

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450418

研究課題名(和文) 粘膜免疫ワクチンで誘導されるIgA抗体の交差感染防御機構

研究課題名(英文) Mechanism of IgA-mediated cross protection induced by mucosal immunization

研究代表者

吉田 玲子 (YOSHIDA, Reiko)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教

研究者番号：80435966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ粘膜免疫ワクチンは、ワクチン株のみならず抗原変異株や異なる亜型ウイルスに対しても交差感染防御効果を有する。本研究において、交差結合活性を有するが中和活性は持たないHA特異的IgA抗体が上気道に多く存在することを見出した。また交差反応性IgA抗体はIgG抗体よりも高い抗インフルエンザウイルス活性を有していることを明らかにした。さらにウイルス粒子の放出阻害活性が中和活性のないIgA抗体でも認められ、この機能が亜型間交差感染防御に寄与しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Mucosal immunization with influenza virus vaccine confers cross-protection against infection with influenza virus antigenic variants as well as multiple subtypes of influenza A viruses. In this study, we found that many cross-reactive but non-neutralizing anti-HA IgA antibodies are produced in the upper respiratory tract of immunized mice. These anti-HA IgA antibodies showed stronger antiviral activities against influenza A viruses than IgG antibodies. Particularly, the results from this study suggest that the inhibition of virus particles release from the infected cell surface may be one of the IgA-mediated protective mechanisms important for heterosubtypic immunity.

研究分野：ウイルス学

キーワード：粘膜免疫 インフルエンザウイルス IgA 交差感染防御

1. 研究開始当初の背景

(1) A型インフルエンザウイルスは8分節のRNAから成り、11種類の蛋白質をコードしている。そのうちウイルス粒子表面糖タンパク質、ヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)の抗原性の違いによりそれぞれ H1-16と N1-9 に分類され、その組み合わせで亜型が決められている。免疫および感染によって誘導される抗体の多くは HA に対するものであり、感染防御に大きな役割を果たしているが、亜型間交差する抗体は少ない。

(2) 粘膜ワクチンの有利性は、侵入門戸である気道粘膜上で感染を防御することができることと、ワクチン株だけではなく異なる亜型のインフルエンザウイルスに対しても交差防御効果を示すことにある。粘膜免疫によって誘導される粘膜上の抗体は主に分泌型 IgA であり、ウイルスを中和することによって感染防御することが知られている。しかし誘導された抗体にはワクチン株と異なる亜型のウイルスに対する中和活性は認められない。

(3) 申請者はこれまでに経鼻免疫マウスから中和活性のある亜型間交差モノクローナル抗体 S139/1 の作出に成功している (PLoS Pathog. 5(3):e1000350, Proc Natl Acad Sci U S A. 109(42):17040-5.)。しかしこのような抗体はきわめて珍しく、多くの場合粘膜免疫による感染防御に中和抗体の関与は少ないものと考えられる。

2. 研究の目的

インフルエンザ粘膜免疫ワクチンは、ワクチン株のみならず抗原変異株や異なる亜型ウイルスに対しても交差感染防御効果を有する。経鼻粘膜免疫によって誘導される分泌型 IgA 抗体がこの交差感染防御の主要因であるとの報告があるが、どのようにして交差感染防御に働くかは分かっていない。本研究は、粘膜免疫によって誘導される IgA 抗体の機能をポリクローナル抗体および作出したモノクローナル抗体を用いて解析し、交差感染防御機構を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 経鼻免疫により誘導される抗体の反応性解析

マウスに不活化全粒子インフルエンザウイルスを経鼻免疫した後、異なる亜型のウイルスを用いて最終免疫または感染させる。3日後に鼻腔洗浄液、気管・肺胞洗浄液および血清を回収し、それぞれに含まれる IgA および IgG の各種亜型ウイルスに対する反応性および中和能を解析した。抗体の反応性は ELISA 法を用いて行った。

(2) 交差反応性 IgA 抗体モノクローナル抗体の抗ウイルス活性の解析

インフルエンザウイルスに対する亜型間

交差反応性のある HA、NP、および M に対する非中和モノクローナル抗体 (IgA または IgG) を用いて解析した。また同じエピトープを持つ IgG と IgA の反応性を比較した。

中和試験(細胞侵入阻害)

抗体とウイルスを反応させた後、MDCK 細胞に吸着させて洗浄後培養し、プラーク数の減少を指標に阻害活性を調べる。

細胞表面中和試験(出芽阻害)

MDCK 細胞にウイルス (50-100PFU) を感染させた後、抗体を含む寒天培地で培養して、プラークサイズの大きさを調べた。表面中和しているものは小さくなる。(J Virol 62:2762 - 2772)。さらに、MDCK 細胞にウイルス感染させた後洗浄し、抗体含有液体培地で 6-8 時間培養時の上清中および細胞中のウイルス量を、抗体非存在下または陰性対照抗体存在下のウイルス量と比較して評価した。

細胞内中和試験

トランズウェルプレートを用いて、ポリ Ig レセプター (pIgR) 発現 MDCK 細胞をインサート膜上でコンフルエントな状態まで培養する。底部にモノクローナル抗体を加え、インサート内にウイルスを感染させて培養後、細胞内で増殖したウイルスを経時的に定量した。同時に細胞内の IgA 抗体とウイルスタンパク質の局在を、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 経鼻免疫により誘導される抗体の反応性解析

BALB/c マウスの鼻腔内または皮下にホルマリン不活化ウイルス (H1、H3、H5、H7、H9 または H13 亜型) を接種し、血清、気管肺胞洗浄液および鼻腔洗浄液中に含まれる IgA および IgG 抗体について解析した。HA 亜型ウイルスに対する交差反応性を調べたところ、いずれの亜型のウイルスを免疫原とした場合でも、複数の亜型の HA に交差結合する抗体が誘導されることが明らかとなった。図1には H9 で免疫した時の各サンプルの 16 亜型 HA に対する反応性を示した。交差結合が認められた HA 亜型は、HA のアミノ酸配列に基づいた系統樹上で免疫原と近縁な亜型に多い傾向が認められた。IgA は経鼻免疫群でのみ高い誘導が認められた。

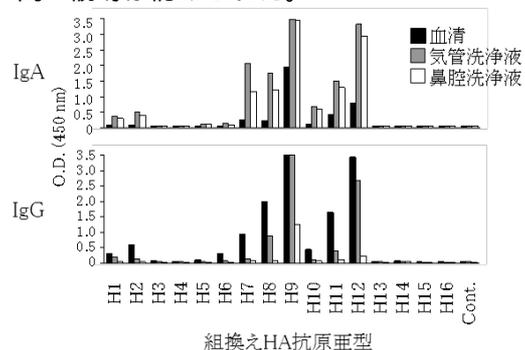


図1 H9ウイルス経鼻免疫で誘導された抗体の交差反応性

誘導された抗体は、免疫に用いたウイルスに対して中和活性を示したが、異なる亜型のウイルスに対する中和活性は認められなかった。しかし、気管肺胞洗浄液存在下で様々な亜型のウイルスを培養すると、中和活性はないが結合性を示した亜型のウイルスに対し、プラーク形成の抑制が認められた(図2)。さらにウイルスの出芽放出阻害効果も観察された。その効果は、気管肺胞洗浄液に抗 IgA 抗体を加えることで見られなくなることから、気管肺胞洗浄液中に存在する IgA に亜型間交差感染を抑制する効果があることが明らかになった。

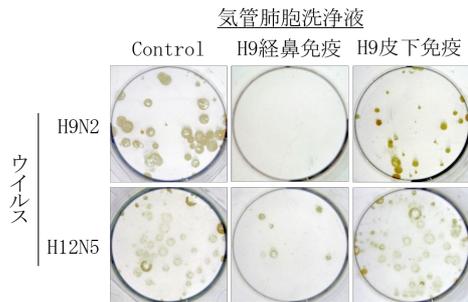


図2 気管肺胞洗浄液存在下でのプラーク形成抑制

(2) 交差反応性 IgA モノクローナル抗体の抗ウイルス活性の解析

経鼻免疫マウスから作出した中和活性のある亜型間交差モノクローナル抗体を用いて IgA と IgG の抗ウイルス活性を比較した。H3 ウイルスを抗原として得られたモノクローナル抗体 S139/1 (IgG) は、H1、H2、H3、H13、および H16 ウイルスに中和活性を示す。この抗体を産生するハイブリドーマから自発的にクラススイッチして IgA 抗体を産生するようになった細胞を分離して、同じエピトープを認識する IgA 抗体を得た。

IgA と IgG 抗体の結合活性を ELISA 法で解析して比較したところ、免疫原である H3HA に対して IgA は IgG と同等の強い結合性を示した。他の亜型の HA に対しては IgA が IgG よりも顕著に高い結合性を示した。中和活性は、結合活性同様に、免疫に用いたウイルスに対してアイソタイプの違いにおいて差はなかったのに対し、他の亜型のウイルスに対し IgA は IgG に比べ 50%阻害濃度で 4 倍から 23 倍強い中和活性を示した(図3)。

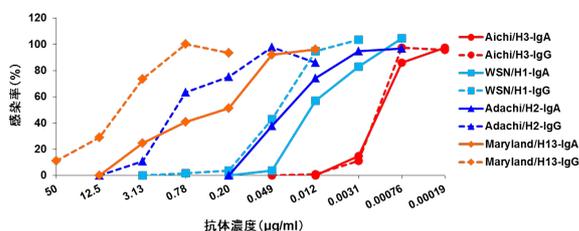


図3 S139/1 IgAおよびIgGの交差中和活性

さらに、MDCK 細胞にウイルスに感染させた後 S139/1 IgA を加えた液体培地で培養した

ところ、上清中に放出されるウイルス量は、H1、H2 および H3 ウイルスすべてで顕著に減少した。一方 IgG 添加では、ウイルス粒子放出はほとんど阻害されなかった。また、透過型電子顕微鏡観察において、IgA 存在下では細胞から出芽したウイルス粒子が凝集し、細胞表面に付着した状態で存在していることが分かった(図4)。

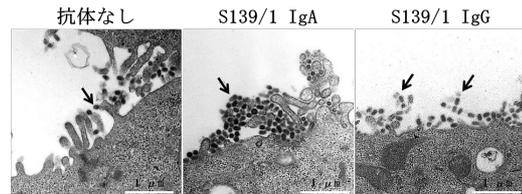


図4 S139/1 IgA存在下におけるウイルス粒子の細胞表面での凝集

次に、細胞内で IgA を輸送するのに必要な pIgR を恒常的に発現する MDCK 細胞を構築してトランスウエルのインサートの膜状に単層培養した。ウイルスを細胞に吸着後、基底部に抗体を加えて上清中のウイルス数を測定したところ、IgA 添加時は IgG よりも明らかに粒子数が少なかった(図5)。これは抗体が細胞内を移行するときにウイルスタンパク質に結合してウイルスの生成を抑えていることが考えられる。しかし、細胞上で放出を妨げていることも考えられるので、今後電子顕微鏡などによる観察が必要であると考える。

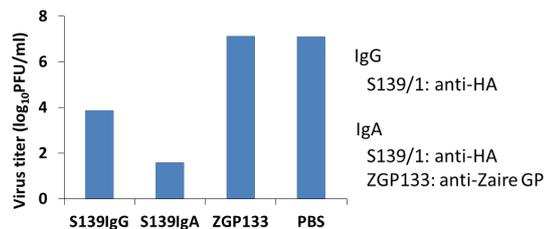


図5 抗体の細胞内中和(上清中のウイルス数)

以上の結果、粘膜免疫により IgA は上気道に優位に存在し、IgG に比べ強い抗ウイルス活性を有することが明らかになった。さらに中和活性を示さない抗体においても結合することでウイルスの放出阻害することで、亜型間交差感染防御に寄与していることが示唆された。IgA の強い抗ウイルス活性は、IgA が多量体であり一分子あたりの結合部位が多いことに起因しているのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

Furuyama W, Marzi A, Nanbo A, Haddock E, Maruyama J, Miyamoto H, Igarashi M, Yoshida R, Noyori O, Feldmann H, Takada

A, Discovery of an antibody for pan-ebolavirus therapy., Sci Rep., 6:20514. 2016. DOI: 10.1038/srep20514. 査読有.

Itoh Y*, Yoshida R*, Shichinohe S, Higuchi M, Ishigaki H, Nakayama M, Van Loi Pham, Ishida H, Kitano M, Arikata M, Kitagawa N, Mitsuishi Y, Ogasawara K, Tsuchiya H, Hiono T, Okamatsu, Sakoda Y, Kida H, Ito M, Le Quynh Mai, Kawaoka Y, Miyamoto H, Ishijima M, Igarashi M, Suzuki Y, Takada A, Protective Efficacy of Passive Immunization with Monoclonal Antibodies in Animal Models of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection., PLoS. Pathog. 10(6):e1004192, 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004192. 査読有.

Muramatsu M*, Yoshida R*, Yokoyama A, Miyamoto H, Kajihara M, Maruyama J, Nao N, Manzoor R, Takada A, Comparison of antiviral activity between IgA and IgG specific to influenza virus hemagglutinin: increased potential of IgA for heterosubtypic immunity., PLoS One. 17;9(1):e85582, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085582. 査読有.

Muramatsu M, Yoshida R, Miyamoto H, Tomabechi D, Kajihara M, Maruyama J, Kimura T, Manzoor R, Ito K, Takada A, Heterosubtypic antiviral activity of hemagglutinin-specific antibodies induced by intranasal immunization with inactivated influenza viruses in mice., PLoS One. 8(8):e71534, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0071534. 査読有.

〔学会発表〕(計 8 件)

吉田玲子, H5N1 インフルエンザウイルスに対する中和抗体を用いた受動免疫の感染防御効果、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 12 日、パフィコ横浜(神奈川)

村松美笑子、A 型インフルエンザウイルスヘマグルチニン特異 IgA 抗体の亜型間交差抗ウイルス活性、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 12 日、パフィコ横浜(神奈川)

Ayato Takada, Comparison of antiviral activity between Ig and IgG specific to influenza virus hemagglutinin: increased potential of IgA for heterosubtypic immunity, the

16th International Congress of Virology, 28 July 2014, Montréal, (Canada)

村松美笑子、A 型インフルエンザウイルスヘマグルチニン特異的 IgA と IgG の亜型間交差抗ウイルス活性の比較について、第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、2014 年 6 月 19 日 20 日、北海道大学(札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.czc.hokudai.ac.jp/epidemiol/research/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 玲子 (YOSHIDA, Reiko)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・特任助教
研究者番号: 80435966

(2) 連携研究者

高田 礼人 (TAKADA, Ayato)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
研究者番号: 10292062