

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：32633

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659029

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスに対するIgA応答の制御

研究課題名(英文) Regulation of IgA responses against influenza virus

研究代表者

入村 達郎 (IRIMURA, Tatsuro)

聖路加国際大学・その他部局等・その他

研究者番号：80092146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：気道における抗インフルエンザウイルス免疫応答特にIgA抗体の産生に、樹状細胞表面に発現し糖鎖を認識するMGL2が関与する可能性をマウスを用いて明らかにする事が本研究の目的である。インフルエンザウイルス(PR8株)投与後の気道及び肺における病態、免疫器官におけるサイトカイン産生、免疫グロブリン産生に関してMGL2-KOマウスと野生型マウスとの違いを検討したが、差異が見られなかった。一方、MGL2を発現する皮膚樹状細胞亜集団は独自の遺伝子発現プロファイルを持つ集団であり、Th2応答にかかわっていることが証明された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate whether MGL2 is involved in the immune response against influenza virus, particularly IgA responses, in the airway using mice. Mouse-adapted influenza strain, PR8, was administrated into the airways of MGL2-KO and wild-type mice and pathogenesis, cytokine production, and immunoglobulin production were investigated. There was no remarkable differences in MGL2-KO mice. However, in the skin, dendritic cells expressing MGL2 were proven to be responsive for skewing the response toward the Th2-type.

研究分野：免疫学、糖鎖生物学

キーワード：レクチン インフルエンザ 樹状細胞 免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

上気道等の上皮における感染防御には IgA が重要であると言われていたが、体液性免疫応答の中で、IgA 産生がどのように制御されているかは意外な程分かっていない。IgA クラススイッチについては我が国の免疫学者の貢献も良く知られており、清野（東大）らが鼻腔リンパ組織の重要性を指摘し、Fagarasan（理研）らが AID 遺伝子の重要性を解明し、樗木（東医歯大）らが形質細胞様樹状細胞の重要性を発見し、清水（阪大）らが TGF- β の重要性を明らかにした。しかし、感染症、特にインフルエンザの進行過程で IgA 産生が如何に制御され、これが感染の成立や治癒とどのように関連しているのかは不明であった。私どもは予備的研究を行い、インフルエンザウイルス感染において、樹状細胞やマクロファージの表面に発現する免疫制御分子であり糖鎖認識分子である MGL2 を遺伝的に欠損したマウスでは、ウイルス特異的な IgA の産生量が低いという予備的な知見を得た。免疫細胞に発現するレクチンの役割は多重的と考えられるので、観察された現象と、一次感染及び二次感染における防御との関係を解明した上で、IgA 応答を開始、促進する機構を明らかにすることは、極めて重要と考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、以下を目的とした。(1) MGL2 欠損により IgA 産生が影響をけることを再確認する。(2) MGL2 欠損マウスにおけるインフルエンザの病態に違いがあるかどうかを明らかにする。(3) MGL2 発現細胞の特徴を解明する。(4) インフルエンザに対する IgA 応答と感染病態形成における MGL2 分子の役割を検証する。これらにより、インフルエンザに対する免疫防御の中で未知であった、気道における IgA 産生の制御機構が明らかになり、鍵分子としての MGL2 を標的とした予防法と治療法の改善が実現出来ることが期待された。

3. 研究の方法

インフルエンザウイルス (PR8 株) 投与後の気道及び肺における病態、免疫器官におけるサイトカイン産生、免疫グロブリン産生に関して MGL2-KO マウスと野生型マウスとの違いを検討した。

Mgl2-KO 又は野生型マウスを用いて、インフルエンザウイルス A/PR8 株の経鼻感染実験を行った。二次感染におけるウイルス増殖と一次感染時における IgA 応答との関連を明確にすることも目指した。ウイルス投与量は

1,000 pfu/4 μ l とし、3、7、30 日後の鼻腔内のウイルス量を MDCK 細胞を用いたブランク法によって測定した。経時的に採血して血清中の IgG 及び IgA 力価をインフルエンザウイルスヘマグルチニン (HA) に対する ELISA によって測定した。30 日後に鼻腔洗浄液を得て、抗ウイルス HA IgA を定量した。これらにより、一次感染と IgA 応答の関係及びその過程における MGL2 の関与を明らかにすることを旨とした。

鼻粘膜及び鼻腔リンパ組織の MGL2 発現細胞の特徴を解明し、この細胞による IgA 産生制御機構を明らかにするため、ナイーブ状態及びインフルエンザウイルス感染後における鼻腔粘膜下の結合組織及び鼻腔リンパ組織 (NALT) を別々に摘出し、MGL2 発現細胞を単離し、特徴を明らかにすることを旨とした。既に開発していたモノクローナル抗体を駆使して、先ず免疫組織化学的に、次に単離した細胞を用いたフローサイトメトリー解析によって、MGL2 発現細胞の特徴を、皮膚やリンパ節の MGL2 発現細胞と比較しながら解析した。

一方、ウイルス感染後の鼻腔粘膜及び鼻腔リンパ組織において、IgA クラススイッチを促進する微小環境が存在するかどうかを種々のサイトカインとリンパ球の亜集団に注目して、組織レベルで追究した。これらの微小環境因子が、Mgl2-KO マウスの組織において低下もしくは欠損している可能性を追究した。

気道リンパ組織の MGL2 発現細胞は収量が低く解析が困難であったので、他の組織の MGL2 発現細胞の性質についても追究した。また、インフルエンザウイルス感染時とは異なる局面での気道における免疫応答が MGL2 の影響を受けるかを明らかにすることを目的に、喘息惹起モデルにおいて MGL2-KO マウスと野生型マウスとを比較した。

4. 研究成果

インフルエンザウイルス (PR8 株) 投与後の気道及び肺における病態、免疫器官におけるサイトカイン産生、免疫グロブリン産生に関して MGL2-KO マウスと野生型マウスとの違いを詳細に検討した結果、差異がないという結論に達した。

一方、MGL2 を発現する皮膚樹状細胞亜集団は真皮及び上皮に局在している樹状細胞の他の亜集団とは明らかに異なる独自の遺伝子発現プロファイルを持つことが明らかになり、これらが Th2 応答の惹起にかかわっていることも証明できた。

さらに、MGL2-KO マウスでは、アレルギー性気道炎症が増悪していることが明らかになり、これは MGL2-KO マウスでは樹状細胞が T 細胞の Th2 分化が亢進しているためであ

ることが判明した。

これらの結果から、MGL2 は一部の樹状細胞亜集団に発現しており、これらの細胞は免疫応答を Th2 型に偏らせる性質を持つが、MGL2はこの細胞において免疫応答を Th2 型に偏らせる性質は抑制しているという複雑な事実が解明された。MGL2-KO マウスでは、インフルエンザウイルスの感染性やこれに対する免疫応答に差異が見られなかったが、個々の過程においては影響を持つ可能性は十分并ある。

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 20 件全て査読あり)

1. Takahashi K, Nagai N, Ogura K, Tsuneyama K, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. Mammary tissue microenvironment determines T cell-dependent breast cancer-associated inflammation. *Cancer Sci*. 2015 May 2. doi: 10.1111
2. Ng WC, Liong S, Tate MD, Irimura T, Denda-Nagai K, Brooks AG, Londrigan SL, Reading PC. The macrophage galactose-type lectin can function as an attachment and entry receptor for influenza virus. *J Virol*, 88(3):1659-72, 2014. doi: 10.1128/JVI.02014-13. Epub 2013 Nov 20.
3. Higashi N, Waki M, Sue M, Kogane Y, Shida H, Tsunekawa N, Hasan A, Sato T, Kitahara A, Kasaoka T, Hayakawa Y, Nakajima M, Irimura T. Heparanase-mediated cleavage of macromolecular heparin accelerates release of granular components of mast cells from extracellular matrices. *Biochem J*, 458(2): 291-9, 2014. doi: 10.1042/BJ20131463.
4. Kim SJ, Wang YG, Lee HW, Kang HG, La SH, Choi IJ, Irimura T, Ro JY, Bresalier RS, Chun KH. Up-regulation of neogenin-1 increases cell proliferation and motility in gastric cancer. *Oncotarget*, 5(10): 3386-98, 2014.
5. Miyahara N, Shoda J, Kawamoto T, Ishida H, Ueda T, Akimoto Y, Kawakami H, Irimura T. Interaction of Muc4 and ErbB2 in a transgenic mouse model of gallbladder carcinoma: potential pathobiological implications. *Oncol Rep*. 2014 Nov;32(5):1796-802. doi: 10.3892/or.2014.3443. Epub 2014 Aug 25.
6. Lou C, Takahashi K, Irimura T, Saiki I, Hayakawa Y. Identification of Hirsutine as an anti-metastatic phytochemical by targeting NF- κ B activation. *Int J Oncol*, 45(5): 2085-91, 2014 Nov; doi: 10.3892/ijo.2014.2624. Epub 2014 Aug 27.
7. Kee JY, Ito A, Hojo S, Hashimoto I, Igarashi Y, Tsuneyama K, Tsukada K, Irimura T, Shibahara N, Takasaki I, Inujima A, Nakayama T, Yoshie O, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer by promoting TNF- α -induced apoptosis by tumor-associated macrophages. *BMC Cancer*, 14: 949, 2014. doi: 10.1186/1471-2407-14-949.
8. Higashi N, Waki M, Sue M, Kogane Y, Shida H, Tsunekawa N, Hasan A, Sato T, Kitahara A, Kasaoka T, Hayakawa Y, Nakajima M, Irimura T. Heparanase-mediated cleavage of macromolecular heparin accelerates release of granular components of mast cells from extracellular matrices. *Biochem J*, published online, 2013.
9. Murakami R, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Hattori M, Irimura T. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One*, 8(9): e73270, 2013.
10. Kee JY, Ito A, Hojo S, Hashimoto I, Igarashi Y, Tsukada K, Irimura T, Shibahara N, Nakayama T, Yoshie O, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K. Chemokine CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer via augmentation of tumor-infiltrating natural killer T cells in a murine model. *Oncol Rep*, 29:975-982, 2013.
11. Takahashi K, Takeda K, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. Functional roles of TRAIL-DR5 interaction in B16F10 by activating NF κ B pathway to induce metastatic potential. *Cancer Sci*, 104(5): 558-562, 2013.
12. Goudarzi H, Iizasa H, Furuhashi M, Nakazawa S, Nakane R, Liang S, Hida Y, Yanagihara K, Kubo T, Nakagawa K, Kobayashi M, Irimura T, Hamada J. Enhancement of in vitro cell motility and invasiveness of human malignant pleural mesothelioma cells through the HIF-1 α -MUC1 pathway. *Cancer Letter*, 339 (1): 82-92, 2013.

13. Kamoshida G, Matsuda A, Sekine W, Mizuno H, Oku T, Itoh S, Irimura T, Tsuji T. Monocyte differentiation induced by co-culture with tumor cells involves RGD-dependent cell adhesion to extracellular matrix. *Cancer Lett*, 315(2): 145-152, 2012.
14. Tamada Y, Takeuchi H, Suzuki N, Aoki D, Irimura T. Cell surface expression of hyaluronan on human ovarian cancer cells inversely correlates with their adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Tumour Biol*, 33(4): 1215-1222, 2012.
15. Napoletano C, Zizzari IG, Rughetti A, Rahimi H, Irimura T, Clausen H, Wandall HH, Belleudi F, Bellati F, Pierelli L, Frati L, Nuti M. Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation. *Eur J Immunol*, 42(4): 936-45, 2012.
16. Tian Y, Denda-Nagai K, Kamata-Sakurai M, Nakamori S, Tsukui T, Itoh Y, Okada K, Yi Y, Irimura T. Mucin 21 in esophageal squamous epithelia and carcinomas: analysis with glycoform-specific monoclonal antibodies. *Glycobiology*, 22(9): 1218-1226, 2012.
17. Isoyama S, Dan S, Nishimura Y, Nakamura N, Kajiwara G, Seki M, Irimura T, Yamori T, Establishment of PI3K inhibitor-resistant cancer cell lines and the therapeutic strategies for overcoming the resistance. *Cancer Sci*, 103(11):1955-60, 2012.
18. Isoyama S, Yoshimi H, Dan S, Okamura M, Seki M, Irimura T, Yamori T. Development of an immunohistochemical protein quantification system in conjunction with tissue microarray technology for identifying predictive biomarkers for phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Biol Pharm Bull*, 35(9):1607-13, 2012.
19. Sugiura D, Denda-Nagai K, Takashima M, Murakami R, Nagai S, Takeda K, Irimura T. Local effects of regulatory T cells in MUC1 transgenic mice potentiate growth of MUC1 expressing tumor cells *in vivo*. *PLoS One*, 7(9): e44770, 2012.
20. Suzuki J, Hamada E, Shodai T, Kamoshida G, Kudo S, Itoh S, Koike J, Nagata K, Irimura T, Tsuji T. Cytokine Secretion from Human Monocytes Potentiated by P-Selectin-Mediated Cell Adhesion. *Int Arch Allergy Immunol*. 160(2): 152-160, 2012.
- 〔学会発表〕(国際学会のみを抜粋計 14 件)
1. Irimura T. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. Sep 24-25, 2014. MGL and U-Tokyo Joint Symposium on Frontiers in Biomedical Engineering (Cambridge, MA, USA)
 2. Irimura T. Public private partnership in Japanese pharmaceutical affairs. Aug 31-Sep 4, 2014. FIP Congress (Bangkok, Thailand)
 3. Takahashi K, Nagai N, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y. Requirement of CD4T cells for establishing inflammatory tumor microenvironment in 4T1 breast cancer model. Jun 2-3, 2014. The 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. Kobe, Japan
 4. Shida H, Sue M, Komatsu N, Waki M, Nishimura Y, Nakajima M, Higashi N, Irimura T. Roles of heparanase expression in local and systemic inflammation: International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Nov 30- Dec 1, 2012. Ito Memorial Hall, The University of Tokyo, Tokyo.
 5. Nagai N, Tsunekawa N, Kimura Y, Irimura T, Hayakawa Y. Characterization of gene expression profiles of early or late progressor cancer cells in inflammation-associated malignant progression model, International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Nov 30- Dec 1, 2012, Ito Memorial Hall, The University of Tokyo, Tokyo.
 6. Takahashi K, Irimura T, Hayakawa Y. Bioluminescent imaging of inflammatory tissue microenvironment in 4T1 breast cancer model. International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Nov 30- Dec 1, 2012, Ito Memorial Hall, The University of Tokyo, Tokyo.
 7. Kimura A, Denda-Nagai K, Irimura T. MUC1 glycoforms have impact on protective immunity against MUC1-expressing tumor cells through the function of antigen presenting cells bearing MGL1/MGL2: International

- Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Nov 30-Dec 1, 2012, Ito Memorial Hall, The University of Tokyo, Tokyo.
8. Kimura Y, Sato-Matsushita M, Tahara H, Irimura T, Hayakawa Y. IL-17-producing NK1.1+ CD27+ $\gamma\delta$ T cells promote tumor malignant progression by inducing inflammatory microenvironment. International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences Nov 30-Dec 1, 2012, Ito Memorial Hall, The University of Tokyo, Tokyo.
 9. Denda-Nagai K, Murakami R, Hashimoto S, Nagai S, Irimura T. Dermal dendritic cells expressing MGL2 skew the immune response toward Th2 in contact hypersensitivity. The 12th International Symposium on Dendritic Cells (2012.10/7-11, Daegu, Korea).
 10. Tian Y, Denda-Nagai K, Kamata-Sakurai M, Nakamori S, Irimura T. Esophageal squamous carcinoma and normal squamous epithelia express differentially glycosylated mucin 21. 14th International Biennial Conference on Metastasis Research 2012 (Sep 2-Sep 5, 2012). Brisbane Convention and Exhibition Centre, Brisbane, Queensland, Australia.
 11. Kimura Y, Sato-Matsushita M, Tahara H, Irimura T, Hayakawa Y. IL-17-producing NK1.1- CD27- $\gamma\delta$ T cells promote tumor malignant progression by inducing inflammatory microenvironment: 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012, Sanjo Conference Hall, The University of Tokyo, 6/15-16, 2012.
 12. Denda-Nagai K, Kurashina R, Hara, Naoki Yoshida H, Irimura T. IL-10 induction in colonic macrophages by commensal bacteria is dependent on MGL1 and mediated by the Syk-CARD9 pathway: 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012, Sanjo Conference Hall, The University of Tokyo, 6/15-16, 2012.
 13. Murakami R, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Irimura T. A Unique

dermal dendritic cell subset expressing macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b). Program for Young Researcher Symposium in Europe, supported by Graduate School of Pharmaceutical Sciences, U-Tokyo (2012.6/6-14, University of Oxford, Oxford, UK; University of Bonn, Bonn, Germany).

14. Fujihira H, Usami K, Denda-Nagai K, Yamada K, Matsuno K, Shinohara Y, Takada A, Kakehi K, Irimura T. Glycosylation of Ebola viral envelope glycoproteins: regulation and roles in the infection. Program for Young Researcher Symposium in Europe supported by Graduate School of Pharmaceutical Sciences, U-Tokyo (2012.6/6-14, University of Oxford, Oxford, UK; University of Bonn, Bonn, Germany).

〔図書〕(計1件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
入村 達郎 (IRIMURA, Tatsuro)
聖路加国際大学・研究センター・部長
研究者番号：80092146

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者

長谷川 秀樹 (HASEGAWA, Hideki)

国立感染症研究所・感染病理部・部長

研究者番号：30301790

相内 章 (AINAI, Akira)

国立感染症研究所 インフルエンザ研究セン

ター・研究員

研究者番号：10572133

伝田 香里 (DENDA, Kaori)

聖路加国際大学・研究センター・上級研究院

研究者番号：00313122