

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07958

研究課題名(和文)呼吸器官局所でのインフルエンザウイルスに対するIgA中和抗体産生メカニズムの解析

研究課題名(英文)The mechanism of anti-viral IgA production in respiratory tract

研究代表者

宮内 浩典 (Miyachi, Kosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：50619856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス感染防御においてはウイルス特異的中和抗体が主要な役割を担う。感染を初期で収束させるには、ウイルスを認識するIgAを上気道に誘導することが重要であるが、その誘導機構は不明である。本研究により呼吸器官におけるインフルエンザウイルス特異的IgAの産生には、ウイルス増殖によって誘導されるIL-6やIFN-gが重要な働きを担っていることが明らかとなった。またIgG1産生において重要な機能を担っているTfh細胞や胚中心は、抗ウイルスIgA産生においては必須ではないことが明らかとなった。これらの結果は上気道へのIgA誘導型ワクチンの開発において重要な基礎的知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Mucosal humoral immunity in respiratory tract is a major defense system against influenza virus infection. The mucosal IgA regulation in small intestine is well studied, however, less is known of mechanism of anti-virus IgA induction in respiratory tract. Here, we showed the secretion of IL-6 and IFN-g mediated by the viral replication in lung was critical for anti-virus IgA induction. Our experiments using Bcl6 deficient mice, which does not develop Tfh cells and germinal center B cells, revealed that Tfh cells and germinal centers were dispensable for the anti-virus IgA induction in lung. Our finding give the informative insight for development of novel mucosal anti-influenza vaccines.

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 IgA 中和抗体 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス感染防御においてはウイルス特異的中和抗体が主要な役割を担う。インフルエンザウイルスは鼻腔より侵入したのち、まず上気道で増殖しその後下気道、肺へと感染を広げることで重症化する。重症化を防ぐためには上気道で感染を食い止めることが必要である。上気道に存在する抗体は IgA が主であり、感染を初期で収束させるには、インフルエンザウイルスのエンベロプタンパク質である HA を認識する IgA を誘導することが必須となる。また同じエпитオプを認識する IgA と IgG では IgA の方が交叉反応性に優れることが知られており、変異ウイルスに対する防御においても IgA 抗体が重要視されている。しかしながら、通常の不活化ワクチンの接種では IgG は誘導できるが、効率良く IgA を誘導することは困難である。IgA 誘導型ワクチンの開発が困難な原因として、呼吸器での IgA の産生機構についてほとんど明らかとなっていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルス感染の場合、感染細胞やウイルス抗原が樹状細胞に捕捉され、所属リンパ節に移動後、リンパ節にて T 細胞や B 細胞への抗原提示が行われる。その後、ウイルス抗原に親和性をもつ B 細胞受容体を発現した B 細胞の活性化とイムノグロブリンのクラススイッチが起こることでウイルス特異的抗原産生細胞が構築される。全身性に産生されるウイルス特異的 IgG に関しては、胚中心と呼ばれる 2 次リンパ組織特有の細胞構造が重要であることなど、その産生機構が知られてきたが、呼吸器官に産生される IgA に関しては、その産生機構についてほとんど明らかとなっていない。本研究では呼吸器官におけるウイルス特異的 IgA 産生 B 細胞の誘導メカニズムについて明らかとすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス、ウイルス：実験系としてインフルエンザウイルス感染マウスモデルを用いた inVivo 解析を採用した。マウスは C57BL/6j を用いた。インフルエンザウイルスはヒトから分離された 2009 年パンデミック株 (Narita H1N1) と、季節性株である PR8 株 (PR8 H1N1) を用いた。

(2) 解析手法：ウイルス特異的抗体の抗体価測定は、インフルエンザウイルス HA を固相化したプレートを用いた ELISA によって測定した。FACS 解析およびソーティングは BD 社の FACS Calibur および Aria を用いて行った。RNAseq 解析のためのライブラリー調整を NEB 社の Kit にて行い、Illumina 社の HiSeq によってシーケンシングを行った。

4. 研究成果

(1) まず、我々はどうのような免疫方法によりウイルス特異的 IgA が産生されるのかについて調べるために、生ワクチンに相当する感染性ウイルスと、不活化ウイルス全粒子、ウイルス全粒子からウイルス RNA を除いたスプリットワクチンをそれぞれマウスに経鼻投与した。その結果、感染性ウイルスを投与した際のみ気道洗浄液中にウイルス特異的 IgA の産生が認められた (図 1)。また、同じ感染性ウイルスを用いても、ウイルス感染に抵抗性のマウスでは、ウイルス特異的 IgA 産生は見られなかった。これらのことからウイルスが呼吸器官で増殖することが IgA 産生には必須であることが明らかとなった (図 2)。

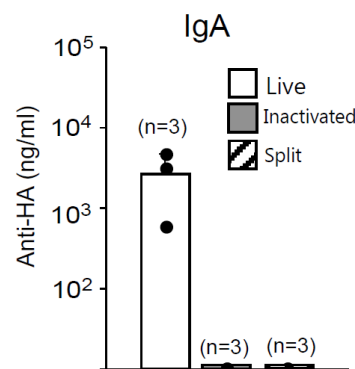


図 1. Live : 生ワクチン (ウイルス感染)、Inactivated : ホルマリンによる不活化ウイルス、Split : ウイルスタンパク成分のみ。これらをマウスに経鼻投与し、投与後 14 日後の肺胞洗浄液中の抗 HA-IgA 抗体価を ELISA にて測定した。

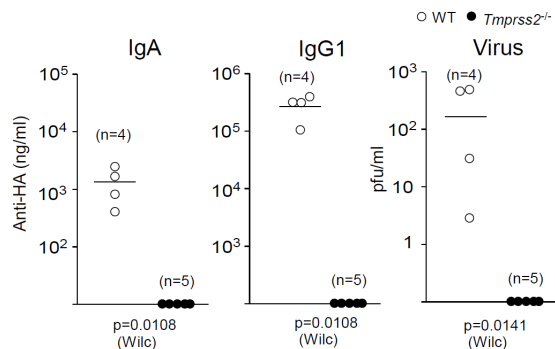


図 2. WT : 野生型マウス、Tmprss2^{-/-} : Tmprss2 欠損マウス (Tmprss2 を欠損したマウスではインフルエンザウイルスの HA の成熟化が起こらないため、ウイルスが増殖しない)。これらのマウスに Narita 株のウイルスを経鼻投与し、投与後 14 日後の肺胞洗浄液中の抗 HA-IgA (左) と IgG1 (中央) の抗体価を ELISA にて測定した。また肺中のウイルス量 (右) は感染 6 日目の肺のホモジネートを用いて MDCK 細胞でのプラークアッセイにて測定した。

(2) ウイルス感染においては体液性免疫応答のみならず細胞性免疫応答も誘導され、呼吸器官に誘導されたウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) によって、ウイルス感染細胞が除去されることが知られている。感染によって呼吸器官に誘導される抗体がウイルス防御能を有していることを証明するために、ウイルス感染マウスの肺胞洗浄液を採取し、別の非免疫マウスに経鼻投与することで、ウイルス感染に対する防御効果が認められるかを検討した。この方法であれば CTL の影響を排除して肺胞洗浄液中の抗体の防御効果のみを評価できる。感染マウスの肺胞洗浄液を投与したマウスではウイルス感染による体重減少が認められず、投与した肺胞洗浄液中の抗体によってウイルスが中和されたと考えられた (図 3)。この結果からウイルス感染によって呼吸器官内にウイルス防御能をもつ中和抗体が誘導されることが明らかとなった。

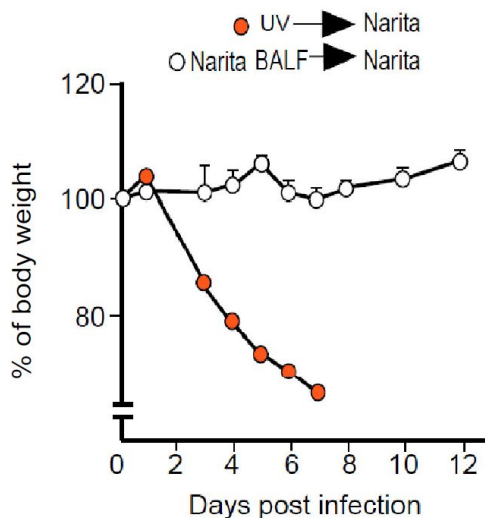


図 3 . 赤丸：非免疫マウスの肺胞洗浄液を経鼻投与したマウス、白丸：ウイルスを感染させたマウスの肺胞洗浄液を経鼻投与したマウス。それぞれのマウスに致死量のインフルエンザウイルスを感染させ、感染後 12 日目までの体重変化を記録した。

(3) IgA 抗体の産生にはヘルパー T 細胞に依存する経路とヘルパー T 細胞非依存的な経路が存在することが知られている。ヘルパー T 細胞依存的な経路による IgA の産生では、抗原を捕捉した樹状細胞がリンパ節に移動し、リンパ節で抗原特異的ヘルパー T 細胞を活性化することで、抗原特異的な IgA を産生する B 細胞が選択されると考えられている。インフルエンザ特異的 IgA 産生にヘルパー T 細胞とリンパ節が必要であるか否かを調べるために、機能的 T 細胞を持たない $Cd3e^{-/-}$ マウスとリンパ節へのリンパ球の移動が生じない

$Ccr7^{-/-}$ マウスを用いて、ウイルス感染実験を行い、呼吸器官に誘導されるウイルス特異的 IgA 抗体価を測定した。T 細胞を持たないマウスおよびリンパ節にリンパ球が移動しないマウスでは感染によるウイルス特異的 IgA の誘導は見られなかった (図 4)。これらのことから呼吸器官におけるウイルス特異的 IgA の産生にはヘルパー T 細胞と適切なリンパ節の環境が必須であることが明らかとなった。

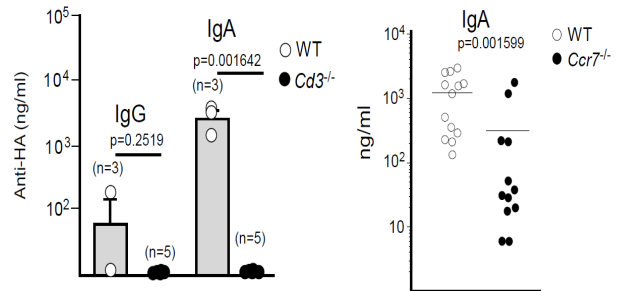


図 4 . WT : 野生型マウス、 $Cd3^{-/-}$: $Cd3e$ 欠損マウス (T 細胞受容体が欠損しているため、機能的な T 細胞を持たない)、 $Ccr7^{-/-}$: $Ccr7$ 欠損マウス (リンパ節への移行に必要なケモカインの信号を受け取る受容体が欠損したマウス)。これらのマウスに Narita 株のウイルスを経鼻投与し、投与後 14 日後の肺胞洗浄液中の抗 HA-IgA 抗体価を ELISA にて測定した。

(4) リンパ節で抗原提示を受けたヘルパー T 細胞はリンパ節内の T 細胞領域から B 細胞領域へと移動し、同じ抗原を認識する B 細胞との相互作用を経て、濾胞性ヘルパー T 細胞 (T Follicular helper: Tfh) 細胞へと分化する。B 細胞濾胞へと侵入し Tfh 細胞となったヘルパー T 細胞は、もう一度、同じ抗原を認識する B 細胞と相互作用しながら胚中心 B 細胞の分化を誘導することで、胚中心をリンパ節内の B 細胞濾胞内に形成する。胚中心では高親和性抗体を産生する B 細胞の選別と増殖が行われることで高親和性抗体が産生されると考えられている。ウイルス特異的 IgA の誘導に Tfh 細胞や胚中心が必要であるかどうかを調べるため、Tfh 細胞を持たないマウスと胚中心 B 細胞を持たないマウスを用いて実験を行った。これらのマウスでは Bcl6 という転写因子が T 細胞もしくは B 細胞特異的にノックアウトされており、そのために Tfh 細胞や胚中心は形成されない。これらの Tfh 細胞あるいは胚中心 B 細胞不全マウスにインフルエンザウイルスを感染させ、ウイルス特異的 IgA 産生を測定したところ、Tfh 細胞や胚中心 B 細胞が不全であるマウスにおいてもウイルス特異的 IgA の産生は認められた (図 5)。これらのことから呼吸器官におけるウイルス特異的 IgA の産生に Tfh 細胞や胚中心は必

須ではないことが明らかとなった。

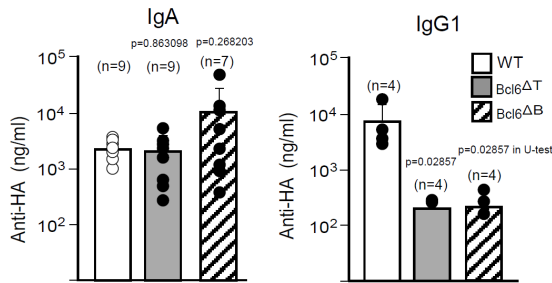


図 5. WT : 野生型マウス、 $Bcl6^{\Delta T}$: T 細胞特異的 $Bcl6$ 欠損マウス (Tfh 細胞を持たない)、 $Bcl6^{\Delta B}$: B 細胞特異的 $Bcl6$ 欠損マウス (胚中心 B 細胞を持たない)。これらのマウスに Narita 株のウイルスを経鼻投与し、投与後 14 日後の肺胞洗浄液中の抗 HA-IgA および IgG1 の抗体価を ELISA にて測定した。

(5)不活化ウイルスによる免疫では IgA は産生されず、生ワクチンすなわちウイルスが感染したときのみ、ウイルス特異的 IgA が誘導されるため、感染によって呼吸器官に形成される環境がウイルス特異的 IgA 産生に必要であることが考えられる。この環境を構成する細胞を調べる目的で、感染マウスの肺から、主に抗原提示に関与する樹状細胞、肺胞上皮細胞、クララ細胞、マクロファージを細胞表面マーカーによる染色後、セルソーターによって分離し、RNAseq による網羅的遺伝子発現解析をおこなった。その結果すべての細胞において感染によって 型インターフェロンの発現の上昇が見られた。また、マクロファージにおいては感染による IL-33 の発現上昇が認められた。樹状細胞とマクロファージでは IL-6 の顕著な発現上昇が見られた (図 6)。これらのサイトカインの抗ウイルス IgA 産生における役割を調べるために、 型インターフェロン受容体の欠損マウスと IL-33、IL-6 の欠損マウスでの IgA 産生を解析した。またこれまでに IgA の産生に関与することが報告されている IL-22、IL-23、IL-25、IL-17、IL-10 の欠損マウスにおいても同様の解析を行った。その結果 IL-6 の欠損マウスにおいて顕著なウイルス特異的 IgA 産生の低下が認められた (図 7)。つぎにヘルパー T 細胞によって産生され B 細胞での抗体のクラススイッチを制御することが知られている IL-4、IL-21、IFN- γ についてウイルス特異的 IgA 産生における役割を検討した。これらのサイトカインの欠損マウスのうち IFN- γ の欠損マウスのみにおいて顕著なウイルス特異的 IgA 産生の低下が認められた (図 8)。これらの結果からウイルス感染によって呼吸器官に形成される IL-6 や IFN- γ の豊富な環境がウイルス特異的 IgA 産生の誘導に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

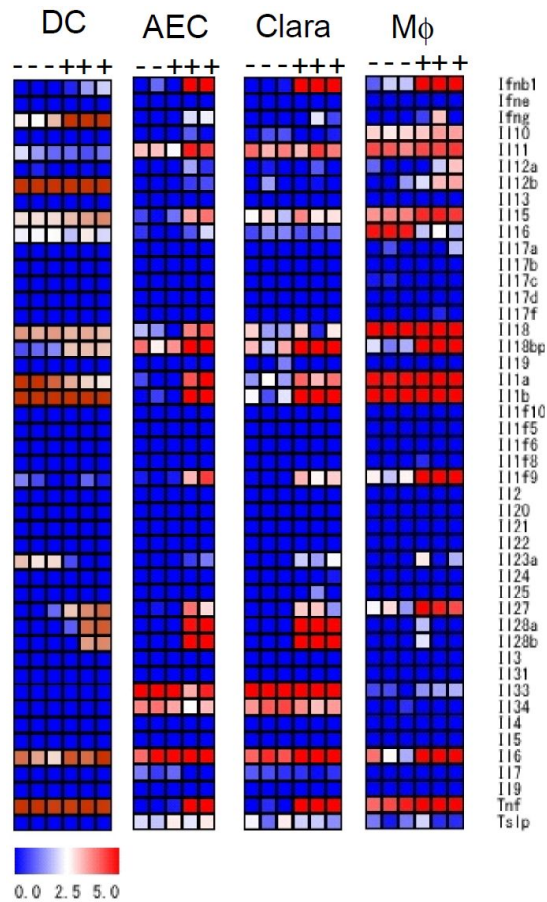


図 6. DC: 樹状細胞、AEC : 肺胞上皮細胞、Clara: 肺クララ細胞、 $M\phi$: マクロファージ、- : ウイルス非感染マウスサンプル、+ : ウイルス感染マウスサンプル。PR8 株のウイルスを感染させたマウスより、感染 3 日後に肺を摘出し、それぞれの細胞の細胞表面マーカー分子を蛍光標識抗体によって染色後、セルソーターを用いて、細胞を分離した。分離した細胞から mRNA を抽出し cDNA ライブラリーを作成、次世代シーケンサーを用いてシーケンスすることで発現解析を行った (RNAseq 解析)。右に GeneSymbol で示した遺伝子の発現をヒートマップとして表示した。

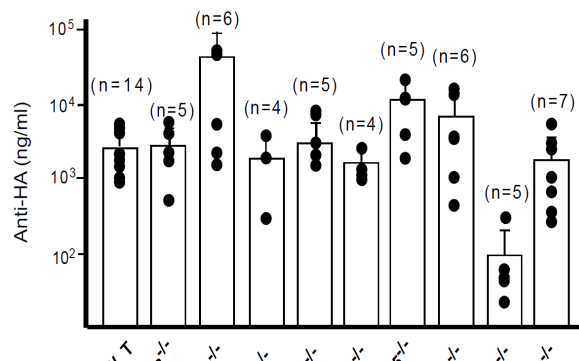


図 7. WT : 野生型マウス、 $Ifnra^{-/-}$: 型インターフェロン受容体欠損マウス、 $Tslpr^{-/-}$: TSLP 受容体欠損マウス、 $Il33^{-/-}$: IL-33 欠損マウス、 $Il22^{-/-}$: IL-22 欠損マウス、 $Il23^{-/-}$:

IL-23 欠損マウス、 $Il25^{-/-}$: IL-25 欠損マウス、 $Il17a^{-/-}$: IL-17A 欠損マウス、 $Il6^{-/-}$: IL-6 欠損マウス、 $Il10^{-/-}$: IL-10 欠損マウス。これらのマウスに Narita 株のウイルスを経鼻投与し、投与後 14 日後の肺胞洗浄液中の抗 HA-IgA 抗体価を ELISA にて測定した。

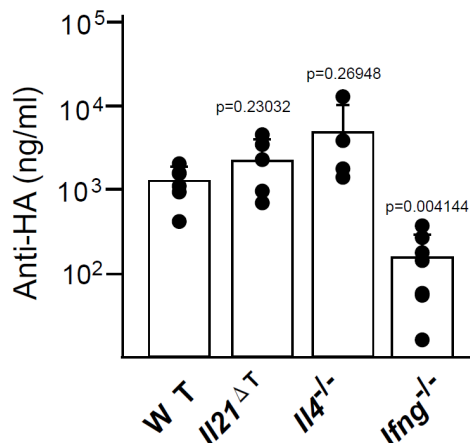


図 8. WT: 野生型マウス、 $Il21^{\Delta T}$: T 細胞特異的 IL-21 欠損マウス、 $Il4^{-/-}$: IL-4 欠損マウス、 $Ifng^{-/-}$: IFN- γ 欠損マウス。これらのマウスに Narita 株のウイルスを経鼻投与し、投与後 14 日後の肺胞洗浄液中の抗 HA-IgA 抗体価を ELISA にて測定した。

(6)まとめ

本研究により呼吸器官におけるインフルエンザウイルス特異的 IgA の産生には、ウイルスの感染が必須であり、肺組織におけるウイルス増殖によって誘導される IL-6 や IFN-g が重要な働きを担っていることが明らかとなった。また全身性のウイルス特異的 IgG1 産生において重要な機能を担っている Tfh 細胞や胚中心は、抗ウイルス IgA 産生においては必須ではないことが明らかとなった。これらの結果は上気道への IgA 誘導型ワクチンの開発において重要な基礎的知見を与えるものである。

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 14 件)

1. Insights into gene expression profiles induced by Socs3 depletion in keratinocytes
Bajpai A, Ishii T, Miyauchi K, Gupta V, Nishio-Masaie Y, Shimizu-Yoshida Y, Kubo M and Kitano H
Scientific Reports, volume 7
2017 Nov 20 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-16155-1
2. Is germinal center selection required for influenza vaccination? Miyauchi K and Kubo M, *Cellular & Molecular Immunology* 2017 Aug 14, 655-657. 査読有

DOI: 10.1038/cmi.2017.40

3. Helper T Cell Responses to Respiratory Viruses in the Lung: Development, Virus Suppression, and Pathogenesis.
Miyauchi K *Viral Immunology* 2017 June 26, 421-430 査読有
DOI:10.1089/vim.2017.0018
4. Mathematical Modeling of Atopic Dermatitis Discloses "Double switch" Mechanisms Underlying Disease Onset, Progression and Prevention and Predicts Four Common Disease Phenotypes.
Dominguez-Hüttinger E, Christodoulides P, Miyauchi K, Irvine AD, Okada-Hatakeyama M, Kubo M, Tanaka RJ, *J. Allergy Clin Immunol* 2016 Dec 5; S0091-6749(16)31433-6. 査読有
DOI:10.1016/j.jaci.2016.10.026.
5. Protective neutralizing influenza antibody response in the absence of T follicular helper cells. Miyauchi K, Sugimoto-Ishige A, Harada Y, Adachi Y, Usami Y, Kaji T, Inoue K, Hasegawa H, Watanabe T, Hijikata A, Fukuyama S, Maemura T, Okada-Hatakeyama M, Ohara O, Kawaoka Y, Takahashi Y, Takemori T, Kubo M, *Nature Immunology* 2016 Dec 17; 12: 1447-1458 査読有
DOI:10.1038/ni.3563.
6. A triazinone derivative inhibits HIV-1 replication by interfering with reverse transcriptase activity. Urano E, Miyauchi K, Kojima Y, Hamatake M, Ablan SD, Fudo S, Freed EO, Hoshino T, Komano J. *Chem Med Chem*. 2016 11:2320-2326 査読有 DOI:10.1002/cmdc.201600375.
7. Conformational properties of the third variable loop of HIV-1AD8 envelope glycoprotein in the liganded conditions. Takeda S, Takizawa M, Miyauchi K, Urano E, Fujino M, Murakami T, Murakami T, Komano J. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jun 17;475(1):113-8 査読有 DOI:10.1016/j.bbrc.2016.05.051
8. CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. Takeuchi A, Badr Mel S, Miyauchi K, Ishihara C, Onishi R, Guo Z, Sasaki Y, Ike H, Takumi A, Tsuji NM, Murakami Y, Katakai T, Kubo M, Saito T. *J Exp Med*. 2016 Jan 11;213(1): 123-38 査読有 DOI:10.1084/jem.20150519
9. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama

- H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S, *Immunity*. 2015 Jul 21;43(1):175-86 査読有
DOI:10.1016/j.immuni.2015.06.021.
10. 胚中心に依存しないインフルエンザウイルス中和抗体産生
宮内浩典、久保允人
「臨床免疫・アレルギー科」
Vol.68, No.4
2017年10月 査読無
11. インフルエンザウイルスに対する中和抗体の産生機構
久保允人、宮内浩典
「感染・炎症・免疫」Vol.47, No.3
2017年10月 査読無
12. ウイルスワクチンによる TH1 を介する中和抗体
宮内浩典、久保允人
「臨床免疫・アレルギー科」
2017年8月 査読無
13. 濾胞性ヘルパーT細胞に依存しないインフルエンザ中和抗体の産生メカニズム
宮内浩典、久保允人
「新着論文レビュー」
2016年11月 査読無
14. インフルエンザウイルス感染に対する液性免疫
宮内浩典、久保允人
「臨床免疫・アレルギー科」Vol.66, No.3
2016年9月 査読無

〔学会発表〕(計 10件)

- MIYAUCHI Kosuke, KUBO Masato
第46回日本免疫学会学術集会
Virus replication drive mucosal antibody against heterologous influenza viruses
2017年12月12日~14日
仙台国際センター(宮城県仙台市)
MIYAUCHI Kosuke, KUBO Masato
ICIS2017
IFN- γ producing TH cells and IL-6 signal dependent anti-viral IgA response in lung
2017年10月30~11月1日
ANA クラウンプラザ金沢/石川音楽堂(石川県金沢市)
MIYAUCHI Kosuke, KUBO Masato
第7回国際KTCC学術集会
Intrinsic role of lung recruitment of TH1 cells for mucosal IgA production in influenza virus infection.2017年3月13~17日
京都大学芝蘭会館(京都府京都市)
宮内浩典
第26回東京免疫フォーラム
TH細胞非依存的なインフルエンザ中和抗体の誘導機構 2017年3月23日
東京大学医学研究所・付属病院8階会議室(東京都港区)
MIYAUCHI Kosuke, TAKEMORI Toshitada,

KUBO Masato

- 第45回日本免疫学会学術集会
IFN-g and IL-6-dependent production of influenza virus specific IgA 2016年12月5日~7日
沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル(沖縄県那覇市)
MIYAUCHI Kosuke, KUBO Masato
ICI2016
IFN-g and IL-21 producing TH1 cells dependent IgG2 responses gave a protection to H5N1 pandemic influenza virus 2016年8月21日~26日
Melbourne Convention and Exhibition Centre(オーストラリア、メルボルン)
MIYAUCHI Kosuke, KUBO Masato
第26回KTCC学術集会
IL-21産生TH1細胞によるインフルエンザウイルス感染防御IgG2抗体の誘導 2016年5月20~21日
比叡山延暦寺会館(滋賀県大津市)
MIYAUCHI Kosuke, KUBO Masato
第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
IL-6-STAT3 axis in T-B interaction controls mucosal IgA response specific for influenza virus. 2016年5月13日~14日
長崎大学坂本キャンパス良順会館 ポンベ会館(長崎県長崎市)
MIYAUCHI Kosuke, SUGIMOTO-ISHIGE Akiko2, TAKAHASHI Yoshimasa3, HASEGAWA Hideki4, TAKEMORI Toshitada5, KUBO Masato
第44回日本免疫学会学術集会
Germinal centers and follicular helper T cells are dispensable for a protective antibody response to acute influenza A virus infection 2015年11月18日~20日
札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
MIYAUCHI Kosuke, KUBO Masato
第25回KTCC学術集会
Nasal vaccine with live influenza virus specifically induce Bcl-6 independent and IFN-g-dependent IgA response in the lung
2015年5月15~16日
京都大学芝蘭会館(京都府京都市)
6. 研究組織
(1)研究代表者
宮内浩典(MIYAUCHI, Kosuke)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・副チームリーダー、研究者番号:50619856
(3)連携研究者
久保允人(KUBO, Masato)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・チームリーダー、東京理科大学・総研機構生命医科学研究センター・教授、研究者番号:40277281