

論文の内容の要旨

論文題目 : Analysis of the host responses to influenza virus infection and their application to the development of vaccines

(インフルエンザウイルスに対する宿主応答の解析とワクチン開発への応用)

氏名 : 桂 廣亮

インフルエンザウイルスは代表的な呼吸器感染症の原因ウイルスで、主に気道上皮細胞に感染し増殖する。感染を感知した宿主細胞は抗ウイルス応答を惹起し、ウイルスの増殖を抑制する。ウイルスが排除された後は、抗炎症性サイトカインなどの働きによって抗ウイルス応答は収束し、ウイルス特異的な獲得免疫が誘導され、次なる感染に備える。

私は、①宿主細胞への感染と抗ウイルス応答の惹起、②抗ウイルス応答の収束、③ウイルス特異的な獲得免疫の誘導において宿主応答の解析を行った。

【第一章】Venus を発現する組み換えウイルスの性状と感染動態の解析

個体内におけるインフルエンザウイルス感染の動態や、個々の感染細胞の詳細な解析を行う上で、レポーターウイルスは有用なツールである。2010年に A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株を基に緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein ; GFP)を発現する増殖可能な組み換えインフルエンザウイルスが開発された(Proc Natl Acad Sci USA, 107, 11531-6)。しかし、このレポーターウイルスは蛍光シグナルが弱く、増殖能も低かったため生体内の解析には適していなかった。当研究室では、報告されたウイルスの GFP をより蛍光強度の強い Venus に置換し、さらにマウスと培養細胞で継代することで、強い蛍光シグナルと高増殖能を合わせ持つウイルス

(NS1-Venus PR8 MA ウイルス) の作出に成功した。そこで私は、このウイルスの性状解析とマウスにおける感染細胞の動態解析を行った。

NS1-Venus PR8 MA ウイルスのシーケンス解析を行ったところ、ポリメラーゼのサブユニット

トの一つである PB2 (PB2-E712D) と、受容体との結合や膜融合に重要なヘマグルチニン (HA-T380A) に一つずつ変異が確認された。これらの変異により、NS1-Venus PR8 MA ウイルスの培養細胞における増殖能が野生型インフルエンザウイルスとほぼ同程度にまで回復した。さらに、PB2-E712D の変異はマウスにおける増殖能及び感染細胞内での Venus の発現量を上昇させることがわかった。

続いて、肺葉全体における Venus 陽性細胞の分布を観察した。透明化試薬 SCALEVIEW A2 により透明化した肺を蛍光実体顕微鏡にて観察した結果、NS1-Venus PR8 MA ウイルスの感染後 3 日から 5 日目に、気管支から肺胞にかけて Venus 陽性細胞が検出された。組織学的な解析及びフローサイトメトリーの結果、気管支上皮においてはクララ細胞が、肺胞では II 型肺胞上皮、肺胞マクロファージ及び単球が Venus 陽性細胞である事が示された。

最後に、インフルエンザウイルス感染が肺胞マクロファージ及び単球の機能に及ぼす影響について検討した。これらの細胞をフローサイトメトリーにて Venus 陽性細胞集団と Venus 陰性細胞集団に分離し、マイクロアレイにて網羅的に遺伝子発現解析を行った。解析の結果、Venus 陽性細胞は I 型インターフェロンやケモカインなど抗ウイルス応答に関与する遺伝子群だけでなく、組織損傷に応答する遺伝子群も発現上昇していることが明らかとなった。従って、これらの細胞は感染局所にて抗ウイルス応答だけでなく、組織障害に対する修復過程にも関与している可能性が示唆された。

以上のように、NS1-Venus PR8 MA ウイルスは容易に感染細胞の同定が可能な優れたレポーターウイルスであり、様々な実験に応用できると考えられる。

【第二章】インフルエンザウイルス性肺炎の炎症収束段階に寄与する分子機構の解析

インフルエンザウイルスをマウスに感染させると肺に強い炎症が起きる。インフルエンザウイルスによる自然免疫の活性化は精力的に調べられてきたが、一度惹起された免疫応答の収束メカニズムは未解明な部分が多い。

そこで、炎症の収束段階に寄与する遺伝子を同定するために、回復期の肺を用いてマイクロアレイを行った。解析の結果、回復期の肺で発現上昇している遺伝子の中で TIGIT (T cell Immunoglobulin ITIM domain) を見出した。

TIGIT は主に活性化している T 細胞や NK 細胞に発現している抑制型レセプターで、細胞増殖や炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られている。また、TIGIT は樹状細胞に発現している PVR (Polio virus receptor) を介して、樹状細胞の IL-10 産生を亢進することが報告されている。

まずインフルエンザウイルス感染における TIGIT 発現細胞の同定と動態解析を行った。フローサイトメトリーを用いた解析の結果、感染 6 日目から 15 日目にかけての CD4⁺、CD8⁺T 細胞において TIGIT が発現していることが確認できた。また凍結切片を用いた免疫染色の結果、感染 15 日目において細胞の集簇が見られる領域にて TIGIT 陽性細胞が観察された。

次にインフルエンザウイルス感染における TIGIT の機能解析を行うために、TIGIT 欠損マウスを用いて感染実験を行った。インフルエンザウイルス感染後の生残率及び体重変化を野生型マウスと比較したところ、有意差は得られなかった。また、感染 7 日後に気管支肺胞洗浄液を回収し、IL-10 や IL-6、IL-17、IFN- γ などの産生量を定量したが、野生型マウスと有意差はなかつ

た。これらの結果から、TIGIT がインフルエンザウイルス感染時の炎症収束段階に必須な役割を担っている可能性が低いと考えられる。炎症収束は生存に重要であるため冗長的に制御されており、一つの因子を欠損させても影響が出ないように補われていると考えられる。

【第三章】非開裂型 HA を基盤としたインフルエンザワクチンの開発

インフルエンザに対するワクチンには不活化ワクチンと弱毒生ワクチンがある。不活化ワクチンは安全性は高いが免疫誘導能に、弱毒生ワクチンは免疫誘導能は高いが安全性に改善の余地が残されている。そこで私は、両者の長所を併せ持つ新しいワクチンとして、インフルエンザウイルスの膜融合能を欠損させた非増殖型インフルエンザウイルス（非開裂型 HA ウイルス）を基にしたワクチン開発を行った。

培養細胞における増殖試験や免疫染色により、非開裂型 HA ウイルスが通常の細胞では増殖できないことが確認した後、マウスを用いて免疫原性を検証した。非開裂型 HA ウイルスをマウスに経鼻投与したところ、気道粘膜からウイルス特異的 IgA 及び IgG が、血清からはウイルス特異的 IgG が検出された。またテトラマーアッセイの結果、非開裂型 HA ウイルスを投与したマウスの肺にて、ウイルス特異的な細胞傷害性 T 細胞が集簇していることが明らかとなった。これらの免疫応答は、ホルマリン不活化ウイルスを投与したコントロール群からはほとんど検出されなかった。

最後に非開裂型 HA ウイルスの感染防御能について検証した。非開裂型 HA ウイルスを経鼻投与したマウスに致死量のインフルエンザウイルスを感染させたところ、1 回及び 2 回投与群においては体重減少が認められたが、3 回投与群では全く体重減少が認められず全てのマウスが生残した。以上の結果より、非開裂型 HA ウイルスは気道粘膜に特異的な免疫を誘導できる、高い免疫誘導能及び感染防御能を有するワクチンであることが示された。

【第四章】非増殖型インフルエンザウイルスを基盤とした二価ワクチンの開発

肺炎球菌は市中肺炎の主な原因細菌である。また、インフルエンザ罹患後に重篤な細菌性肺炎を引き起こすことから公衆衛生上重要視されている。そこで、第三章で得られた結果を応用し、インフルエンザ及び肺炎球菌感染症の両方を防御できる二価ワクチンの作製を試みた。

肺炎球菌の抗原である Pneumococcal surface protein A (PspA) 抗原部位の遺伝子の両端に HA 遺伝子の効率的な粒子内取り込みに重要な塩基配列を付加し、リバースジェネティクス法により HA の代わりに PspA を発現するウイルス (HA-KO/PspA ウイルス) を作製した。免疫染色の結果、HA-KO/PspA ウイルス感染細胞内で PspA が発現していることが確認できた。マウスを用いて抗原特異的抗体誘導能を調べたところ、HA-KO/PspA ウイルスを 2 回経鼻投与したマウスの気道粘膜及び血清から、インフルエンザウイルス及び PspA 特異的な抗体が検出された。

最後に、HA-KO/PspA ウイルスの感染防御能を検証した。HA-KO/PspA ウイルスを 2 回経鼻投与したマウスに致死量のインフルエンザウイルスあるいは肺炎球菌を感染させたところ、全てのマウスが生残し、さらに鼻腔における肺炎球菌の定着も抑制できることがわかった。以上の結果より、非増殖型インフルエンザウイルスを基にした HA-KO/PspA ウイルスは、インフルエンザだけでなく肺炎球菌感染症も防御しうる二価ワクチンであることが示された。この方法は他の呼吸器感染症にも応用することができ、非増殖型ウイルスを基盤とした多価ワクチン製造のプラッ

トフォームになる可能性が示された。

以上のように、感染初期の動態解析や宿主応答解析、新規ワクチン開発などを行ってきた。これらの研究成果はインフルエンザをコントロールするための新しい治療・予防法の確立に役立つと期待される。