

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08801

研究課題名(和文) 液性免疫の低応答性によるインフルエンザ重症化機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of influenza severity caused by hyporesponsiveness of humoral immune responses

研究代表者

安井 文彦 (YASUI, Fumihiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：40399473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：重症肺炎を惹起する高病原性鳥インフルエンザ(HPAI) H5N1ウイルス感染に対する獲得免疫応答を解析する目的で、季節性H1N1またはHPAI H5N1ウイルスを感染させたマウス及びヒコウイザルでの病態と獲得免疫誘導の比較解析を行った。HPAI H5N1ウイルス感染個体では、H1N1感染個体に比べて樹状細胞とCD4+ T細胞の相互作用が疎であり、抗体誘導が非常に減弱していた。HPAI H5N1ウイルス感染に重症化には、樹状細胞の活性化及び集積の異常とその後のT細胞によるB細胞活性化不全及び抗体産生の減弱が起因していると考えられた。予防ワクチン接種は、良好な抗体産生を誘導し、重症化を阻止できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで高病原性鳥インフルエンザ(HPAI)H5N1ウイルス感染による重症化機序の解析は、ウイルス因子を中心に行われてきた。今回、ウイルス因子のみならず、宿主免疫応答性の低下もHPAI H5N1ウイルス感染による重症化に関わっている可能性を示すことができた。また、抗体誘導の低応答性は、抗原提示細胞である樹状細胞の活性化及び集積異常であることが判明し、自然免疫から獲得免疫まで影響を受けていた。更に、高度弱毒化ワクシニアウイルスベクターを用いたH5亜型ワクチンを作成し、良好な発症防御効果を確認した。HPAI H5N1ウイルス感染に対する重症化阻止には、予防ワクチンの開発が非常に重要であることを示せた。

研究成果の概要(英文)：To analyze the adaptive immune response to highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus infection that causes severe pneumonia, we compared the pathogenesis and induction of antigen-specific antibodies in mice and cynomolgus macaques infected with seasonal H1N1 or HPAI H5N1 viruses.

In HPAI H5N1 virus-infected animals, the interaction between dendritic cells and CD4+ T cells was more sparse and antibody induction was much weaker than in H1N1-infected animals. It was considered that the severity of HPAI H5N1 virus infection was due to abnormal dendritic cell activation and accumulation, and subsequent failure of T cells to activate B cells and reduce antibody production. In contrast, prophylactic vaccination induced potent antibody production and prevented severe disease caused by HPAI H5N1 virus infection.

研究分野：感染免疫、ウイルス学

キーワード：低応答性 液性免疫 高病原性鳥インフルエンザ 重症肺炎 B細胞濾胞

1. 研究開始当初の背景

高病原性鳥インフルエンザ(HPAI) H5N1 ウイルス感染患者は、東南アジア諸国やエジプトを中心に 850 人以上が報告され、その致死率は 50%以上である。重症患者では、HPAI H5N1 ウイルス感染によって肺胞上皮細胞やマクロファージから誘起される自然免疫応答を介して、炎症性サイトカインが過剰産生(サイトカインストーム)され、直接的な肺組織障害である急性呼吸窮迫症候群(acute respiratory distress syndrome; ARDS)を発症する事が報告されている。高病原性発現に関わるインフルエンザウイルス因子として、RNA ポリメラーゼ複合体の構成因子の一つである PB2 蛋白質の点変異による増殖性増加やインターフェロン応答性遺伝子の産生を抑制する PB1-F2 蛋白質の点変異等が報告されている。しかし、これら病原性発現に関わるアミノ変異を有していない HPAI H5N1 ウイルス株も多数存在する事から、既知のウイルス因子とそれに対する自然免疫応答のみでは、HPAI H5N1 ウイルス感染による高病原性発現機序を完全には説明し切れていない。一方で、HPAI H5N1 ウイルスに対するワクチンは、従来の季節性インフルエンザと同一方法で作製されたスプリットワクチンでは抗体誘導能が非常に低い。また、HPAI H5N1 ウイルス感染による重症患者への快復患者由来の血漿投与による治療効果が報告されており、抗原特異的抗体が HPAI H5N1 ウイルス排除に重要な役割を果たすが、宿主はその抗体を誘導しにくい可能性を示している。HPAI H5N1 ウイルス感染による重症化機序における宿主免疫応答の影響も解析する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、マウスモデル及び非ヒト霊長類モデルであるカニクイザルを用いて、低病原性である季節性 H1N1 ウイルスまたは HPAI H5N1 ウイルス感染時における肺組織中ウイルス量、病態変化、ならびに獲得免疫誘導の経日的に解析し、HPAI H5N1 ウイルス感染に対する宿主獲得免疫応答性と重症化における関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

マウス及びカニクイザルに対して、H1N1 ウイルスまたは、HPAI H5N1 ウイルスを感染させ、経日的な病態変化をするとともに、剖検時の肺組織中ウイルス量を測定した。また、経日的な採血により得た血清を用いて、抗原特異的抗体産生を測定した。更に、分離した脾細胞、凍結脾臓切片を用いて、抗原提示細胞である樹状細胞、マクロファージの活性化、集積を解析するとともに、T 細胞、B 細胞についても免疫組織化学的、免疫学的解析を実施した。

更に、HPAI H5N1 ウイルス感染による重症化阻止を目的に、予防ワクチンを作成し、抗体誘導能及び感染防御試験を実施した。

詳細な実験方法は、以下の通りである。

(1) インフルエンザウイルス感染後の病態変化観察とウイルス定量

H1N1 ウイルスまたは HPAI H5N1 ウイルス感染マウスの経日的な体重と生存率を測定した。ウイルス感染カニクイザルの体温変化は、テレメトリーシステムを用いて行い、連日麻酔下で体重測定を実施した。剖検時に採取した肺組織を用いて、感染性ウイルス量測定を実施した。

(2) 抗原特異的抗体応答測定

抗原特異的抗体測定には、不活化 H1N1 ウイルス及び H5N1 ウイルス全粒子または、His タグ付ヘマグルチニン HA タンパク質を抗原とした ELISA 測定及び生ウイルスを用いた中和抗体価測定を行った。

(3) 免疫組織染色及びフローサイトメトリー法を用いた抗原提示細胞、T 細胞、B 細胞

の応答解析

B 細胞は、クラススイッチや体細胞高頻度突然変異を起こしながら増殖し、胚中心を形成する。更に、濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cell; FDC)により高親和性の抗原特異的抗体を産生する B 細胞が選択され、形質細胞や記憶 B 細胞となり長期液性免疫が確立する。そこで、HPAI H5N1 または H1N1 ウイルス感染マウス及びカニクイザルの脾臓を用いて、抗体産生に關与する DC、T 細胞の免疫組織化学染色及び超解像顕微鏡を用いた相互採用解析を実施した。また、B 細胞の活性化と成熟化を解析するため、B 細胞濾胞と胚中心形成を免疫組織化学染色により解析した。

(4) H5 亜型 HA タンパク質発現組換えワクシニアワクチンによる発症防御試験

H5 亜型 HA タンパク質遺伝子を導入した高度弱毒化ワクシニアウイルスワクチン (rVV-H5 HA) を事前接種したマウス及びカニクイザルの各種検体を用いて、病態解析、ウイルス排除効果、抗体産生能、B 細胞活性化及び成熟化を解析した。

4. 研究成果

HPAI H5N1 ウイルス感染マウスでは、感染 5 日後から体重が減少し、7-10 日後で死亡した。一方、低病原性である H1N1 インフルエンザウイルスでは、一過性の体重減少は見られるもののその後速やかに回復し、死亡個体は観察されなかった。そこで、HPAI H5N1 ウイルスを同一ウイルス感染価で感染させたマウスの抗原特異的抗体価を比較したところ、HPAI H5N1 感染個体では、H1N1 ウイルス感染個体比べて、顕著に抗体産生量が低下している事が判明した。更に、同様の抗原特異的抗体の低産生は、ヒトに近い霊長目モデルであるカニクイザルを用いた感染モデルにおいても観察された (図 1)。

次に、HPAI H5N1 または H1N1 ウイルス感染マウス及びカニクイザルの脾臓を用いて、抗体産生に關与する DC、T 細胞、B 細胞の組織免疫染色を行った。その結果、H1N1 ウイルス感染時に比べ、HPAI H5N1 ウイルス感染では、脾臓に集積する樹状細胞数が少ないことをフローサイトメトリー解析により明らかとなった。一方、マクロファージの集積には、顕著な差は認められなかった。さらに、超解像顕微鏡を用いた解析から、集積する樹状細胞数の減少に伴い、T 細胞との相互作用も少なく、疎であることが判明した。その結果、B 細胞濾胞が形成少なく、ウイルス排除に十分な親和性と産生量の抗体を誘導できないため、ウイルス排除がうまくいかず、重症化する可能性が考えられた。

その予防対策として、天然痘ワクチンであり、ヒトでの接種実績がある弱毒化ワクシニアウイルスを母体とした新規組換え生インフルエンザワクチンの開発を進めている。HPAI H5N1 ウイルスの HA 蛋白質を発現させた組換え生ワクチン (rVV-H5 HA) を単回接種したマウス及びカニクイザルでは、HPAI H5N1 ウイルス感染後において、抗原提示を行う DC 数の増加、HPAI H5N1 ウイルス抗原特異的抗体の誘導により、感染性ウイルスの早期排除と肺炎軽減効果を認めた。

以上の結果より、HPAI H5N1 ウイルス感染では、DC 数の減少によって T 細胞への抗原提示が不十分となり、抗原特異的抗体が十分に産生されない液性免疫の低応答性が重症化に

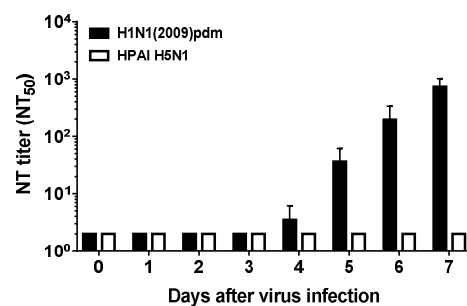


図1 インフルエンザウイルス感染カニクイザルの中和抗体誘導

関与する事が示唆された。更に、この液性免疫の低応答性は rVV-H5 ワクチンで賦活化できる事が判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安井文彦、山地賢三郎、本田智子、倉石武、藤幸知子、伊藤靖、米田美佐子、迫田義博、小笠原一誠、服部正策、喜田宏、甲斐知恵子、小原道法
2. 発表標題 即時性及び長期持続性免疫誘導能を有する組換えインフルエンザワクチンによる発症防御効果の検討
3. 学会等名 第23回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Tomoko Honda, Yasushi Itoh, Yoshihiro Sakoda, Nobuo Sakaguchi, Hiroshi Kida, Kazumasa Ogasawara, Michinori Kohara
2. 発表標題 Protective effect of a recombinant influenza vaccine against H5 subtype viruses based on highly attenuated vaccinia virus vector
3. 学会等名 12th China-Japan Virology Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Tomoko Fujiyuki, Takeshi Kuraishi, Tomoko Honda, Yoshihiro Sakoda, Misako Yoneda, Hiroshi Kida, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Michinori Kohara
2. 発表標題 Evaluation of vaccine potential of recombinant vaccinia virus encoding H5 subtype hemagglutinin against H5N1 influenza viruses
3. 学会等名 12th Vaccine Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山地賢三郎、安井文彦、伊藤靖、鈴木紗織、本田智子、山本直樹、真田崇弘、石垣宏仁、石井孝司、小笠原一誠、小原道法
2. 発表標題 カニクイザルでのH7N9 鳥インフルエンザHAタンパク質発現組換えワクシニアワクチンの発症防御効果の検討
3. 学会等名 第22回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安井 文彦
2. 発表標題 弱毒化ワクシニアウイルスDIs株を母体とした組換えH5亜型HAインフルエンザワクチン-による発症防御機序の解析
3. 学会等名 第21回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有するDIs株由来組換えワクシニアウイルス	発明者 安井文彦、小原道法、山地賢三郎、伊藤靖、小笠原一誠、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-213990	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 インフルエンザに対する医薬	発明者 小原道法、安井文彦、伊藤靖、小笠原一誠、石井孝司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017-193452	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

公益財団法人東京都医学総合研究所 疾患制御研究分野 感染制御プロジェクトホームページ https://www.igakuken.or.jp/infectious/
--

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
---------	---------