

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K23875

研究課題名（和文）インフルエンザウイルス反応性メモリーB細胞の制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of innate lymphoid cells and B cells after influenza virus infection

研究代表者

森山 彩野（Moriyama, Saya）

国立感染症研究所・治療薬・ワクチン開発研究センター・主任研究官

研究者番号：60632354

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルス感染後の免疫応答において自然リンパ球がB細胞応答により制御されるか、また自然リンパ球の働きが感染免疫応答を調節するかどうか不明であった。インフルエンザウイルス感染時に作られる抗インフルエンザIgG抗体が自然リンパ球に与える影響を検討したところ、抗体投与群において1型自然リンパ球の顕著な増加がみられた。さらに、抗インフルエンザIgG抗体投与はインフルエンザウイルス感染による体重減少を抑制し、自然リンパ球が感染後の体重減少の抑制に寄与していた。本研究結果から、1型自然リンパ球がIgG抗体により制御されてインフルエンザ免疫応答に関わることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、インフルエンザウイルス感染時に産生される抗体によって自然リンパ球応答が制御され、これがインフルエンザウイルスに対する生体応答を制御することが示唆された。インフルエンザウイルス感染応答の制御機構の理解が進み、治療薬やワクチンの開発に寄与することが期待される。また自然リンパ球は肺組織以外にもリンパ組織、腸管、脂肪組織、皮膚など様々な組織に局在しており、これらの組織における抗体やB細胞を介した感染防御応答や炎症応答の理解にも寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：It was unclear whether innate lymphocytes are regulated by the memory B cell response in the immune response after influenza virus infection, and whether the function of innate lymphocytes modulates the immune response to virus infection. We examined the effect of anti-influenza IgG antibodies that are produced during influenza virus infection on innate lymphocytes in mice, and found a marked increase in type 1 innate lymphocytes in the antibody-administered group. Furthermore, administration of anti-influenza IgG antibodies suppressed weight loss caused by influenza virus infection, and spontaneous lymphocytes contributed to the suppression of post-infection weight loss. The results of this study suggest that type 1 innate lymphocytes, regulated by IgG antibodies, may be involved in the anti-influenza immune response.

研究分野：免疫学

キーワード：インフルエンザウイルス感染 抗体 自然リンパ球

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザはインフルエンザウイルスを病原体とする急性の呼吸器感染症である。過去数回のパンデミックを引き起こしており、いまま毎年世界中で流行がみられる。感染対策としてワクチン接種が行われているがその有効性は不完全であり、より良いワクチンや治療法の開発のためにインフルエンザウイルス感染に対する免疫応答の解明が一層求められている。ウイルスが呼吸器に感染すると B 細胞応答が誘導されて抗体による病原体の排除が行われる。一部の B 細胞はメモリー B 細胞へ分化して次回以降の感染へ備えており (免疫記憶)、感染時には速やかに抗体産生細胞へ変化してインフルエンザに対する抗体を作る。抗体は中和活性により細胞への感染を阻害するとともに、中和活性を持たない抗体も他の免疫細胞の機能を変化・補助して、ウイルスの排除に寄与する。またインフルエンザ感染は B 細胞以外の免疫細胞の応答も広範に引き起こすことが知られており、自然リンパ球もインフルエンザ感染後に増加することが報告されている (Monticelli et al., *Nature Immunology*, 2011; Silver et al., *Nature Immunology*, 2016)。

自然リンパ球はリンパ球と似た形態を持ち同様のサイトカインを産生する自然免疫細胞である。リンパ球やマクロファージ、樹状細胞、顆粒球等に特徴的な表面分子発現を持たない細胞集団であり、分化制御に関わる代表的な転写因子の発現と産生するサイトカインの種類、細胞障害性の有無によってナチュラルキラー (NK) 細胞、1 型自然リンパ球、2 型自然リンパ球、3 型自然リンパ球に分類することができる。1 型自然リンパ球は細胞内微生物、2 型自然リンパ球は寄生虫やアレルゲン、3 型自然リンパ球は細胞外微生物や菌類に対する免疫応答に関わる。2 型自然リンパ球は炎症後の組織再生にも関わることが報告されている (Monticelli et al., *Nature Immunology*, 2011)。しかしながら、インフルエンザ感染後の B 細胞応答と自然リンパ球の関わりは不明であった。

2. 研究の目的

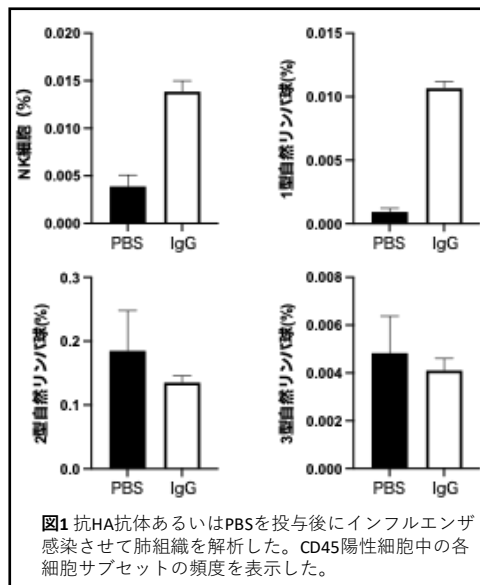
そこで本研究ではインフルエンザウイルス感染後の肺組織におけるメモリー B 細胞応答と自然リンパ球の関わりを明らかにすることを目的に研究を行った。特にメモリー B 細胞応答において重要な分泌物質である抗体と自然リンパ球の関わりについて解析を行った。本研究によりメモリー B 細胞応答の制御機構の新たな一面が明らかになることで、将来的に良いワクチン開発への応用が期待されるとともに、自然リンパ球は肺組織以外にもリンパ組織、腸管、脂肪組織、皮膚など様々な組織に局在しており、これらの組織におけるメモリー B 細胞を介した感染防御応答や炎症応答の理解にも寄与することが期待された。

3. 研究の方法

H3N2 インフルエンザウイルスのマウス感染モデルを用いて、抗インフルエンザヘマグルチニン抗体投与により自然リンパ球の変化が生じるかどうか評価した。また自然リンパ球が **CD90** を細胞表面に持つことを利用して、T 細胞を持たない **CD3** 欠損マウスに抗 **CD90** 抗体を投与して自然リンパ球を除去することで自然リンパ球がインフルエンザ感染後の個体応答を制御するか検討した。

4. 研究成果

インフルエンザウイルス感染後、体内には B 細胞から産生された大量の抗インフルエンザヘマグルチニン IgG 抗体が存在している。この IgG 抗体が免疫反応中に自然リンパ球に与える影響は不明であった。そこでマウスに抗インフルエンザ IgG 抗体を腹腔内投与し、翌日に H3N2 インフルエンザウイルスを経鼻感染させて、感染回復後の肺組織に含まれる免疫細胞の細胞表面マーカーおよび転写因子をフローサイトメーターで測定して、免疫細胞の頻度を評価した。CD45 陽性細胞から CD3 陽性、CD5 陽性、CD11b 陽性、CD11c 陽性、CD19 陽性、Fcε 受容体 I 陽性、Gr-1 陽性画分を除き、NKp46 陽性 CD127 陰性細胞を NK 細胞、CD127 陽性 CD90 陽性 GATA-3 陰性 RORγt 陰性 NKp46 陽性細胞を 1 型自然リンパ球、CD127 陽性 CD90 陽性 GATA-3 陽性細胞を 2 型自然リンパ球、CD127 陽性 CD90 陽性 GATA-3 陰性 RORγt 陽性細胞を 3 型自然リンパ球として解析したところ、いずれの自然リンパ球もウイルス感染回復後の肺組織内に検出された (図 1)。特に、抗インフルエンザ IgG 抗体投与群では PBS



投与対照群と比べて CD45 陽性細胞中の NK 細胞や 1 型リンパ球が高頻度で検出された。一方、2 型自然リンパ球や 3 型自然リンパ球は抗インフルエンザ IgG 抗体投与群と PBS 投与対照群で同程度の頻度で検出された。興味深いことに中和活性をもつ抗体投与群と中和活性を持たない抗体投与群を比較したところ、NK 細胞頻度は非中和抗体投与群では中和抗体投与群より低く、1 型自然リンパ球頻度は中和抗体投与群と非中和抗体投与群で同程度であった(図 2)。これらの結果から、抗体がインフルエンザ感染後に NK 細胞と 1 型自然リンパ球の増加を直接的あるいは間接的に制御しており、また NK 細胞においてこの制御は抗体の機能と関わる可能性が考えられた。

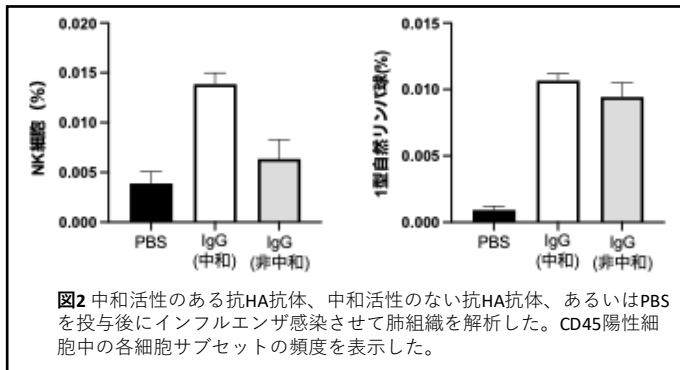


図2 中和活性のある抗HA抗体、中和活性のない抗HA抗体、あるいはPBSを投与後にインフルエンザ感染させて肺組織を解析した。CD45陽性細胞中の各細胞サブセットの頻度を表示した。

抗体は可変領域と定常領域から構成される。可変領域は抗原との結合に直接関わり、また定常領域はFc受容体を介して細胞へ結合してT細胞やマクロファージの機能を制御することが知られている。そこで、肺組織に含まれる自然リンパ球がFc受容体(Fc γ R III/II)を発現するかどうかをフローサイトメーターで検討した(図3)。Fc γ R III/IIを発現しないCD4陽性T細胞と比較して各種の自然リンパ球ではFc γ R III/II染色シグナルのシフトが見られた。2型自然リンパ球や3型自然リンパ球に比べて1型自然リンパ球ではFc γ R III/II染色シグナルが高く、NK細胞ではさらに高いシグナルが見られた。自然リンパ球は様々な組織に存在して、組織ごとに異なる表面分子を発現することが知られている。そこで脾臓に含まれる自然リンパ球のFc γ R III/II発現を検討したところ、肺組織と同様に1型自然リンパ球やNK細胞でCD4陽性T細胞よりも高いFc γ R III/II染色シグナルが検出された。一方、2型自然リンパ球や3型自然リンパ球ではCD4陽性T細胞と同程度のシグナルが検出された。これらのことからNK細胞や1型自然リンパ球は少なくとも肺組織と脾臓においてFc受容体を発現しており、抗体分子によりFc受容体を介して直接的に細胞の増加が制御される可能性が考えられる。

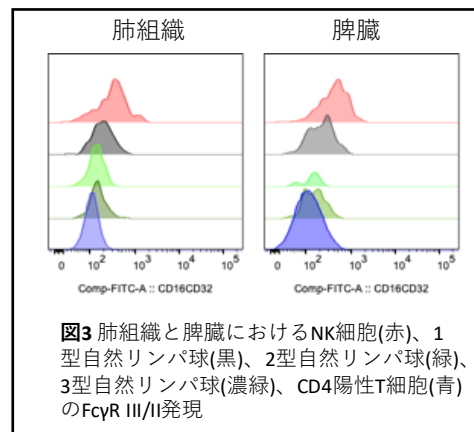


図3 肺組織と脾臓におけるNK細胞(赤)、1型自然リンパ球(黒)、2型自然リンパ球(緑)、3型自然リンパ球(濃緑)、CD4陽性T細胞(青)のFc γ R III/II発現

さらに抗インフルエンザヘマグルチニンIgG抗体投与により増加した自然リンパ球がインフルエンザ感染応答を制御するかどうか検討した。自然リンパ球はCD90を細胞表面に発現しており、抗CD90抗体を投与することで体内から自然リンパ球を除去することができる(Monticelli et al., *Nature Immunology*, 2011)、抗CD90抗体によるT細胞除去も起きるため、T細胞を持たないCD3欠損マウスを用いて実験を行った(図4)。CD3非欠損マウスにPBSを投与したのちに非致死量のインフルエンザウイルスを感染させると、一過性な体重減少が見られるものの2週間程度で体重の回復が見られる。CD3欠損マウスで同様に感染を行うと体重は減少したまま回復が見られない。CD3欠損マウスに感染前に抗ヘマグルチニンIgG抗体投与を投与すると体重減少の抑制が見られるが、抗CD90抗体も投与すると体重減少抑制が一部解除された。この結果から、抗インフルエンザヘマグルチニンIgG抗体投与により増加した自然リンパ球はインフルエンザウイルス感染後の体重減少の抑制に寄与すると考えられた。本研究から、IgG抗体により1型自然リンパ球の増殖維持が制御され、これがインフルエンザ応答に関わることを示唆された。

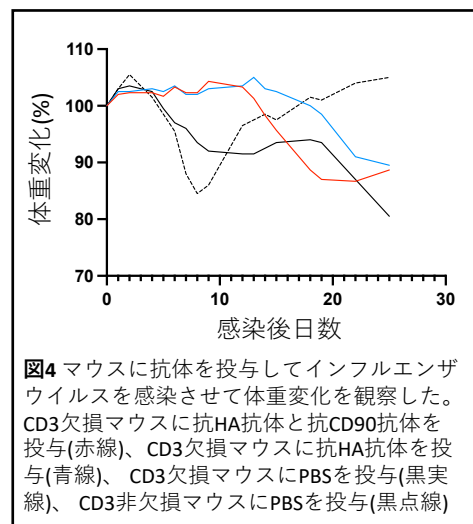


図4 マウスに抗体を投与してインフルエンザウイルスを感染させて体重変化を観察した。CD3欠損マウスに抗HA抗体と抗CD90抗体を投与(赤線)、CD3欠損マウスに抗HA抗体を投与(青線)、CD3欠損マウスにPBSを投与(黒実線)、CD3非欠損マウスにPBSを投与(黒点線)

本研究から、IgG抗体により1型自然リンパ球の増殖維持が制御され、これがインフルエンザ応答に関わることを示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kotaki R, Moriyama S, Takahashi Y	4. 巻 43(1)
2. 論文標題 Humoral immunity for durable control of SARS-CoV-2 and its variants.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammation and regeneration	6. 最初と最後の頁 article 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-023-00255-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tonouchi K, Adachi Y, Moriyama S, Sano K, Tabata K, Ide K, Takeyama H, Suzuki T, Takahashi Y	4. 巻 32(9)
2. 論文標題 Stereotyped B-cell response that counteracts antigenic variation of influenza viruses.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International immunology	6. 最初と最後の頁 613-621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa038.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama S, Adachi Y, Tonouchi K, Takashi Y	4. 巻 1254
2. 論文標題 Memory B cells in local and systemic sites.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in experimental medicine and biology	6. 最初と最後の頁 55-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-15-3532-1_5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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

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