

令和元年6月18日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06246

研究課題名(和文) Gas6/Ax1シグナルによるRSV感染に伴う免疫応答の制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of Gas6/Ax1 signal in the immune response associated with RSV infection

研究代表者

柴田 岳彦 (Shibata, Takehiko)

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：00739196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,600,000円

研究成果の概要(和文)：呼吸器感染症ウイルスであるrespiratory syncytial virus(RSV)は、それに対して終生免疫ができないばかりかワクチンも存在しない。本研究では、RSVワクチン接種によるアレルギー応答やRSV感染に伴うタイプ2免疫応答の誘導機構を検討した。まず、ホルマリン固定RSVワクチン接種により産生されるgrowth arrest specific 6がその受容体Ax1を介してアレルギー性気道炎症を誘導することを明らかにした。またAx1阻害剤は、免疫応答をタイプ2から1にシフトさせ、ワクチン接種時のアジュバントになり得ること、またRSVの排除に有用であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、安全性と有効性を担保した新しいrespiratory syncytial virus (RSV) ワクチン接種方法となる可能性がある。また、Ax1シグナル阻害により免疫応答をシフトさせるという新しい概念は、抗ウイルス薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Respiratory syncytial virus (RSV) vaccine is currently not available. In this study, we examined the induction mechanism of allergic responses after vaccination with RSV and type 2 immune response with RSV infection. First, it was revealed that growth arrest specific 6 produced by formalin fixed RSV induces type 2 immune response (allergic airway inflammation) via its receptor Ax1. We also found that Ax1 inhibitor shift the immune response from type 2 to 1 and can be an adjuvant and also useful for the elimination of RSV.

研究分野：感染免疫学

キーワード：Ax1 RSV タイプ2免疫 ワクチン Gas6

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ほぼ100%の乳幼児が2歳までに respiratory syncytial virus (RSV) に感染し、細気管支炎や肺炎といった重篤な下気道疾患に陥ることがある。また、1960年代に行われた RSV ワクチンの臨床試験では、その接種後に RSV に自然感染しても有効な抗 RSV 抗体が誘導されなかった。そればかりか、感染後強いアレルギー性気道炎症がおき、かえって病態が悪化し、死に至るケースもあった。現在考えられているこの原因は、過剰な RSV 感染特有のタイプ2免疫応答の誘導である。なお、繰り返し RSV に自然感染 (特に初回感染が生後6ヶ月未満) するとしばしばアレルギー性喘息を発症することは、ワクチン接種に伴うアレルギー発症機構と同様である。特に RSV のコンポーネントタンパクのひとつである G タンパクがタイプ2免疫応答を誘導する。ただし、その詳細な機構は不明である。一方、健康な成人では RSV 感染では感冒程度の軽症で済むことが多いが、それでも繰り返し感染する。また高齢者における RSV 感染後の二次性細菌性肺炎、喘息などの呼吸器基礎疾患を持つ成人の RSV 感染による増悪も問題となっている。このような状況下、RSV ワクチンの開発には至っていない。それゆえ、ワクチン開発と共に RSV 感染に関連するそれぞれの疾患に対する治療法や治療薬の開発が必要とされる。したがって、RSV が誘導する上記免疫応答の解明は、これら開発へとつながるはずである。

2. 研究の目的

以前我々は、真菌誘導喘息モデルを用いて growth arrest-specific 6 (Gas6)/Axl シグナルがタイプ2免疫応答の誘導に関与することを報告した (Shibata et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014, Shibata et al. J Immunol. 2014)。すなわち、従来の RSV ワクチン (ホルマリン固定不活化 RSV: FI-RSV) 接種後の RSV 感染によるアレルギーの発症にも Gas6/Axl シグナルが関与している可能性があり、その検証と機構の解明を1つめの目的とした。一方、RSV 感染に伴う自然免疫応答の制御にもこのシグナルが関与することを示した (Shibata et al. J Immunol. 2014)。そこで本研究では、RSV のコンポーネントタンパクである fusion protein (F タンパク) と glycoprotein (G タンパク) に注目し、Gas6/Axl シグナルによる上記免疫応答の制御機構を細胞、分子レベルで解明することを2つめの目的とした。

3. 研究の方法

FI-RSV VED モデルの作製とそれにおける Gas6/Axl シグナルの役割

C57BL/6 マウスに RSV ワクチン (ホルマリン固定 RSV: FI-RSV) を4回接種した後、RSV を感染させた。その8日後、喘息の病態について、気道抵抗値 (AHR)、気道炎症、粘液産生を調べた。これをアレルギー性気道炎症モデル (FI-RSV VED モデル) とした。このモデルを用い、Gas6 遺伝子欠損 (KO) マウス、抗 Axl 抗体や Axl 阻害剤投与に伴う喘息の病態について調べた。また、骨髓細胞から調製した樹状細胞に、RSV のリコンビナント G タンパクや F タンパクを加え、その後の Gas6 産生について調べた。

RSV ワクチン候補剤形を抗原としたときのアレルギー応答の誘導と Gas6 産生の関係

C57BL/6 マウスに RSV post-F、pre-F、DS-Cav1 (より安定化させた per-F を)、G、を2回皮下投与し、RSV を感染させた。その後上記同様、喘息の病態について調べた。同時に肺のホモジネイトの上清にあるいは血清中の Gas6 濃度を調べた。加えて、それぞれの抗原に対する IgG の抗体価を ELISA により調べた。

FI-RSV VED モデルにおける Axl 阻害剤のアジュバントとしての効果

C57BL/6 マウスに FI-RSV と Axl 阻害剤 (BGB324) を2回皮下投与し、RSV を感染させた。その後上記同様、喘息の病態について調べた。

RSV 感染患者の IgG レベル

RSV 感染患者 (0-56ヶ月齢) の残余血清中の RSV F あるいは G に対する抗体の濃度を ELISA により測定した。なお、コントロールとして RSV 非感染者 (その他疾患による来院患者) の血清を使用した。

RSV 感染に伴う自然免疫応答の制御における Gas6/Axl の役割

C57BL/6 マウスに RSV を感染させ、経時的に免疫応答を調べた。また、2型リンパ球 (ILC2) を調製し、Axl の発現とリコンビナント Gas6 に対する応答についてフローサイトメトリー (FACS) と ELISA により調べた。

4. 研究成果

Gas6/Axl シグナルは従来型 RSV ワクチンによるアレルギーを誘導する

本研究では、マウスに FI-RSV の免疫後、RSV を感染させることにより病態悪化モデルの作製に成功した。このモデルでは、Th2 サイトカインが多量に産生され、好酸球浸潤、AHR 亢進、粘液過形成がみられた。このモデルを用いた解析を行ったところ、Gas6 KO マウスでは野生型と比較してこれらアレルギー反応が有意に軽減された。同様に、Gas6 受容体である Axl に対する抗体の投与により、上記アレルギー反応が有意に軽減された。さらに、Gas6 KO マウスや抗

Axl 抗体処理マウスでは IFN- γ 産生が亢進し、RSV を中和する IgG2c 産生が促進することを見出した。一方、アレルギーを誘導する IgE 産生は有意に抑制された。これらに加えて、RSV の G タンパク質が樹状細胞の Gas6 産生を誘導すること、Gas6 は RSV の F タンパク質によって誘導される樹状細胞の活性化や IL-12 産生を抑制することが明らかになった。すなわち、RSV G タンパクによって誘導される Gas6/Axl シグナルは、RSV によるアレルギー応答を誘導し、かつ Th1 免疫応答を誘導することを明らかにした。以上の結果より、Gas6/Axl を標的とした新規アジュバント接種方法などの開発が期待される。

新規ワクチン剤形の評価系において、Gas6 はバイオマーカーとなる

上記成果を応用し、RSV ワクチン候補剤型の安全性を評価するために、Gas6 をバイオマーカーとした評価系をマウスモデルにて作製することを試みた。RSV-F タンパク質の四量体や RSV-G タンパク質の単量体でマウスを免疫し RSV を感染させた。結果、G タンパク質で免疫したグループで不活化 RSV グループと同程度の肺中 Th2 サイトカイン産生を伴うアレルギー性気道炎症がみられ、同時に Gas6 も検出された。一方血中ではアレルギーに伴い Gas6 が検出されたが、Th2 サイトカインは検出されなかった。すなわち、Gas6 は Th2 サイトカインよりも鋭敏なバイオマーカーになることを示した。さらに、RSV post-F タンパク質、pre-F タンパク質、DS-Cav1 をはじめとするワクチン候補剤型をマウスに免疫し、Gas6 産生とアレルギー誘導について検討を行った。これら抗原はアレルギー反応を誘導することなく、すなわち Gas6 産生の亢進を示さなかった。この結果は、RSV-F タンパク質をベースとしたワクチンの安全性のひとつを示した。また、RSV に対する抗体の産生が促進され、ウイルスの複製が FI-RSV や RSV-G タンパク質免疫時と比較して減少したことより、RSV-F タンパク質の有効性の可能性を示した。

Axl を標的とした新規アジュバント開発の可能性

上記結果を考慮し、Axl を標的としたアジュバント開発の可能性を検討した。従来はアジュバントとして Alum を抗原に添加していたが、それに代えて Axl 阻害剤である BGB324 を添加した。結果、これまでアレルギーを誘導していた FI-RSV の接種に加え、RSV を感染させてもアレルギー応答はほとんど誘導されず、かつ IgG2c 産生の亢進とウイルス複製が抑制された。さらに、抗原を RSV の G タンパクに代えた場合も、同様の結果を得た。このように Gas6/Axl シグナルを BGB324 などに阻害できれば、新規アジュバントになる可能性がある。

ワクチン剤形としての RSV G タンパクの可能性

F タンパクを抗原とした RSV ワクチン開発が世界的な主流である。なぜなら、F タンパクは変異がほとんどなく、G タンパクのようにアレルギーを誘導しない。実際我々の研究は、RSV G タンパクは Gas6 産生を誘導し、タイプ 2 免疫応答を誘導することからアレルギー (FI-RSV VED) の原因であることを明らかにしている。ただし、F タンパクワクチンの開発に至っていない。これに対して我々は、RSV 感染重症患者の血中には、F タンパクに対する IgG が多く存在するが、G タンパクに対する IgG はほとんど存在しないことを明らかにした。一方、RSV 非感染者は、G タンパクに対する IgG を多く持つことを見出した。すなわち、RSV の G タンパクに対する IgG を誘導するワクチン開発の意義を示唆した。G タンパクにもよく保存された領域が存在することより、それに対する抗体を誘導する抗原を設計できればより防御能ワクチンとなる可能性がある。また、ここに Axl 阻害剤をアジュバントとして添加すれば、有効性と安全性を担保するワクチン剤形になるかもしれません。

RSV 感染に伴う Gas6/Axl シグナルは IFN- γ 産生を抑制し、タイプ 2 免疫応答を誘導する

RSV の単感染でも Gas6 は産生される。Gas6 は RSV の感染に伴いマクロファージや気道上皮細胞から産生され、同様に Axl もこれら細胞で発現する。サイトカインレベルでは RSV 感染に伴い Th1 だけでなく Th2 サイトカインも産生された。しかも感染 4 日後には検出されたことより、ヘルパー T 細胞から産生されたとは考えにくい。そこで、考えられた産生細胞として、ILC2 が挙げられた。ILC2 はマクロファージ同様 Axl を発現することがわかった。さらに興味深いことに、RSV 感染マウスに抗 Axl 抗体を投与すると、Th2 サイトカイン産生が有意に抑制された (反対に IFN- γ 産生は亢進した)。すなわち、Axl を発現する ILC2 は Axl を介して Gas6 により Th2 サイトカインを産生することが予想された。そこで、マウスから調製した ILC2 に recombinant Gas6 を添加したところ、予想に反して Th2 サイトカイン (IL-5 と IL-13) は産生されなかった。むしろ IL-33 刺激により産生された Th2 サイトカイン産生を Gas6 は抑制した。これらの結果から、直接的ではなく間接的な Gas6/Axl シグナルによる Th2 サイトカイン産生の制御が考えられた。ILC2 の Th2 サイトカイン産生を含めた機能は、IFN- γ や IL-27 によって抑制される (Moro et al. Nat Immunol. 2016)。Gas6/Axl シグナルは IFN- γ 産生を非常に強く抑制することより、その抑制により結果的に Th2 サイトカイン産生が亢進した可能性が示唆された。さらに直接的な証拠を得ることにより、タイプ 2 免疫からタイプ 1 免疫応答へシフトさせる薬剤の開発などにより、細菌感染症などの予防につながるものが期待される。

以上、RSV 感染による生体の応答において抗体産生制御など不明な点も残る。しかし、少なくとも RSV 感染において Gas6/Axl シグナルはアレルギーの誘導や、感染に伴うタイプ 1 免疫応答の抑制など非常に重要な役割を担うことを明らかにした。今後 RSV 感染に関わる疾患において、Gas6/Axl を標的とした新規予防法や治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. Takehiko Shibata, M., Ato. A critical role of Gas6/Axl signal in allergic airway responses during RSV vaccine-enhanced disease. *Immunol Cell Biol.* 2017 Nov; 95(10): 906–915. doi: 10.1038/icb.2017.61.

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Takehiko Shibata, Manabu Ato, Gas6/Axl signal causes the failure of RSV vaccine development in mice. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. June 2016, Tokyo, JAPAN
2. Takehiko Shibata, Manabu Ato, Gas6/Axl signal plays critical roles in allergic responses and insufficient protection by formalin-inactivated RSV vaccine in mice. The 45rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Dec. 2016, Ginowan, JAPAN
3. Takehiko Shibata, Ruiko Ogata, Arata Taniguchi, Shigeki Nakamura, Sohkiichi Matsumoto, Toshihiro Ito, Manabu Ato, RSV-induced Gas6/Axl signal ultimately leads to severer bacterial pneumonia. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. Oct. 2017, Kanazawa, JAPAN
4. Takehiko Shibata, Manabu Ato, The role of RSV-induced Gas6/Axl signaling in secondary bacterial infection. The 46rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Dec. 2017, Sendai, JAPAN
5. Takehiko Shibata, Toshihiro Ito, Yoshimasa Takahashi, Manabu Ato, RSV induces suppressive Gas6/Axl signaling in macrophages increasing susceptibility to secondary *S. pneumoniae* infection. The 47rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Dec. 2018, Fukuoka, JAPAN

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。