

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19105

研究課題名(和文) ヒト単球上の潜在型TGF-βの発現調節機構とその発現比率による単球の機能差の解明

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanisms of the surface expression of latent TGF-β on monocytes and differential monocyte functions caused by the ratio of latent TGF-β expression

研究代表者

仲山 美沙子 (Misako, Nakayama)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00510306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単球上の潜在型TGF-β (latency-associated peptide, 以下LAP) の発現比率の高いサルと低いサルを選別し、インフルエンザウイルス全粒子ワクチンを接種した5年後、高病原性鳥インフルエンザウイルスを感染させた。LAP発現比率の低い群では、LAP発現比率の高い群と比較して、ワクチン接種後のワクチン抗原特異的免疫反応が強く、また感染後の気管拭い液中におけるウイルス量が少なかった。よって、LAP発現率の低い個体の方が有効な免疫応答が誘導できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖因子の一つであるTGF-βは先天性および適応性免疫を抑制することで知られるが、潜在型TGF-β(LAP)の細胞表面における発現により免疫反応がどのように調節されているのかは不明な点が多い。本研究では、試験管内での単球表面におけるLAPの発現が非常に不安定であったことから、生体内での実験が必須と考えられた。ヒトに最も近い動物モデルであるサルを用いたことで、ヒト生体内の現象が再現できた可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, monkeys with high or low expression of TGF-β (latency-associated peptide: LAP) on monocytes were selected (3 monkeys in each group) and vaccinated, followed by a challenge infection with a highly pathogenic avian influenza virus five years after vaccination. In the LAP low group, vaccine antigen-specific antibody responses were stronger and virus titers in the tracheal swab were lower, compared to those in the LAP high group. These results suggested that individuals with lower expression of LAP on monocytes may have higher induction of protective immunity after vaccination.

研究分野：基礎病理学

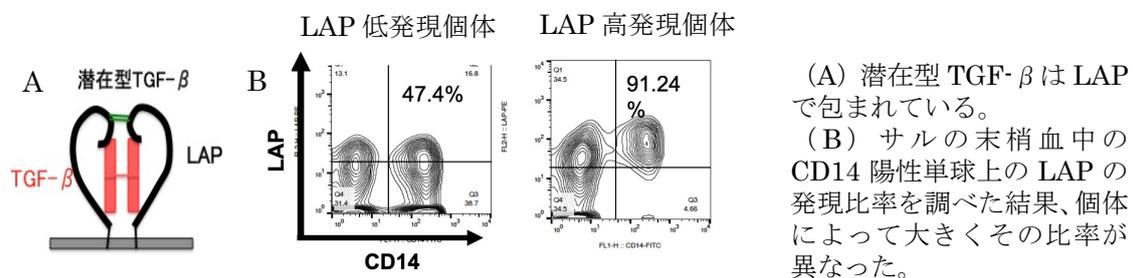
キーワード：TGF-β 単球 インフルエンザウイルスワクチン サル LAP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは毎年ヒトで流行し、大きな社会的損失を生んでいる。ワクチン接種は発熱期間や症状を抑えるのに有効であるとされるが、ワクチン接種による感染防御効果には免疫反応の個体差が影響していると考えられる。これまで申請者がカニクイザルにインフルエンザワクチンを投与した実験では、ワクチンを接種しても抗体上昇が弱い個体がみられた (Nakayama M, et al. *PLoS ONE* 2013, Pham VL, Nakayama M, et al. *PLoS ONE* 2013)。マウスのように遺伝的に統一された実験動物は免疫反応が一定でワクチンの有効性を検討するには有用だが、ヒトに応用する場合、ワクチンに対する免疫反応の個体差の原因を解明し、より効果的にワクチンを接種することが必要と考えられる。

免疫抑制的に働く $\text{TGF-}\beta$ は Latency-associated peptide (以下 LAP) に包まれ潜在型 $\text{TGF-}\beta$ として存在する (下図左) が、健常人では活性型 $\text{TGF-}\beta$ は受容体に速やかに結合するため検出感度以下である。一方で細胞表面の LAP の発現はフローサイトメーターで調べることが可能である。申請者はヒトおよびカニクイザルの末梢血血球上の LAP の発現を調べ、単球上の LAP の発現比率が個体によって大きく異なることを見出した (下図右)。そこで単球上の LAP の発現比率が低いサル (LAP low)、高いサル (LAP high) 各 3 頭にインフルエンザウイルス全粒子ワクチンを 0, 2 週に接種したところ、一回目のワクチン接種から 4, 8 週後において単球上の LAP の発現比率が低いサルでは、その発現比率が高いサルと比較してワクチン抗原特異的 IgG が有意に高いという結果を得た。よって、LAP の発現比率によって免疫応答が異なると考えられ、その発現調節機構を調べることで、より効果的なワクチン接種の方法を提唱することが出来ると着想した。



2. 研究の目的

潜在型 $\text{TGF-}\beta$ (LAP) の発現比率による単球の機能差の解明、LAP の発現比率による免疫学的パスウェイの差の検証、LAP の発現比率を規定する遺伝子多型の同定により、インフルエンザウイルスワクチンに対する免疫応答の個体差の原因を明らかにする。

3. 研究の方法

試験管内の実験

- 単球上 LAP の発現比率の高い個体と低い個体から単球を磁気ビーズおよびフローサイトメーターで効率的に分離する方法を検討した。
- LAP 発現細胞の作製：単球由来ではあるが LAP を発現していない細胞 (THP1) に $\text{TGF-}\beta$ をノックインした。
- LAP 発現比率の高い個体と低い個体由来の末梢血単核球を用いた、活性化マクロファージ (M1) への分化誘導実験：末梢血単核球 (LAP の発現を保持した状態での単球分離は上記 i) により不可能であったため、フィコールで単球とリンパ球を合わせた分画を分離) M1 刺激である LPS を添加し、単球内の活性化サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$

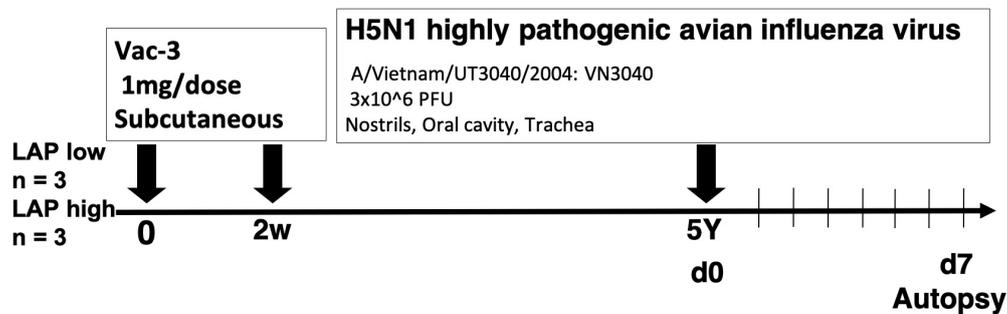
と抑制性サイトカインIL-10を細胞内染色で評価した。

- iv. 単球からmRNAを効率的に分離する方法を検討した。

生体内の実験

ワクチン接種5年後にH5N1高病原性トリインフルエンザウイルスを感染させ、LAP low群(n = 3)とhigh群(n = 3)の感染防御能、免疫反応を比較した。

- i. 感染1-7日後に鼻腔、気管、気管支からサンプルを採取し、MDCK (Madin-Darby canine kidney)細胞を用いて感染性ウイルス量を測定した。
- ii. 感染局所における免疫反応の差を比較するため、感染7日後に解剖を行い、肺の炎症の強い部分と炎症の弱い部分からそれぞれ mRNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った。
- iii. 感染前に各個体の単球上 LAP の発現をフローサイトメータで評価し、研究を始めた当初の単球上 LAP の発現比率と比較した。



4. 研究成果

試験管内の実験

- i. 単球分離は磁気ビーズ、フローサイトメータ、どちらを用いた場合でも分離過程でLAPの発現が低下したことから、細胞表面のLAPの発現が非常に不安定であることが判明した。
- ii. TGF- β 遺伝子をTHP-1細胞に導入した結果、細胞内染色によりLAPの産生が確認されが、細胞表面へのLAPの発現を誘導するにはLTBP1 (latent TGF- β binding protein 1)を導入する必要があることが判明した。
- iii. LAP発現比率の高い個体から採取した単球では、LAP発現比率の低い個体と比較してTNF- α の産生量が高く、IL-10の産生量が低い傾向がみられた(有意差はみられなかった)。
- iv. LAPの単球表面への発現調節に関与する遺伝子を同定するため、LAP発現比率の高い個体と低い個体由来の単球を用いた網羅的遺伝子発現解析を行う必要があると考えられたが、サルから採取、分離できる単球数が少なく、解析に十分なmRNA量得られないことが判明した。

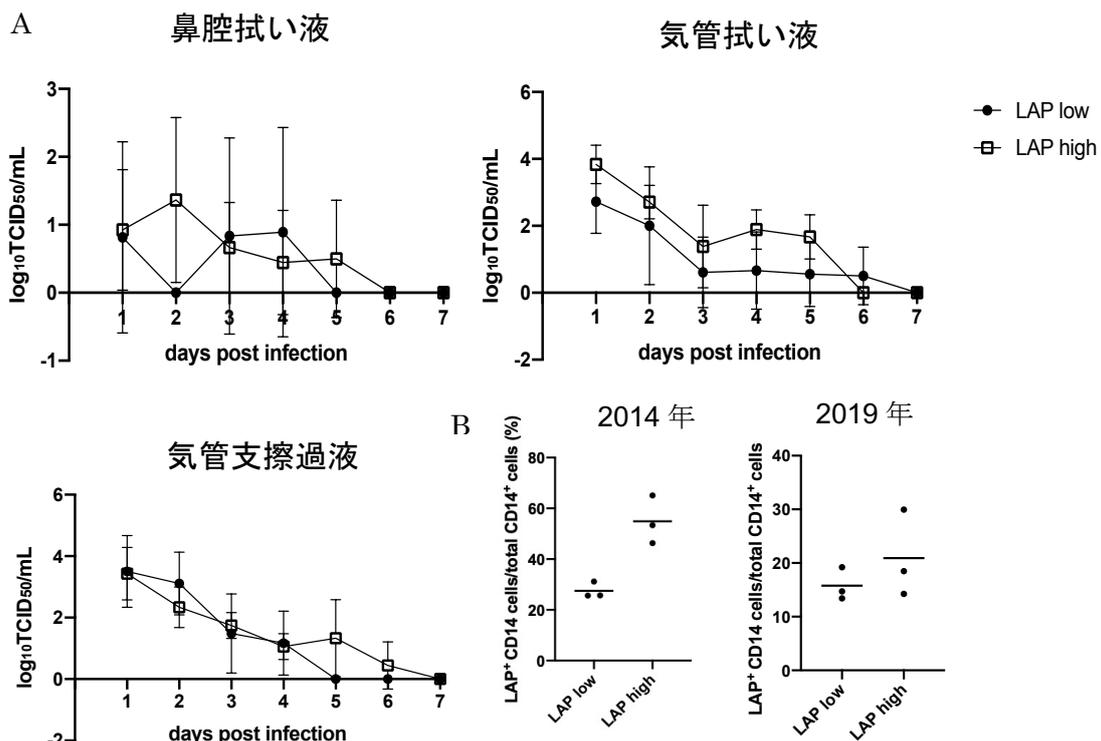
生体内の実験

- i. 気管拭い液中では、感染1-5日後いずれの時点でもLAP low群においてLAP high群と比較して、分離された感染性ウイルス量が少なかった。鼻腔拭い液中、気管支

- 擦過液中におけるウイルス量は2群間の差に一定の傾向はみられなかった（下図A）。
- ii. 網羅的遺伝子発現解析により LAP low 群と high 群を比較した結果、フィルターパスした約 15,000 遺伝子のうち、q 値（有意水準である p 値を用いて多重検定における False discovery rate を調整した値）が 0.05 以下を満たす遺伝子は炎症の強弱に関わらず認められなかった。なお、陽性コントロールとして、今回ワクチン接種した 6 頭（LAP low と high を合わせた個体）を過去の実験で用いたワクチン非接種で H5N1 ウイルスを感染させたサル 3 頭の肺と比較した結果、感染後に q 値が 0.005 以下の遺伝子が 260 個認められた。
- iii. LAP low 群、high 群の CD14 陽性単球上の LAP 発現比率は、2014 年にはそれぞれ 27.5%, 54.9%であった（ $p=0.009$, student t-test, 異なる日に 5 回採血した平均値を使用）。一方、2019 年には、それぞれ 15.7%, 20.9%であった（ $p=0.37$, student t-test, 異なる日に 8 回採血した平均値を使用）。このことから、ワクチン接種後 5 年の間に免疫反応の差が小さくなっていった可能性が考えられた。

考察とまとめ

試験管内では LAP の単球表面における発現が非常に不安定であったことから、 $TGF\cdot\beta$ は生体内恒常性を保つために速やかに潜在型から活性型になり、免疫応答を調節している分子であると考えられた。LAP low 群では LAP high 群と比較して、ワクチン接種後の抗体反応が強く、感染後の気管拭い液中ではウイルス量が少なかったことから、単球上 LAP 発現率の低い個体の方がワクチンによって有効な免疫応答が誘導できると推測された。しかし、LAP 発現率の高い個体との差は小さく、1 群 3 頭の比較では統計学的に有意な差が得られなかったことから、当初目的の 1 つに掲げていた” LAP の発現比率を規定する遺伝子多型の同定 “を進めるには不十分な結果だったといえる。LAP low 群と LAP high 群の免疫応答の差がより顕在化されるような状況、例えば多数の個体で自己免疫疾患の発生率や癌に対する免疫寛容を前向きに長期に渡って追跡する研究が必要と考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----