

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15451

研究課題名（和文）蚊の唾液による自然免疫応答と蚊媒介性ウイルス感染制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism by which mosquito saliva and innate immune responses to mosquito-borne viral infection.

研究代表者

鈴木 達也（Suzuki, Tatsuya）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10837272

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、蚊の唾液によって誘導される自然免疫応答と局所に浸潤する免疫細胞によって、日本脳炎ウイルスの病原性が増強することを明らかにした。また、PrimeFlow アッセイにより、ウイルスの標的細胞が単球・マクロファージ系の細胞であり、好中球にはほとんどウイルスが感染していないことを明らかにした。また、抗炎症薬処理により、蚊の唾液刺激によるウイルスの感染・病原性増強作用を抑制できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラビウイルスのような蚊媒介性ウイルス感染症では、蚊の吸血の際にウイルス粒子と共に接種されるかの唾液成分が病原性に関与していると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは不明瞭である。本研究により、蚊の唾液によって誘導される自然免疫応答がウイルスの病原性に関与することを明らかにした。本研究成果は、蚊の唾液を標的とした新たな感染予防・治療法の開発につながる成果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we demonstrated that mosquito salivary gland extracts (SGEs) enhanced JEV pathogenicity in vivo through the accumulation of immune cells and stimulated innate immune responses at the infection site during the early time point. We also found that viral RNA was detected in macrophages/monocytes but not neutrophils by PrimeFlow assay. We determined the effects of anti-inflammatory drug on viral pathogenicity in vivo.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フラビウイルス 蚊 自然免疫 病原性

1. 研究開始当初の背景

日本脳炎ウイルス (JEV)、デングウイルス (DENV)、ジカウイルス (ZIKV) などの蚊媒介性フラビウイルスは、脳炎や出血熱、小頭症など様々な疾患を引き起こす病原体であるが、ワクチン開発は困難な要因が多いため、広範囲なフラビウイルスに対する治療薬の開発が必要とされている。これらのウイルスは蚊の吸血の際に唾液とともに哺乳動物の皮下に接種され、そこに存在する樹状細胞や皮膚の細胞に感染し、末梢組織で増殖後、脳などの標的臓器に達し重篤な疾病を惹起する。

このようにフラビウイルスは分類学的にかけ離れた蚊 (昆虫) と脊椎動物の両方に感染することができ、昆虫がヒトを含む脊椎動物へとウイルスを伝播させるベクターとして働いているが、その意義に関しては不明な点が多い。蚊の唾液には様々な生理活性物質が含まれており、宿主の免疫応答やアレルギーを惹起することが知られている。古くからウイルスの単独接種よりも蚊の唾液との混合接種において病原性亢進が観察されており、フラビウイルスは蚊の唾液中の何らかの感染増強因子を利用することで、哺乳動物への効率的な感染を成し遂げていると考えられているが、その詳細は不明瞭なままである (図1)。

近年、ある種の免疫応答の活性化が、別の免疫応答を抑制・干渉するといった現象が報告されてきており、蚊の唾液がもたらすアレルギー反応がフラビウイルスの病原性に関与していることは十分考えられ、「蚊の唾液」、「フラビウイルス感染」、そして「アレルギー」の三者の関係性を明らかにすることができれば、自然免疫とウイルスの攻防に関して従来の報告とは異なる側面からの知見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、蚊の唾液による感染増強作用の解析を通して、フラビウイルスの病原性緩和に向けた新規の予防・治療薬の開発に繋げることを目的とした。

本研究によって、蚊の唾液刺激やアレルギー反応がウイルス感染に与える影響とその詳細な分子機構が明らかとなれば、昆虫媒介性ウイルスが昆虫をベクターとして利用する意義や戦略を明らかにできるものと考えられる。また、従来のウイルス蛋白質による自然免疫経路の抑制作用とは異なり、ウイルスが活性化された自然免疫経路を利用することで、効率的な感染・増殖を成立させるといったウイルス側の新たな生存戦略の存在を示すことに繋がると考えられる。さらに本研究目的を達成することで、蚊媒介性フラビウイルスの感染初期に重要な免疫細胞や感染増強因子を同定することができ、蚊媒介性フラビウイルスに対するワクチン開発や病原性緩和に向けた治療法の提案を可能とする基盤研究につながるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 蚊の唾液による局所免疫応答の網羅的解析

日本脳炎ウイルスを媒介するアカイエカから唾液腺を採取し、得られた唾液腺抽出物 (Salivary gland extracts; SGEs) をマウスの Footpad に接種した。接種6時間後または24時間後にマウスの Footpad を回収し、自瀾祭シーケンサーによる RNA シーケンス解析を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。

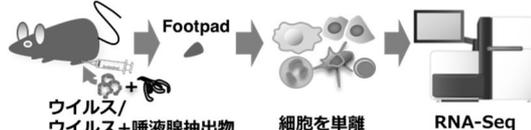


図2 蚊の唾液による局所免疫応答の網羅的解析

(2) マスサイトメトリー (CyTOF) を用いた網羅的

日本脳炎ウイルスをアカイエカ由来の SGEs または TLR2 リガンドをマウスの Footpad に接種した。24 時間後にマウスの Footpad から免疫細胞を分離し、各種免疫細胞の表面マーカーの抗

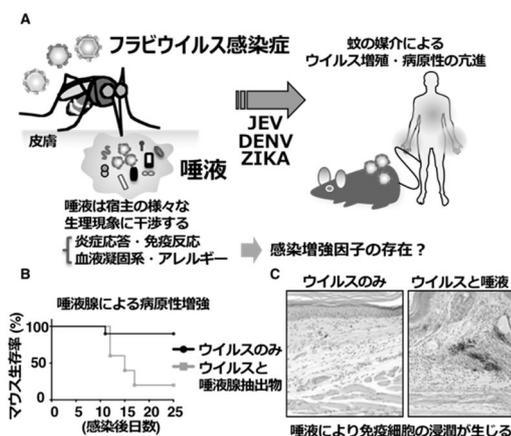


図1 蚊媒介性フラビウイルス感染における蚊の唾液の役割

体で染色を行い、マスサイトメーターによって免疫細胞の集団の変化やタンパク質発現解析を行なった。

(3) PrimeFlow RNA アッセイによるウイルス感染細胞の同定

日本脳炎ウイルスをアカイエカ由来の SGEs または TLR2 リガンドをマウスの Footpad に接種し、24 時間後にマウスの Footpad から免疫細胞を分離した。分離した免疫細胞内のウイルス RNA を PrimeFlow RNA アッセイを用いて検出し、また細胞表面マーカーの染色を行い、フローサイトメトリーにより解析することで、ウイルス感染細胞の同定を試みた。

(4) アレルギー誘導薬や抗炎症薬によるウイルス病原性への影響の検討

アレルギーの誘導物質であるコンパウンド 48/80 やヒスタミンと日本脳炎ウイルスを混ぜてマウスの Footpad に感染させ 24 時間後のウイルス RNA 量を定量し、ウイルス増殖に与える影響を検討した。

また、蚊の唾液によるウイルスの病原性増強に対して、抗炎症薬が抑制効果を示すかどうかを感染マウスモデルを用いて検討した。

4 . 研究成果

アカイエカから調整した唾液腺抽出物(SGEs)を接種することで、局所の皮膚では免疫細胞の浸潤を伴う炎症反応が惹起されることを示した。また、網羅的な遺伝子発現解析により、サイトカインやケモカインといった多くの自然免疫に関与する遺伝子群の発現が上昇することを明らかにした。また、外敵成分を特異的に認識するレセプターの代表例であり、自然免疫の中心的役割を果たしている Toll-like receptor (TLR)の発現が上昇することが観察された。以上の結果から、蚊の唾液によるウイルスの病原性増強には、唾液によって誘導される自然免疫応答が関与していることが示唆された。

SGEs や TLR2 リガンド刺激によって浸潤する免疫細胞をマスサイトメトリーにより解析をしたところ、非感染またはウイルス感染単独のものに比べて、感染局所には好中球や一部の単球・マクロファージ系の細胞が存在することを明らかにした。また、TLR2 リガンドと SGEs によって誘導される細胞浸潤は同様の傾向を示すことがわかり、これらの細胞の浸潤が病原性の増強につながることを示唆された。

次に、SGEs または TLR2 刺激によって誘導される免疫細胞のうち、どれがウイルスの標的細胞であるかを PrimeFlow RNA アッセイによって検討した。その結果、ウイルス RNA が陽性の細胞は、単球・マクロファージ系の細胞がメインであることが明らかになった。また、一部の樹状細胞のウイルス RNA 陽性であることが示された。一方で、多く浸潤してくる好中球はウイルスに感染していないことが示された。

肥満細胞からの顆粒放出を刺激することでアレルギー誘導するコンパウンド 48/80 やヒスタミンを日本脳炎ウイルスと共に感染させ、24 時間後にウイルスの RNA 量の定量を行なった。その結果、コンパウンド 48/80 やヒスタミン刺激では、SGEs や TLR2 リガンドと異なりウイルスの病原性を増強しない可能性が示唆された。一方で、SGEs 刺激によって誘導される病原性増強はある種の抗炎症薬の作用によって抑制される傾向を示すことが示唆された。

以上の結果から、蚊の唾液によって惹起される炎症応答を標的とした、新規の感染症制御戦略の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 T.Suzuki, H. Enatsu, Y. Miyata, Y. Orba, Y. Eshita, H. Sawa, Y. Matsuura, and T. Okamoto
2. 発表標題 蚊の唾液による自然免疫応答がフラビウイルスの病原性発揮に必要である
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T.Suzuki, H. Enatsu, Y. Miyata, Y. Orba, Y. Eshita, H. Sawa, Y. Matsuura, and T. Okamoto
2. 発表標題 Innate Immunity is required for pathogenicity of Flavivirus infection
3. 学会等名 第16回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 T.Suzuki, H. Enatsu, Y. Miyata, Y. Orba, Y. Eshita, H. Sawa, Y. Matsuura, and T. Okamoto
2. 発表標題 Innate Immunity is required for pathogenicity of Flavivirus infection
3. 学会等名 第19回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------