






学部長	所属長	本部長	副本部長	室長
				

令和4年 3月 28日

理事長 殿

学長 殿

令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症
対策支援プロジェクト研究報告書

標記の件に関しまして、別紙のとおり報告いたします。

また、本研究報告の内容は、近畿大学学術情報リポジトリ（KURepo）に公開する旨、承諾いたします。

1. カテゴリー	<input checked="" type="checkbox"/> 研究 <input type="checkbox"/> 開発・提案 /カテゴリーNo 17
2. 企画題目	腸内細菌因子による新型コロナウイルス粘膜免疫の増強

研究代表者

所 属： 医学部微生物学講座

職・氏名： 教授・角田 郁生



令和3年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	腸内細菌因子による新型コロナウイルス粘膜免疫の増強
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部微生物学講座・角田郁生 共同研究者：薬学部医薬薬学科/薬学研究科・中山隆志、理工学部生命科学科・川下理日人/中村優美和、医学部微生物学講座・佐藤文孝/スングル・カドカ/イジャーズ・エフマド、医学部免疫学講座・河原佐智代

1. 研究、開発・提案 目的及び内容

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) はプラス鎖 (+) 一本鎖 RNA をゲノムとして持つ RNA ウィルスで、呼吸器粘膜上皮に感染することで肺炎をきたす。SARS-CoV-2 の感染予防を目的にワクチンが開発されたが、既存のワクチンは皮下・筋肉内投与であるため、血中には主に抗ウィルス IgG 抗体が誘導される。しかし、呼吸器・腸管などの粘膜部位における感染防御の主体は IgA 抗体であり、IgG 抗体ではない。それゆえに、呼吸器粘膜に抗ウィルス IgA 抗体を誘導するワクチンの開発が、より効果的な SARS-CoV-2 感染予防には望まれる。そこで本研究では、IgA 誘導の効率を高めるため、IgA 産生を安全かつ強力に増加させることができるアジュバント (腸内細菌由来因子) を使用することで、IgA 抗体の誘導効率の向上を目的とする。

また、SARS-CoV-2 は、呼吸器だけでなく中枢神経系 (central nervous system: CNS) にも感染したり、感染に伴いギランバレー症候群を誘導するなどの、神経系の病態により、重篤な転機となることも示唆されている。そこで本研究では、マウス CNS ウィルス感染モデルを用いて、IgA がウィルスの CNS 感染防御において果たす役割を解明する。方法としては、IgA 産生の増強を上記のアジュバントを用いて行い、IgA の欠失を IgA ノックアウトマウスを用いて行う。

2. 研究、開発・提案 経過及び成果

細菌由来の成分 (コレラトキシンなど) の中には、免疫反応を賦活する作用 (アジュバント効果) があることが示されてきたが、その強力な炎症誘導性や毒性から臨床応用には不適であった。これまで、細菌・真菌の菌体成分由来の中で、IgA 誘導因子として報告されているものにカードラン (curdlan) がある。そこで我々は、カードランをタイラーウィルス (TMEV) 感染マウスに投与することで、カードランが IgA 誘導ならびにウィルス感染防御に働くかを検証した。我々は、カードラン投与により CNS ウィルス感染による神経症状が軽減されることを見出した (図 1 A)。免疫グロブリンのサブクラス解析では、カードラン投与により IgA の増強作用はみられなかったが、IgG1 の産生が減少していた (図 1 B)。CNS の病理像の免疫染色解析では、カードラン投与により軸索変性の減少と、活性化マクロファージの抑制が認められた (図 1 C)。我々はカードランは IgA 誘導とは別の機構で CNS 内ウィルス病変の抑制に働くこと、さらに細菌・真菌感染が、その産生する因子により、CNS ウィルス感染を抑制する可能性があることを、論文発表した (Sato et al 2022)。

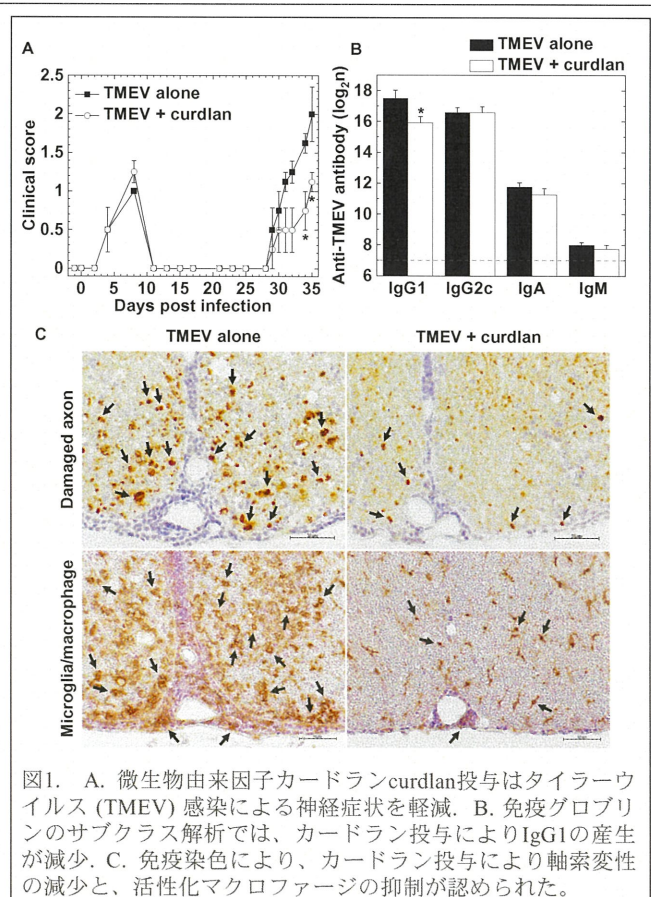
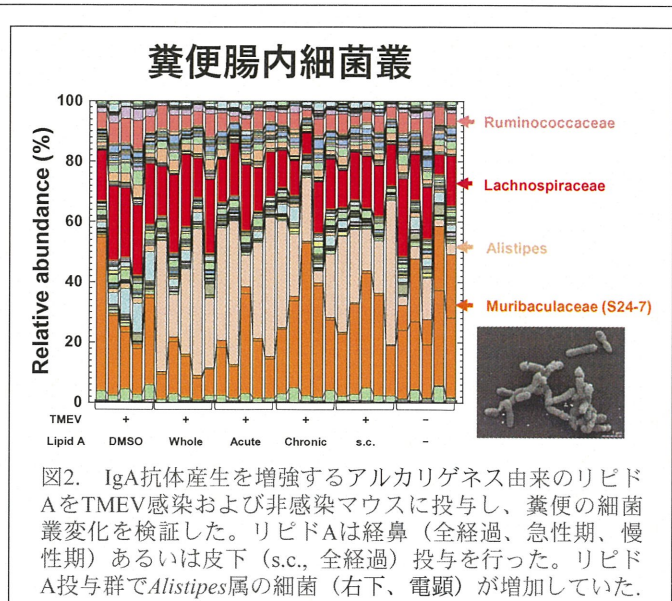


図1. A. 微生物由来因子カードランcurdlan投与はタイラーウィルス (TMEV) 感染による神経症状を軽減。B. 免疫グロブリンのサブクラス解析では、カードラン投与によりIgG1の産生が減少。C. 免疫染色により、カードラン投与により軸索変性の減少と、活性化マクロファージの抑制が認められた。

一方、近年、細菌リポ多糖の構成成分であるリポド A に基づいて、激しい炎症を誘導することなしに安全に使用できるアジュバントの開発が注目されている。腸内細菌の中でもアルカリゲネスは腸管リンパ組織内の共生菌であり、通常の腸管内腔に常在する細菌に比べユニークな性質をもち このリポド A を新規アジュバントとして用いマウスにワクチン接種を行うと、炎症反応を誘導することなしに、極めて安全に抗ウイルス IgA 抗体産生を亢進させることが報告された。そこで、本研究では、IgA 抗体産生を増強するアルカリゲネス由来のリポド A を TMEV 感染モデル動物に投与することで IgA 抗体の役割を検証した。リポド A を感染動物に投与を行ったところ、特に感染早期に投与した群で臨床症状の軽減をみた。臨床症状の軽減は腸内細菌叢の変化と関連しており、糞便で *Alistipes* 属の細菌が増加していた (図 2)。この変化は、投与経路 (経鼻、皮下) と投与期間 (急性期、慢性期、全経過) に関係なく認められた。一方、小腸では *Muribaculaceae* (*S24-7*) 科の細菌が、リポド A を全経過期間に投与したマウスで減少していたが、個々のマウスによって細菌叢に差が大きく、糞便に比べて一定の細菌叢の変化は認められなかった。



IgA 欠損の影響は、IgA ノックアウト (KO) マウス (Nagaishi 2021) で検討しているが、この KO マウスでは IgA が生来欠損しているため、成長の過程で IgM が欠損した IgA の機能を代償となる可能性がある。そこでウイルス感染前後にタモキシフェンを与えることで、IgA の重鎖 (Igha) をコンディショナルに KO させることが可能となる遺伝子改変マウス (Igha flox マウス) を世界ではじめて樹立した。これら二つの IgA KO マウス系統の樹立は生理的条件下の IgA の役割と、ウイルス感染・ワクチン接種時における IgA の役割を、さらに解明するためのツールとして有用となる。

新型コロナウイルス感染ではギラン・バレー症候群 (Guillan Barré syndrome, GBS) の発生が報告されている。GBS は抗糖脂質抗体が神経を攻撃することで発症するが、我々は、ウイルス感染・自己免疫マウスモデルを使用し、ELISA にて抗体価を測定し、抗糖脂質抗体の発現にはマウスの系統と免疫源が影響することを明らかにした (Nakamura et al., 2021)。

3. 本研究と関連した今後の研究、開発・提案 計画

本研究で、感染早期のリポド A 投与が腸内細菌叢の変化を誘導し、ウイルス感染症状を軽減した。このことは、リポド A をウイルス感染前に予防的に投与すれば、より効果的にウイルス感染あるいは症状の重症化の予防につながる可能性を示唆する。現在、リポド A を感染の 2 週間前より予防的にマウスに投与し、効果を検討している。今後、データ解析を行い論文投稿の予定である。

また、IgA 誘導実験では、IgA は血中や気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) よりも鼻腔洗浄液で高感度に検出された。また、鼻腔洗浄液サンプルの IgA 定量には血液の混入を避けることが鍵であることを明らかにした。我々は、サンプルへの血液混入を防止するプロトコルを樹立したので、この論文投稿を行う予定である。

IgA の役割を検証するために、IgA を欠損している IgA ノックアウト (KO) マウスを、ウイルス感染抵抗性の C57BL/6 マウス系統と、感受性の SJL/J マウスの系統の遺伝背景で作成した。ウイルス感染実験に必要なマウスを両系統で繁殖中である。マウスの繁殖後に感染実験を行う。二つの異なる系統のマウスで結果を比較し論文投稿を行う。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
第 68 回日本ウイルス学会 学術集会	Sato F, Omura S, Park A-M, Khadka S, Nakamura Y, Katsuki A, Nishio K, Gavins FNE, Tsunoda I. Distinct bacteria in the gut associate with IgA levels in the central nervous system in picornavirus-induced acute and chronic	2021 年 11 月 16 日

	myelitis models. (口頭)	
近畿大学医学部微生物学 講座ブログ	第 68 回日本ウイルス学会学術集会 公表, https://tsunodalaboratory.blog.fc2.com/blog-entry-423.html (オンライン)	2021 年 11 月 24 日
第 44 回日本分子生物学 会	Nakamura Y, Park A-M, Sato F, Kuwahara M, Khadka S, Omura S, Ahmad I, Kusunoki S, <u>Tsunoda I.</u> Anti-glycolipid antibodies are associated with clinical courses of four autoimmune and viral models for multiple sclerosis. (ポスター)	2022 年 12 月 2 日
第 50 回日本免疫学会	Sato F, Omura S, Park A-M, Khadka S, Nishio N, Nakamura Y, Katsuki A, Nishio K, Gavins FNE, <u>Tsunoda I.</u> Potential roles of IgA in the central nervous system in a viral model of multiple sclerosis. (口頭)	2021 年 12 月 8 日
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	Sato F, Nakamura Y, Katsuki A, Khadka S, Ahmad I, Omura S, Martinez NE, <u>Tsunoda I.</u> Curdlan, a microbial β -glucan, has contrasting effects on autoimmune and viral models of multiple sclerosis. (雑誌)	2022 年 2 月 7 日

5. 研究、開発・提案 課題の成果発表等

1. Sato F, Nakamura Y, Katsuki A, Khadka S, Ahmad I, Omura S, Martinez NE, Tsunoda I. Curdlan, a microbial β -glucan, has contrasting effects on autoimmune and viral models of multiple sclerosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12, 805302, doi: 10.3389/fcimb.2022.805302.