

平成 31 年 3 月 1 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 農学 555

氏 名 浦 隆太

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： New Haven（国名：アメリカ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
ジカウイルス感染・伝播を促進するネッタイシマカ唾液腺分泌蛋白質の同定と機能解析
3. 派遣期間：平成 29 年 7 月 6 日 ～ 平成 31 年 2 月 10 日
4. 受入機関名及び部局名
イエール大学医学部内科学部門感染症分野

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究の背景及び目的】

ジカウイルスはフラビウイルス属に属し、発熱、頭痛、眼球結膜充血や関節痛といった症状を引き起こす蚊媒介性再興感染症の原因病原体である。近年では 2007 年以降、アフリカ、アメリカ、アジアなど幅広い地域でアウトブレイクが発生し、特に 2015 年から 2016 年にかけてブラジルを中心とした中南米で流行が拡大した。また流行が報告されている地域では、自己免疫疾患やギランバレー症候群、新生児の小頭症などの症例が増加し、ジカウイルス感染との関連性が強く疑われている。しかし、ジカウイルスに対する基礎および臨床研究は十分とは言えず、治療薬や予防法も未だ確立されていない。

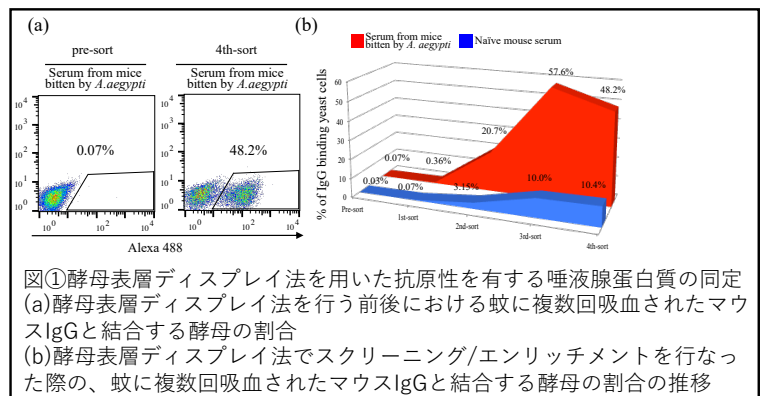
ジカウイルスは主に、熱帯および亜熱帯地域に生息しているネッタイシマカに媒介される。2016 年のアウトブレイク以降、ジカウイルスのネッタイシマカ体内でのウイルス動態や宿主体内での病原性発現機構については多く報告されてきたが、伝播機構についてはほとんど報告されていない。

蚊は、雌が卵を成熟させるための養分を得るために吸血する。吸血時、蚊は吸血対象の皮下に唾液を注入する。この唾液には、麻酔作用や血管透過性作用、血液抗凝固作用、抗菌作用、抗炎症作用等の機能を有する蛋白質が含まれており、効率の良い吸血に一役買っている。一方、ジカウイルスは唾液成分を産生・分泌する蚊の唾液腺で増殖し、吸血時に蚊の唾液と共に皮下に注入されることで、吸血された宿主へと伝播する。節足動物媒介性感染症は、媒介節足動物のコントロールが有効な対策法の 1 つである。これまでに蚊の唾液腺分泌物がジカウイルスと同じフラビウイルス属の西ナイルウイルスやデングウイルスの感染・伝播効率を増強することが報告されている(Cox et al. JVI 2012, Conway et al. JVI 2014) もの、ジカウイルスにおいて蚊の唾液腺分泌物が与える影響は不明である。そこで、蚊の唾液腺分泌蛋白質に着目し、唾液腺分泌蛋白質がジカウイルスの蚊-哺乳類間伝播に与える影響の評価を行った。

【結果】

① AgBR1 蛋白質の同定

本研究では酵母表層ディスプレイ法を用いて、抗原性を有するネッタイシマカの唾液腺蛋白質を 5 種類同定した(図 1)。5 種類の蛋白質のうち、哺乳類の蛋白質に相同性をもつ蛋白質は 1 種類のみであった。本研究ではその唾液腺蛋白質 Bacteria responsive protein 1(AgBR1)に着目して研究を行なった。蚊が宿主を吸血した際に、唾液腺内で AgBR1 蛋白質の発現が上昇することは報告されていたものの、ウイルス感染との関与は全く不明であった。



図①酵母表層ディスプレイ法を用いた抗原性を有する唾液腺蛋白質の同定
(a)酵母表層ディスプレイ法を行う前後における蚊に複数回吸血されたマウスIgGと結合する酵母の割合
(b)酵母表層ディスプレイ法でスクリーニング/エンリッチメントを行なった際の、蚊に複数回吸血されたマウスIgGと結合する酵母の割合の推移

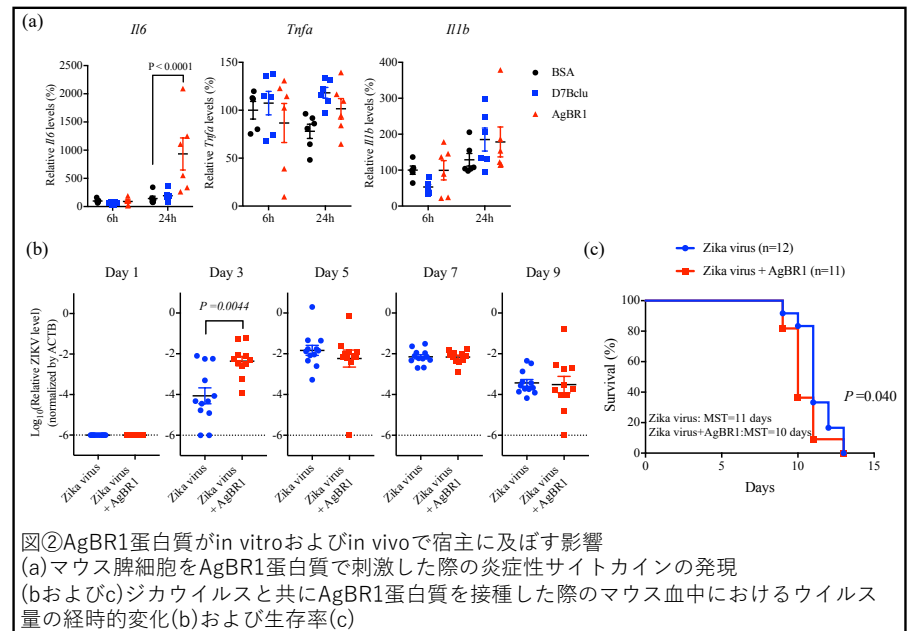
② AgBR1 蛋白質はジカウイルスの病原性発現を増強する

AgBR1 蛋白質が宿主応答に影響を与える可能性について検討するために、昆虫細胞で精製した AgBR1 蛋白質でマウス脾細胞を刺激し、代表的な炎症性サイトカインである *Il1b*、*Il6* および *Tnfa* の発現を調べた。その結果、興味深いことに AgBR1 蛋白質が *Il6* の発現を上昇させることが明らかとなった(図 2a)。IL-6 は血管透過性を上昇させ、フラビウイルス感染増強において非常に重要な宿主因子である。そこで、AgBR1 蛋白質とジカウイルスを共にマウスに接種し、ジカウイルスの病態に違いが出るか検討を行った。その結果、ジカウイルスを AgBR1 蛋白質と共に接種した群では、ジカウイルスのみを接種した群と比較すると、感染初期(感染 3 日後)にウイルスが有意に多く血中で検出された(図 2b)。また共接種群ではマウスの生存も有意に増悪していた(図 2c)。これらの結果から AgBR1 蛋白質がジカウイルスの病原性発現に

影響を与えることが明らかになった。

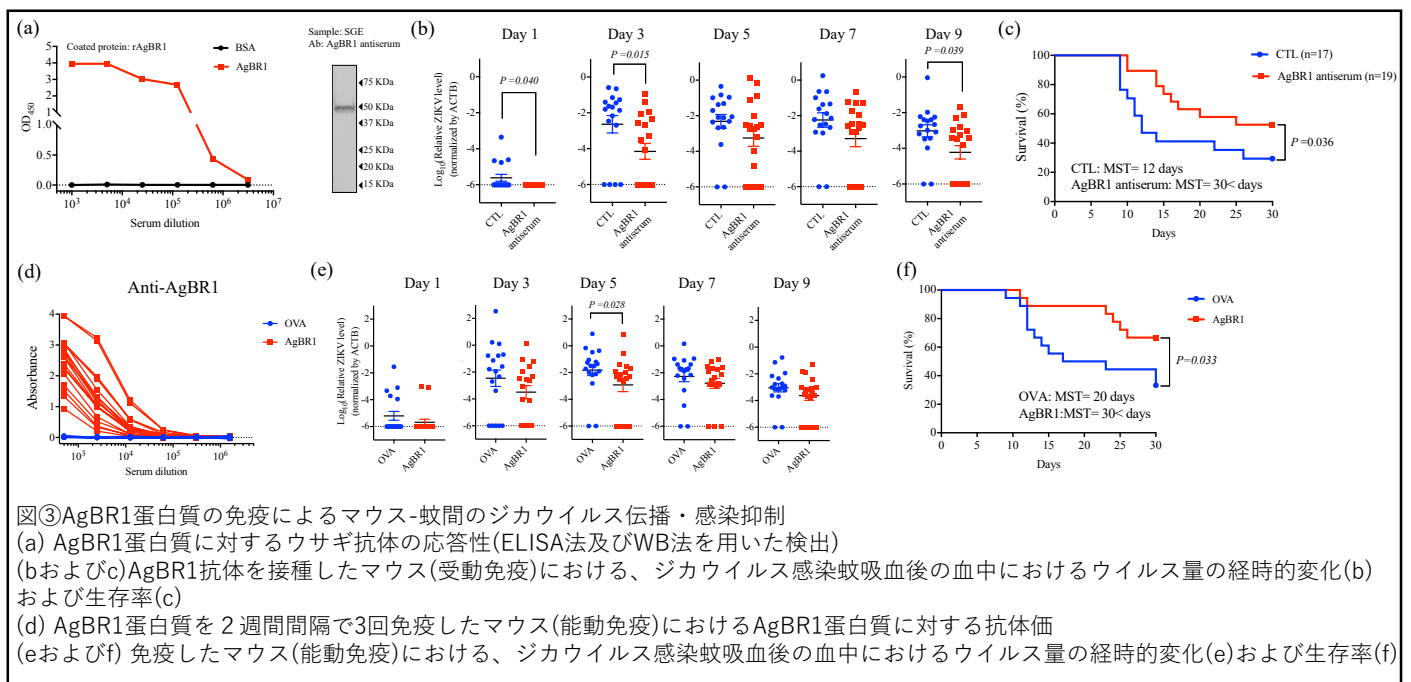
③ AgBR1 蛋白質による免疫によって、ジカウイルスの蚊からマウスへの伝播・感染が抑制される

AgBR1 蛋白質がジカウイルスの病原性発現の増強に寄与していることから、AgBR1 蛋白質の阻害がジカウイルスの伝播・感染に影響を与えるか検討を行った。



AgBR1 蛋白質に対するウサギ抗体を作製し、作製した抗体が精製蛋白質および唾液腺中のナイーブな AgBR1 蛋白質を認識することを確認した(図 3a)。その後、我々が確立した哺乳類-蚊間伝播モデル(*Uraki et al. PLOS. Negl. Trop. Dis 2018*)を用いて、AgBR1 蛋白質に対する抗体投与が蚊からマウスへのウイルス伝播効率や感染後の生存率に影響を与えるか検討した。

ジカウイルスに感染した蚊に、抗体を事前投与したマウスを吸血させ、吸血後のマウス血中のウイルス量やマウス生存率を調べた。抗 AgBR1 抗体を投与したマウスは対照群と比較して、血中ウイルス量が有意に抑制されており、さらに生存率も有意に改善した(図 3b-c)。また、上記で述べた受動免疫の場合だけでなく、精製した AgBR1 蛋白質で免疫(能動免疫)した場合(図 3d)も同様に、免疫群では対照群と比較して、血中ウイルス量が有意に抑制されており、さらに生存率も有意に改善した(図 3e-f)。これらの結果から、AgBR1 蛋白質による免疫によって、ジカウイルスの蚊からマウスへの伝播・感染が抑制されることが明らかとなった。



④ AgBR1 蛋白質による免疫によって、ジカウイルスに感染した蚊による刺傷後の好中球集簇が抑制される

どのような機序で、AgBR1 蛋白質による免疫がジカウイルスの伝播・感染を抑制するのか検討を行った。

まず、ジカウイルスに感染した蚊に刺傷された皮膚の病理解析(HE 染色・Imaging mass

cytometry)を行った。対照群では、ジカウイルス感染蚊に吸血されて24時間後の皮膚において、好中球が非常に多く集簇していたのに対し、免疫群では好中球の集簇が少なく(図4a-b)、また病理スコアも有意に抑制されていた(図4c)。さらに、定量的に好中球の数を解析するために、皮膚組織をFACSに供したところ、病理解析と同様、免疫群では刺傷された皮膚において有意に好中球の集簇が抑制されていた(図4d-e)。

そこでさらにAgBR1蛋白質の好中球集簇への寄与を解析するために、唾液腺内で $Agbr1$ 遺伝子の発現を抑制したウイルス感染蚊に刺傷された皮膚における好中球の集簇について解析を行った。遺伝子抑制のために作製したdsRNAが蚊の体内で機能することをmRNA発現レベルと蛋白質発現レベルで確認後(図4f-g)、感染蚊に刺傷された皮膚における好中球の集簇の解析をFACSにて行った。その結果、対照群では、刺傷されていない部位と比較すると有意に好中球が集簇していたが、 $Agbr1$ 遺伝子の発現を抑制した群では有意な好中球の集簇は観察されなかった(図4h)。

以上の結果から、AgBR1蛋白質が好中球の集簇を誘導する唾液腺蛋白質の1つであると示唆された。

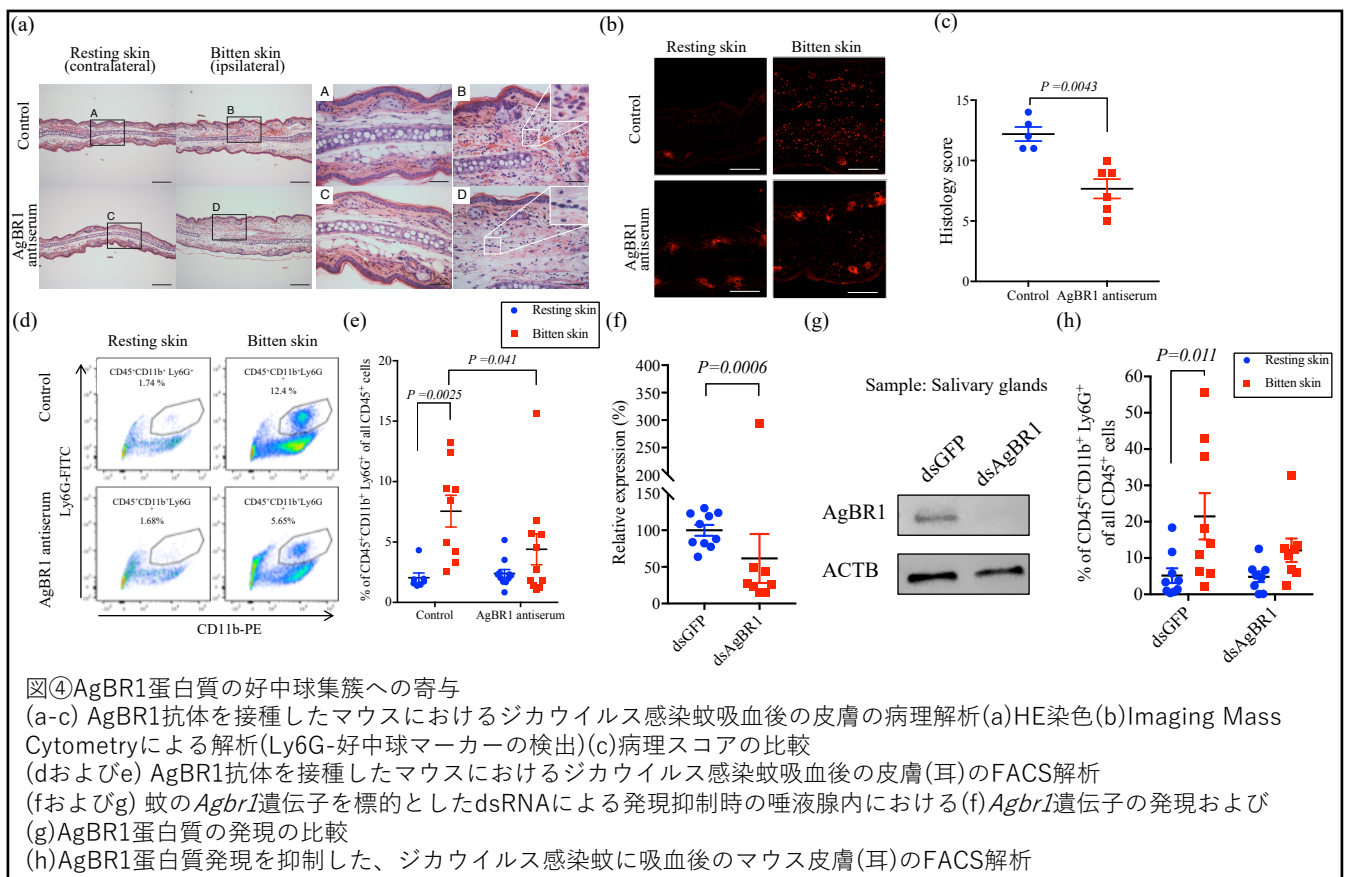


図4 AgBR1蛋白質の好中球集簇への寄与

(a-c) AgBR1抗体を接種したマウスにおけるジカウイルス感染蚊吸血後の皮膚の病理解析(a)HE染色(b)Imaging Mass Cytometryによる解析(Ly6G-好中球マーカーの検出)(c)病理スコアの比較

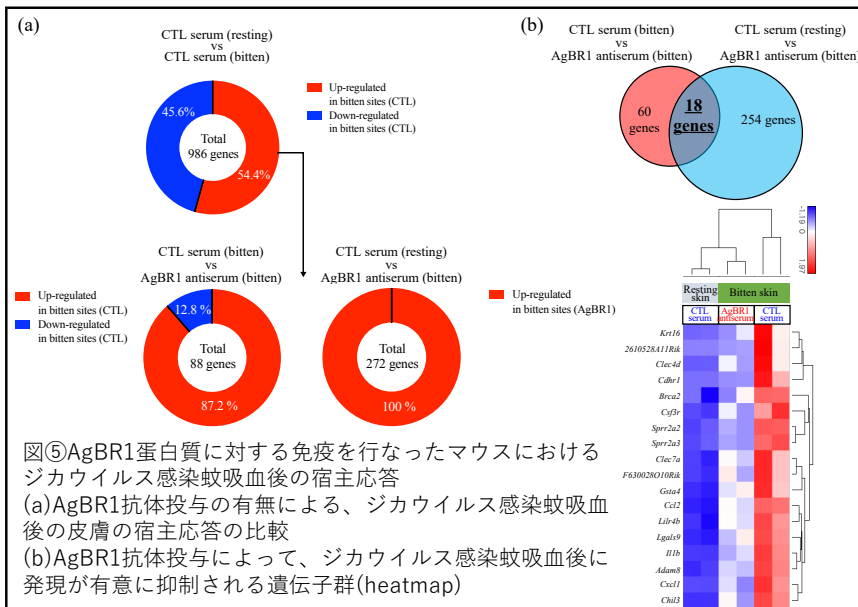
(dおよびe) AgBR1抗体を接種したマウスにおけるジカウイルス感染蚊吸血後の皮膚(耳)のFACS解析

(fおよびg) 蚊の $Agbr1$ 遺伝子を標的としたdsRNAによる発現抑制時の唾液腺内における(f) $Agbr1$ 遺伝子の発現および(g)AgBR1蛋白質の発現の比較

(h)AgBR1蛋白質発現を抑制した、ジカウイルス感染蚊に吸血後のマウス皮膚(耳)のFACS解析

⑤ AgBR1蛋白質による免疫によって、ジカウイルスに感染した蚊による刺傷後の免疫応答が抑制される

刺傷された皮膚における宿主応答をRNA-seq解析したところ、対照群と比較して、免疫群では、 $Il1b$ 、さらに、免疫細胞の遊走に関与する $Cxcl1$ や $Ccl2$ の発現が抑制されていた(図5)。これらの結果は、AgBR1抗体がジカウイルス感染蚊による吸血後の宿主応答や刺傷部位への免疫細胞の遊走を抑制することによって、ジカウイルスの伝播・感染の抑制に寄与していることを示唆している。



図⑤AgBR1蛋白質に対する免疫を行なったマウスにおける
ジカウイルス感染蚊吸血後の宿主応答
(a)AgBR1抗体投与の有無による、ジカウイルス感染蚊吸血
後の皮膚の宿主応答の比較
(b)AgBR1抗体投与によって、ジカウイルス感染蚊吸血後に
発現が有意に抑制される遺伝子群(heatmap)

【まとめ】

今回我々は抗原性を有する唾液腺蛋白質の1つとして AgBR1 蛋白質を同定した。AgBR1 蛋白質に対する免疫を有したマウスでは、蚊の吸血後の初期免疫応答を抑制することで、ジカウイルスの伝播・感染が抑制されることが明らかとなった。本研究の成果は、唾液腺蛋白質を標的としたジカウイルスを始めとした蚊が媒介するウイルス感染症へのワクチン作製に繋がることが期待される。