

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月26日現在

機関番号：82603  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790553  
 研究課題名（和文） インフルエンザウイルス感染モデルにおける記憶 B 細胞の新規再活性化機構の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of new reactivation mechanisms of influenza virus specific memory B cells in mouse model for influenza infection  
 研究代表者  
 小野寺大志（Taishi Onodera）  
 国立感染症研究所・免疫部・主任研究官  
 研究者番号：90513143

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルス感染症などの急性感染症においては記憶 B 細胞による抗原親和性の高い、より迅速な抗体産生応答がその重症化、致死率の改善において非常に重要な役割を果たす。本研究ではインフルエンザウイルスを認識した記憶 B 細胞が再活性化の際、CD4+T 細胞非依存的により迅速にウイルス中和活性の高い抗体を産生する事を明らかとし、更にこの再活性化経路がウイルス粒子内に存在する TLR リガンドである ssRNA を介した B 細胞内因性の TLR7-MyD88 の経路を通じたものであることを明らかとした。これらの結果はウイルス特異的な記憶 B 細胞の新たな再活性化メカニズムを示すとともに、記憶 B 細胞からの、より高い親和性の抗体を迅速に産生させるための新たなワクチンストラテジーを提案するものである。

研究成果の概要（英文）：Rapid production of high affinity antibodies by memory B cells, which are generated by prior vaccination and/or infection, plays an important role to improve mortality and morbidity in acute infectious diseases as influenza virus infection. In this study, we showed that memory B cells could produce high neutralizing antibodies against influenza virus more rapidly in CD4+ helper T cells independent way. Moreover, this reactivation mechanism was totally dependent upon B-cell intrinsic TLR7-MyD88 signaling, which is elicited by ssRNA included in virus particles. These findings provide insight into the new reactivating mechanisms of virus-specific memory B cells, together the development of new vaccine strategy to preferentially elicit high affinity antibodies from pre-existing memory B cell pool by booster vaccination.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：記憶 B 細胞、Toll 様受容体、ワクチン、インフルエンザウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

現在、世界で使用されている感染症に対するワクチンの多くは記憶 B 細胞をはじめとした液性免疫記憶を誘導することにより、宿主に感染防御能を付与し機能していることが知られている。特にインフルエンザウイルス感染症を含む急性感染症に対してはよ

り迅速にウイルス中和活性の高い抗体産生応答を誘導することが重要である。現在、我が国をはじめとして多くの国で採用されているインフルエンザに対するワクチンはウイルス粒子を不活化したタンパク成分を抽出した HA スプリットワクチンが使用されており、ある程度の感染防御効果が認められて

いるものの、毎年世界中で約 6 億人の感染者とともに約 40 万人の死者を出していることが報告されている。このことから現行のインフルエンザワクチンに代わるより効果の高いワクチンの開発が望まれている。季節性インフルエンザワクチンは主に以前の感染やワクチン接種によって形成された記憶 B 細胞を再度活性化させることにより血中への中和抗体を誘導することにより機能している。しかし、これまで記憶 B 細胞がインフルエンザワクチンに対してどのようなメカニズムで再活性化応答するのか明らかにされていない。本研究ではこれまで我が国で用いられてきた 2 種類のインフルエンザワクチン（不活化全粒子ワクチン、HA スプリットワクチン）に対する記憶 B 細胞の再活性化機構の違いを解明することにより、より効果的にウイルスの中和抗体を産生させるためのメカニズムを明らかとする

## 2. 研究の目的

本研究はインフルエンザウイルスワクチンに対する記憶 B 細胞の再活性化応答を解析することにより以下の点を明らかにすることを目的として行った。

(1) 高い免疫原性を持つことで知られている不活化全粒子ワクチンが現行の HA split ワクチンと記憶 B 細胞に対する再活性化応答にどのような違いがあるのかを明らかにする。

(2) (1)で明らかになった再活性化応答が記憶 B 細胞においてどのようなシグナル要求性により成り立っているのかを明らかとする。

## 3. 研究の方法

① インフルエンザウイルス特異的な記憶 B 細胞の検出系、および再活性化能の評価系の創出

インフルエンザウイルスの主要表面抗原である HA（ヘマグルチニン）の組み換えタンパク質を *in vitro* により作成し、蛍光色素（PE（phycoerythrin））と結合させることにより HA 特異的に結合する記憶 B 細胞を検出するプローブを作成した。

この際、HA は通常 3 量体を形成するが、3 量体の HA は様々なタンパク質の末端に存在するシアル酸に結合しバックグラウンドが上昇してしまうため、HA の膜貫通領域を欠失させることにより 1 量体の HA を作成しプローブの作成に用いた。

ワクチン接種後のマウスの脾臓細胞を通常の記憶 B 細胞の表面マーカーによる染色に加えこの HA プローブにより染色して HA 反応性の記憶 B 細胞をフローサイトメーターで検出し、ソーティングにより分取した。

さらに分取した記憶 B 細胞を prime された CD4T 細胞と共にリンパ球欠損マウスである SCID マウスに再構築して、再度ワクチンでブーストすることにより産生された抗体産生細胞、また血中抗体量を ELISPOT 法、また ELISA 法により検出した。

② 不活化全粒子ワクチン、HA split ワクチンに対する記憶 B 細胞の再活性化能の違いの評価

2 種類のインフルエンザワクチンに対する再活性化能の違いを評価するため、以下の 4 点について着目して解析を行った。

(1) 抗体産生応答の迅速性の評価  
SCID マウスに記憶 B 細胞と T 細胞を再構築し 2 種類のインフルエンザワクチンによりブーストした後の HA 抗原に対して特異的な抗体産生応答を経時的に追跡した。

(2) 産生された抗体の抗原親和性の高さの評価

記憶 B 細胞をブーストした後に産生された抗体の抗原親和性を測定するため、ELISA 法を応用して、抗原に反応させた血清のうち親和性の低い抗体のみを 7M Urea による処理により剥離させ、親和性の高い抗体のみを検出することにより 2 つのワクチンで産生された抗体の抗原親和性の高さを評価した。

(3) 産生された抗体のウイルス中和活性の評価

*In vitro* において MDCK 細胞に対するインフルエンザウイルス感染の中和能を測定する Micro Neutralization assay を用いることにより 2 つのワクチンで誘導された抗体のウイルス中和活性の違いを評価した。

(4) 産生された抗体の他のウイルス株に対する交差反応性の評価

ブースト抗原に用いたウイルス株（NIBRG14 株;H5N1）と同じサブタイプだがクレードの異なるウイルス株（Indonesia 株;H5N1）、（Anhui 株;H5N1）由来のリコンビナント HA を作成し、それに対する交差反応性を ELISA 法を用いて解析した。

③ 2 種類のインフルエンザワクチンに対する記憶 B 細胞の再活性化におけるシグナル要求性の探索

以下の 3 点のシグナル要求性について解析を行った。

(1) CD4+ヘルパー T 細胞シグナル要求性  
SCID マウスにリンパ球を再構築する際、記憶 B 細胞のみを移入し、2 種類のインフルエンザワクチンによりブーストを行い、その抗体産生応答能を評価した。

(2) TLR シグナル要求性

MyD88/TRIF ダブルノックアウトマウス、それぞれのシングルノックアウトマウス、TLR7 ノックアウトマウスを用いてそれぞれのマウス由来の記憶 B 細胞の 2 つのワクチンに対するブースター効果を抗体産生応答を指標に評価した。

更に、TLR シグナルは B 細胞以外にも多くの細胞で機能していることから、B 細胞内因性の TLR シグナルの要求性に関して評価するため、B 細胞特異的な MyD88 欠損マウス (mb1Cre-MyD88floxed) を用いて B 細胞のみで TLR シグナルが欠損したマウス由来の記憶 B 細胞におけるブースター効果を同様に評価した。また、B 細胞内因性の TLR7 シグナルの要求性を評価するため、HA に対して特異的な B 細胞抗原受容体のノックインマウスと TLR7 ノックアウトマウスを掛け合わせることで TLR7 を欠損した HA 特異的な記憶 B 細胞を作成し、これに対する 2 つのワクチンのブースター効果を同様に評価した。

### (3) I 型 IFN シグナル要求性

インフルエンザウイルスに対する応答では pDC により産生された I 型 IFN が 1 次抗体産生応答を増強するとの報告がなされていることから、記憶 B 細胞応答においても I 型 IFN シグナルが関与しているのかを評価するため、I 型 IFN レセプター欠損マウス由来の記憶 B 細胞を用いて、2 つのワクチンに対するブースター効果を同様に評価した。

## 4. 研究成果

2 種類のインフルエンザワクチンに対する記憶 B 細胞応答を比較解析した結果、以下の成果を得ることができた。

A, 全粒子ワクチンは HA スプリットワクチンとは異なり記憶 B 細胞を T 細胞非依存的に再活性化する。

インフルエンザワクチンを接種することにより形成された HA 特異的な記憶 B 細胞を SCID マウスに移入し T 細胞存在下、また非存在下で全粒子ワクチンまたは HA スプリットワクチンでブーストした。その結果、T 細胞存在下においては全粒子ワクチン、HA スプリットワクチン共にほぼ同等に抗体産生応答が誘導されたのに対して、T 細胞非存在下では全粒子ワクチンのみが記憶 B 細胞からの抗体産生応答を誘導した。このことより全粒子ワクチンは記憶 B 細胞を T 細胞非依存的に再活性化する事が明らかとなった。

B, 全粒子ワクチンは T 細胞非依存的な応答を誘導する事により HA スプリットワクチンに比しより迅速な抗体産生応答を誘導する。

T 細胞非依存的な再活性化応答は非常に頻度の低い同じ抗原特異性をもつ T 細胞との相

互作用を経る必要がないため、より迅速な抗体産生応答が期待できる。これを検証するため、記憶 B 細胞を 2 つのワクチンでブーストした後の抗体産生応答の kinetics を追って解析したところ、全粒子ワクチンではブースト後 4 日目といった非常に早期から多量の抗体産生細胞を産生することが明らかとなった。

C, 全粒子ワクチンで誘導される T 細胞非依存的応答で産生される抗体はより抗原親和性が高く、ウイルス中和活性が高い。

インフルエンザウイルスの感染防御効果において、産生される抗体の質、つまり、ウイルス抗原に対する抗原親和性の高さ、ウイルス中和活性の高さが重要な要素となる。

2 種類のワクチンで産生される抗体のこれらの指標を評価した結果、全粒子ワクチンでブーストした際に産生される抗体はこの 2 つの指標のどちらもより高いことが明らかとなった。更に、これが全粒子ワクチン特異的に誘導する T 細胞非依存的な応答によって産生される抗体によるものであることが明らかとなった。

D, 記憶 B 細胞の T 細胞非依存的応答、T 細胞依存的応答で産生される抗体に交差反応性は ほぼ同等である。

インフルエンザウイルスはウイルスの中でも非常に変異を起こしやすい事が知られており、これらの変異した株に対しても交差反応し中和可能な抗体の産生を誘導することは感染防御上、非常に有用である。2 つのワクチンでブーストする事により産生された抗体の異なるクレードのウイルス株に対する交差反応性を比較したところ、どちらの抗体もほぼ同等に交差反応性を示し、違いは認められなかった。

E, 記憶 B 細胞の全粒子ワクチンによる T 細胞非依存的な再活性化には B 細胞内因性の TLR シグナルが必須である。

これまで記憶 B 細胞がウイルス粒子に対して T 細胞非依存的に応答する事は CMV 等の系で報告されていたが、そこに関わるシグナル要求性に関しては探索されていなかった。インフルエンザウイルス粒子は TLR7 のリガンドとなる ssRNA を含んでいることから、これによる TLR シグナルが T 細胞非依存的な記憶 B 細胞の再活性化メカニズムに関与しているのではないかと仮説を立て、評価した。

その結果、B 細胞内因性の TLR7, MyD88 を欠損した記憶 B 細胞では全粒子ワクチンに対する T 細胞非依存的な応答が全く認められず、このことから、記憶 B 細胞の T 細胞非依存的な応答には B 細胞内因性の TLR シグナルが必須であることが明らかとなった。

F, I 型 IFN シグナルは記憶 B 細胞の T 細胞非依存的応答を増強する。

インフルエンザウイルスに対する 1 次抗体産生応答では I 型 IFN シグナルがその抗体産生応答の増強に重要な役割を果たしている事が報告されている。我々は、記憶 B 細胞の T 細胞非依存的な応答においても I 型 IFN シグナルが関与しているか解析したところ、I 型 IFN レセプターを欠損した記憶 B 細胞は T 細胞非依存的な抗体産生応答が野生型の記憶 B 細胞に比べて減弱している事を明らかとした。このことから、I 型 IFN シグナルは記憶 B 細胞の T 細胞非依存的な応答には必須ではないが、それを増強するのに重要であることが明らかとなった。

これらの結果から、記憶 B 細胞をワクチンによって再活性化させる際、TLR リガンドを含んだ形で B 細胞内因性の TLR シグナルを惹起させてやることで、T 細胞非依存的な応答を誘導し、より迅速に中和活性の高い抗体産生応答を誘導する事が可能であることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1、Taishi Onodera, Yoshimasa Takahashi, Yusuke Yokoi, Manabu Ato, Yuichi Kodama, Satoshi Hachimura, Tomohiro Kurosaki, Kazuo Kobayashi. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. *PNAS* **109(7):2485-90, 2012**

2、Yoshimasa Takahashi, Taishi Onodera, Kazuo Kobayashi, Tomohiro Kurosaki Primary and Secondary B-Cell Responses to Pulmonary influenza infection. *Infectious Disorders Drug Targets* **12:232-40, 2012**

[学会発表] (計 5 件)

1、ONODERA Taishi, AIZAWA Ryutaro, HOSONO Akira, KAMINOGAWA Shuichi, KOBAYASHI Kazuo, TAKAHASHI Yoshimasa.; Role of Toll-like receptor signaling for the development and reactivation of virus-specific memory B cells. The 40<sup>th</sup> JSI annual meeting. 2011 11.27-29, Chiba

2, Takahashi, Y., Onodera, T., Yokoi, Y., Kurosaki, T., Kobayashi, K.; Protective

memory B cell responses to influenza virus infection. The 40<sup>th</sup> JSI annual meeting. 2011 11.27-29, Chiba (招待講演)

3, Takahashi, Y. Onodera, T., Yokoi, Y., Ato, M., Hachimura, S., Kurosaki, T., Kobayashi, K.; Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. Keystone symposia, Viral Immunity and Host Gene Influence. 2012. 3.25 Colorado, USA.

4, Taishi Onodera, Tomohiro Kurosaki, Kazuo Kobayashi, Yoshimasa Takahashi B-cell intrinsic Toll-like receptor signaling accelerates memory B cell response to booster influenza Vaccination. The 41<sup>th</sup> JSI annual meeting. 2012 12.5-7, Kobe

5, Taishi Onodera, Tomohiro Kurosaki, Kazuo Kobayashi, Yoshimasa Takahashi B-cell intrinsic Toll-like receptor signaling accelerates memory B cell response to booster influenza Vaccination. Keystone Symposia B cell development and function. 2013. 2.10-15, Colorado, USA

[図書] (計 1 件)

小野寺大志、高橋宜聖、小林和夫 B 細胞内因性 TLR シグナルによる B 細胞応答の制御機構、臨床免疫・アレルギー科 58 巻 275 - 282, 2012

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野寺 大志 (ONODERA TAISHI)

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：90513143

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：