

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860593

研究課題名(和文)麻疹ウイルス感染によるTh2応答誘導機構の解明

研究課題名(英文)The analysis of mechanisms of induction of Th2 type immune response by MV infection

研究代表者

有木 宏美(Ariki, Hiromi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40515061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルスは自然宿主がヒトであり、感染時の宿主応答の解析は困難であった。麻疹ウイルスの宿主受容体であるヒトCD150を発現させたトランスジェニックマウスは麻疹ウイルスに対して感受性となり、個体レベルでの解析が可能となった。CD150Tgマウスとウイルス認識に関与する分子のノックアウトマウスと交配し、得られたマウスを用いて、感染実験を行い、麻疹ウイルス感染時の免疫応答を個体レベルで解析した。

研究成果の概要(英文)：Measles virus (MV) is a highly pathogenic non-segmented negative-strand RNA virus that causes respiratory distress and immune suppression upon infection of its human host. Human CD150 is one of MV entry receptors. Human CD150Tg/Ifnar KO mice, which are generated by crossing CD150Tg mice with Ifnar KO mice, are susceptible to MV infection and serve as a useful mouse model. Using these mice, I investigated host immune responses against MV infection in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：麻疹ウイルス IL-4 IL-13

## 1. 研究開始当初の背景

経気道的に侵入した麻疹ウイルスはまず、宿主受容体(CD150)を発現している樹状細胞や肺胞マクロファージに感染する。その後、感染した樹状細胞、マクロファージがリンパ節へと移動し、そこでT、B細胞へと感染し、全身感染となる。麻疹ウイルスは抗原提示能を持つ樹状細胞やマクロファージに初期感染することで、class II MHC分子の発現低下等によって強力な免疫抑制を引き起こし、その後の免疫応答をウイルスに有利に働かせると考えられている。

これまで麻疹ウイルス感染による免疫抑制の原因は、Th1タイプの炎症性サイトカインであるIL-12の産生抑制、免疫抑制性のサイトカインであるIL-10の持続的な高産生などであるとされてきた。一方で、Th2タイプのサイトカインであるIL-4、IL-13が高産生されているとの報告もあり、より詳細な検討が必要である。感染時の宿主の免疫応答を詳細に検討するにはモデル動物の使用が不可欠であるが、麻疹ウイルスの自然宿主はヒトであるため、上述のような免疫応答のアンバランスを誘導する分子機構はほとんど検討されていない。

我々は麻疹ウイルスの受容体であるヒトCD150を発現させたCD150トランスジェニックマウス(Tg)をモデル動物として作製することに成功し、麻疹ウイルスに対する免疫応答の解析を行ってきた。CD150Tgマウスを用いて、樹状細胞がT細胞に与える影響について検討したところ、麻疹ウイルス感染時に誘導されるTh2タイプの免疫応答が惹起されていることを見出した。麻疹ウイルス感染樹状細胞と共培養した、CD4陽性T細胞はIL-10、IL-13を高産生していた。このとき、通常Th2タイプの免疫応答で観察されるIL-4はほとんど産生されておらず、IL-13に傾いたサイトカインプロファイルであった。IL-13受容体ノックアウトマウスの解析からIL-4ではなくIL-13が喘息の病態やアレルギーとの関与が強く示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では麻疹ウイルス感染樹状細胞において、IL-10、IL-13産生T細胞を誘導する機構があるのではないかと考え、この分子機構を解明することを目的とした。特に樹状細胞の機能変化に注目して解析を行った。

## 3. 研究の方法

麻疹感受性マウスであるCD150Tg/IFNAR欠損マウスを用いて、骨髓由来樹状細胞並びに脾臓由来樹状細胞に麻疹ウイルスを感染させ、遺伝子変化を検討した。また、生体内への感染ルートを検討し、誘導される免疫応答について解析を行った。

麻疹ウイルスを感染させた樹状細胞とナイーブT細胞を共培養し、T細胞から産生されるサイトカイン、T細胞で発現誘導される遺伝子についても検討を行なった。

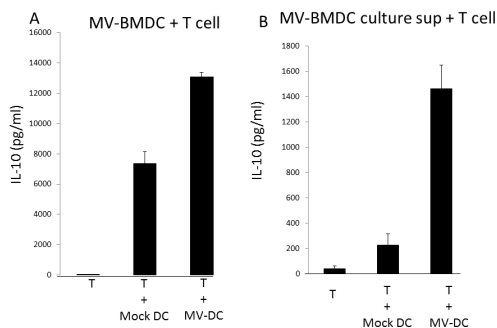
## 4. 研究成果

まず、麻疹ウイルス感染時にTh2タイプのサイトカインが産生されるか、検討するため、CD150Tg/IFNAR欠損マウスに麻疹ウイルスを腹腔内投与し、感染後、脾臓よりT細胞を単離し、産生されるサイトカインをELISAにて測定した。その結果、CD4陽性T細胞よりIL-4、IL-10が産生されており、これまでの報告と同様にTh2タイプのサイトカイン産生を示した。次に感染樹状細胞での機能変化を調べるために、CD150Tg/IFNAR欠損マウス骨髓よりGM-CSF存在下で樹状細胞を誘導し、麻疹ウイルスを感染させ、脾臓より単離したT細胞と共培養した。培養上清中のサイトカインをELISAにて測定した結果、IL-10が高産生されていた(図1)。麻疹ウイルス感染樹状細胞の培養上清を用いてT細胞を培養した場合でもT細胞よりIL-10が産生されたことから樹状細胞から放出される液性因子がIL-10産生T細胞の誘導に関与すると考えられた(図1)。共培養したT細胞のmRNAの発現変化を定量PCRで検討したところ、IL-10高産生T細胞であるTr1のマーカー遺伝子の上昇が観察された(図2)。Tr1細胞はIL-10を高発現し、免疫抑制を担っていると考えられている。その分化誘導はIL-27によってマスター遺伝子であるc-mafの発現が誘導され、c-mafがIL-10、IL-21を発現誘導することが知られている。IL-27はIL12p28とEBI-3タンパク質のヘテロダイマーである。そこで麻疹ウイルス感染樹状細胞でIL-27の発現誘導を検討したところ、IL-12p28が麻疹感染によって誘導されることが示された(図3)。次に、T細胞との共培養中に抗IL-12p28阻害抗体を添加し、IL-10産生誘導が減少されるか検討を行ったところIL-10産生が半分程度に減少した(図4)。以上の結果より、麻疹ウイルスが樹状細胞に感染するとIL-27産生を介して、T細胞をIL-10産生Tr1細胞に分化誘導することが明らかとなった。しかしながら、抗IL-12p28抗体存在下でもIL-10の産生量は半分程度にしか低下しなかったことから、そのほかの因子がIL-10産生T細胞誘導に関与すると考えられる。

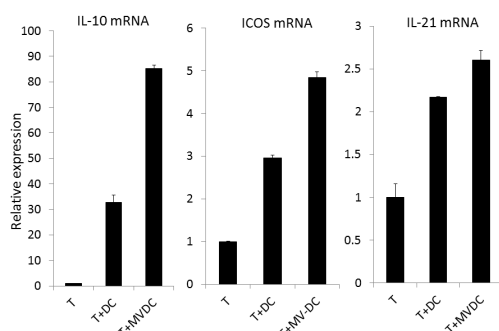
次に、麻疹感染樹状細胞とT細胞を共培養した際に誘導されるIL-13の誘導機構について検討を行った。近年、ウイルス感染による喘息等にはIL-13-IL-33経路の関与が示唆されている。ウイルス感染によってTSLP、IL-25、IL-33が産生され、これらのサイトカインがT細胞をTh2へ分化誘導することが知られている。そこで、麻疹ウイルス感染樹状細胞でもIL-33、TSLP、IL-25の発現誘導を検討したところ、麻疹ウイルス感染によってIL-33、Tslpの発現が上昇していた。腹腔内投与によ

り麻疹ウイルスを感染させると脾臓においても Tslp, IL-33 の発現上昇が観察され、in vivo において、麻疹感染によってこれらの遺伝子が誘導されることが判明した。感染樹状細胞と T 細胞を共培養すると IL-13 が高産生されるが、これは細胞同士の相互作用を阻害すると、IL-13 の高産生はキャンセルされたことから、共培養による IL-13 誘導には細胞間接着が必要であることが明らかとなった。次に、生体内感染において、肺での IL-13, IL-33, tslp の発現を検討するため、投与経路を経気道、経鼻経路に変更して実験を行った。麻疹ウイルスにルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ組換えウイルスを用いて、まず感染効率を確認した。しかし残念ながら、経気道感染、経鼻感染では感染自体が成立しなかった。肺洗浄液中のウイルスタイターを測定したが、ウイルスは検出されなかった。肺洗浄液中のサイトカイン産生を ELISA にて測定したが、IL-4, IL-13, IL-10, IFN-g いずれのサイトカインも検出限界以下であった。この原因として、経気道感染、経鼻感染では腹腔内投与に比べ、投与量が少ないため、感染が成立しないものと考えられた。

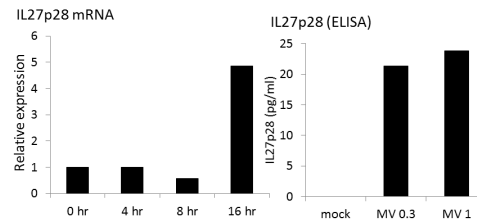
以上の結果より、麻疹ウイルス感染時に誘導される Th2 タイプ T 細胞の誘導機構の一端が明らかとなった。生体内での誘導機構については今後投与経路、用いるウイルス等を改良して検討する必要がある。



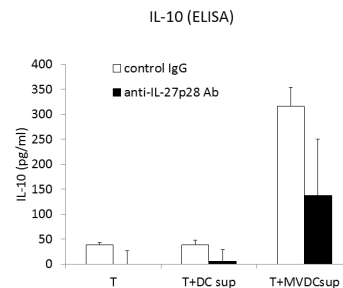
(図 1) 麻疹ウイルス感染樹状細胞と T 細胞の培養上清中の IL-10 産生量。(A) 樹状細胞と T 細胞共培養上清中の IL-10 産生量。(B) 感染樹状細胞の培養上清で CD4 陽性 T 細胞を培養した際の IL-10 産生量。MV; 麻疹ウイルス、DC; 樹状細胞、T; T 細胞。



(図 2) 麻疹ウイルス感染樹状細胞と共培養した T 細胞での Tr1 関連遺伝子の発現量。



(図 3) 骨髄由来樹状細胞での麻疹感染による IL12p28mRNA、IL12p28 タンパク質の発現誘導。



(図 4) 抗 IL-12p28 抗体による IL-10 産生の抑制。麻疹ウイルス感染樹状細胞の培養上清を用いて T 細胞を培養した ( )、その際抗 IL-12p28 抗体を添加した ( )、その後 IL-10 産生量を ELISA にて測定した。

## 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 7 件)

1. Takaki H, Shime H, Matsumoto M, Seya T. Tumor cell death by pattern-sensing of exogenous RNA: Tumor cell TLR3 directly induces necroptosis by poly(I:C) in vivo, independent of immune effector-mediated tumor shrinkage.

*Oncoimmunology*, In press 【査読有】

2. Sato H, Oshiumi H, Takaki H, Hikono H, Seya T.

Evolution of the DEAD box helicase family in chicken: chickens have no DHX9

ortholog.

*Microbiol Immunol.* 59, 633-640 (2015)  
doi: 10.1111/1348-0421.12322. 【査読有】

3. Takemura R, Takaki H, Okada S, Shime H, Akazawa T, Oshiumi H, Matsumoto M, Teshima T, Seya T.

PolyI:C-Induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune effector-mediated tumor elimination in vivo.

*Cancer Immunol Res.* 8, 902-914 (2015)  
doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0219.

【査読有】

4. Takashima, K, Oshiumi H, Takaki H, Matsumoto M, Seya T.

R1OK3-Mediated Phosphorylation of MDA5 Interferes with Its Assembly and Attenuates the Innate Immune Response.

*Cell Reports*, 11, 192-200 (2015)

【査読有】

5. Leong C, Oshiumi H, Okamoto M, Azuma M, Takaki H, Matsumoto M, Chayama K, Seya T.

A MAVS/TICAM-1-independent IFN-inducing pathway contributes to regulation of HBV replication in the mouse hydrodynamic injection model.

*J. innate immunol.*, 7, 47-58 (2015)

doi: 10.1159/000365113

【査読有】

6. Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T.

MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon g-induction restricts the response to measles infection in CD150Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells.

*Mol Immunol.* 57, 100-110 (2014)

doi: 10.1016/j.biocel.2014.05.001

【査読有】

7. Takaki H, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T.

Dendritic cell subsets involved in type I IFN induction in mouse measles virus infection models.

*Int J Biochem Cell Biol.* 53, 329-333 (2014)

doi: 10.1016/j.molimm.2013.08.007.

【査読有】

〔学会発表〕(計4件)

1. Hiromi Takaki, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya

PolyI:C-induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune

effector-mediated tumor elimination in vivo.

第44回日本免疫学会総会・学術集会

2015年11月18-20日

札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

2. Ken Takashima, Hiroyuki Oshiumi, Hiromi Takaki, Misako Matsumoto, and Tsukasa Seya

R1OK3-Mediated Phosphorylation of MDA5 Interferes with Its Assembly and attenuates the Innate Immune Response.

第44回日本免疫学会総会・学術集会

2015年11月18-20日

札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

3. 高木宏美、押海裕之、松本美佐子、瀬谷司

樹状細胞における麻疹ウイルス感染によるI型IFN産生経路の解析

第79回日本インターフェロンサイトカイン学会・学術集会

2014年6月19-20日

札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

4. Chean Ring Leong, 押海裕之、岡本将明、東正大、高木宏美、松本美佐子、瀬谷司

Inhibition of Hepatitis B virus replication by the Interferonstimulated gene product of 20kDa protein (ISG20).

第79回日本インターフェロンサイトカイン学会・学術集会

2014年6月19-20日

札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20536/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

有木(高木) 宏美 (TAKAKI, Hiromi)

北海道大学大学院医学研究科・助教

研究者番号: 40515061

(2)研究分担者

なし