：

SGEs や TLR 刺激による病原性亢進のメカニズムの解析には、刺激により感染局所 (Footpad) で誘導される細胞動態の包括的な理解が必要だと考えた。そこで、SGEs または TLR2 刺激により感染局所 (Footpad) での細胞集団の変化や各細胞の遺伝子発現変化を CyTOF を用いて検討した。

(5). 抗体による好中球の除去：

(4) において行った解析から、好中球の浸潤が、SGEs や TLR2 刺激によるウイルス病原性増強に関与していることが示唆されたため、好中球に対する特異的抗体 (Anti-Ly6G 抗体) を用いて野生型マウスから好中球を除去したときの影響を検討した。

4. 研究成果

アカイエカ由来の SGEs や TLR2 または TLR9 リガンド刺激により、日本脳炎ウイルスの病原性が増強することを示した (図 1A)。また、病理組織学的解析から、SGEs または TLR2 刺激では、感染局所において多数の免疫細胞が浸潤していることを示した (図 1B)。また、SGEs 刺激した局所では、自然免疫に関与すると考えられる遺伝子の強い亢進を確認し、中でも様々な Toll-like receptor (TLR) の発現が上昇することが観察された。このことから唾液中に TLR を刺激する物質が含まれていることが示唆された。

次に NF- κ B の転写応答配列を持ったレポーター遺伝子が組み込まれた細胞に各種 TLR を発現させた細胞株を用いて、SGEs を反応させレポーター遺伝子の発現を検討したところ、SGEs には TLR2 または TLR4 を刺激する物質が含まれていることを示唆する結果を得た。

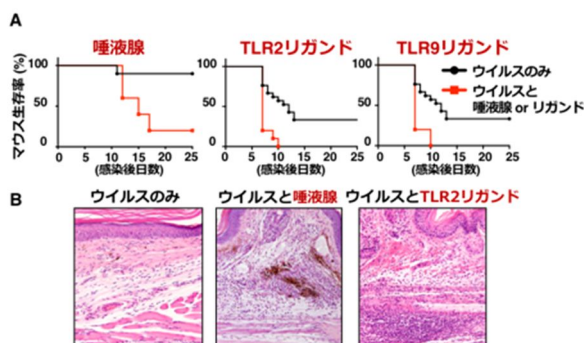


図2 蚊の唾液やTLR2刺激によりウイルスの病原性が亢進する
唾液腺やTLR2/9刺激により日本脳炎ウイルスのマウスへの病原性が亢進する (上段)。日本脳炎ウイルス単独では炎症細胞の浸潤はほとんど起きないが、唾液腺刺激やTLR2刺激により炎症性細胞の浸潤が観察される (下段)。

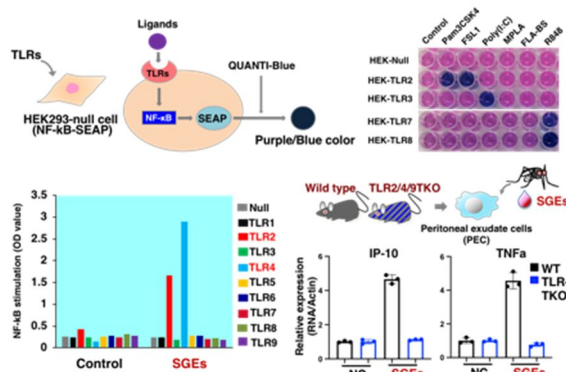


図3 アカイエカの唾液にはTLRを刺激する物質が含まれる
NF- κ Bの転写応答配列を持ったレポーター遺伝子が組み込まれた細胞に各種TLRを発現させた細胞株を作成した (上段)。作成したレポーター細胞にSGEsを反応させ、NF- κ B活性を定量化した。TLR2/4発現細胞でNF- κ Bの活性化が認められた (下段左)。野生型またはTLR2/4/9欠損マウスからマクロファージを調整し、SGEsで刺激したときのサイトカイン発現を定量化した (下段右)。

TLR2 リガンドがウイルス増殖に与える影響を検討したところ、感染 24 時間後の感染局所である Footpad においてリガンド刺激したマウスで高いウイルス RNA 量を示すことが分かった。また、脾臓やリンパ節といった抹消組織においてもウイルス増殖が亢進することを示唆する結果を得た。さらに、日本脳炎ウイルス感染では、抹消で増殖したウイルスが血液脳関門を通過し、脳に到達し、脳内で増殖することで脳炎をひき起こすと考えられている。そこで、脳におけるウイルス増殖を検討したところ、感染 6 日後において、リガンド刺激群でのみウイルスが脳で検出されることが分かった (図 4)。

以上の結果から、TLR2 刺激により抹消でのウイルス増殖が亢進されるため、ウイルスが素早く脳に到達し、病原性が増強したのだと考えられた。

次に、刺激によって集簇する免疫細胞集団の変化を網羅的に解析するため、CyTOF を用いて解析を行った。非感染、ウイルスのみ、ウイルスと TLR2 リガンド、ウイルスと SGEs を感染させたマウスの Footpad を 24 時間後に回収し、コラゲナーゼ等の酵素処理により細胞を調整し、

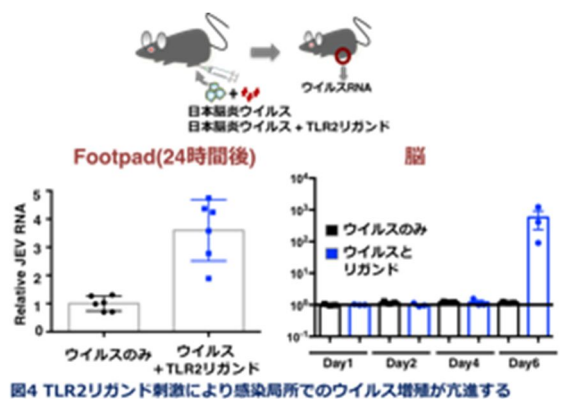


図4 TLR2リガンド刺激により感染局所でのウイルス増殖が亢進する

CyTOFによる解析を行った。その結果、SGEsまたはTLR2刺激では感染局所に多数の好中球が浸潤していることが明らかとなった(図5)。また、好中球を除いた免疫細胞において同様の解析を行ったところ、単球・マクロファージ系の細胞が増数していることが明らかとなった。これまでの研究から単球・マクロファージ系の細胞はフラビウイルスの標的細胞であることが報告されているため、刺激によって浸潤した好中球がウイルス感受性の高い単球・マクロファージ系の細胞を誘導することがウイルスの病原性増強につながるのではないかと考察した。

そこで、TLR2刺激によるウイルス病原性増強における好中球の役割を検討するために、好中球に対する中和抗体を用いて好中球を除去することによる影響を検討した。抗-Ly6G抗体の投与により、TLR2リガンドによって誘導される局所の腫脹や炎症反応が減弱することが明らかとなった。また、病原性に対する影響を検討すると、TLR2リガンド刺激により増強した病原性が、抗体の投与によって緩和されることを示した(図6)。このことから、好中球がTLR2刺激による病原性増強に重要な細胞であることが示唆された。

以上の結果から、蚊媒介性フラビウイルスは、蚊の唾液刺激による自然免疫応答を巧みに利用することで、効率的な感染を成し遂げる生存戦略を持っていることが示唆された。

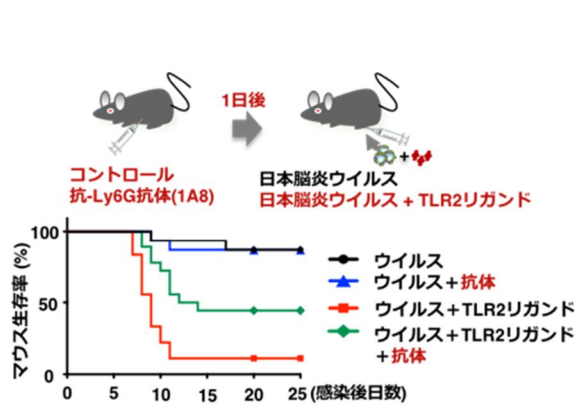


図5 好中球の除去によりTLR2刺激による病原性増強は抑制される

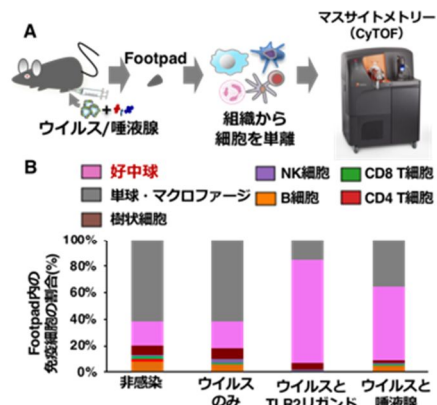


図6 マスサイトメトリーによる免疫細胞集団の網羅的解析
日本脳炎ウイルス感染24時間後に感染局所(Footpad)から細胞を単離し、マスサイトメトリーによる解析を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木達也
2. 発表標題 TLR ligands stimulate in vivo pathogenicity of Japanese encephalitis virus
3. 学会等名 American Society for Virology 38th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------