

201009025A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

糖脂質抗原による免疫活性化を応用した呼吸器感染症に
対するワクチン開発に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

平成23年3月

研究代表者

金城 雄樹

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

糖脂質抗原による免疫活性化を応用した呼吸器感染症に
対するワクチン開発に関する研究

平成22年度 総括研究報告書

平成23年3月

研究代表者

金城 雄樹

(国立感染症研究所)

目 次

I. 糖脂質抗原による免疫活性化を応用した呼吸器感染症に対するワクチン 開発に関する研究	
総括研究報告書（平成22年度）	1
研究代表者：金城 雄樹（国立感染症研究所生物活性物質部）	
研究協力者：川上 和義（東北大学大学院医学系研究科）	

糖脂質抗原による免疫活性化を応用した呼吸器感染症に対する

ワクチン開発に関する研究

研究代表者 金城 雄樹 国立感染症研究所生物活性物質部 室長
研究協力者 川上 和義 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 肺炎球菌ワクチンの効果を増強する方法の確立を目指し、糖脂質抗原による肺炎球菌ワクチン（ニューモバックス®）の抗体産生増強効果について基礎的検討を行った。ニューモバックス®接種マウスに糖脂質抗原を投与すると、ワクチン単独投与と比較して、脾臓の辺縁帯B細胞の強い活性化が認められた。その結果と一致して、糖脂質投与マウスでは肺炎球菌多糖体抗原に対するIgMの産生増加を認めた。また、肺炎球菌ワクチンによる抗体産生へのNKT細胞の関与を明らかにするための基礎的検討も行った。ヒト末梢血由来のCD19⁺ B細胞の抗原受容体を抗IgM抗体で架橋刺激する際に、ヒトNKT細胞株と共培養したところ、IgGの産生増加が認められた。また、マウス骨髄由来樹状細胞を直接ニューモバックス®で刺激したところ濃度依存的なIL-12産生が観察された。以上の結果から、糖脂質抗原によるNKT細胞の活性化は、ニューモバックス®による抗体産生を増強させうると考えられた。また、糖脂質非存在下においても、肺炎球菌ワクチン投与による抗体産生にNKT細胞が深く関与し、その活性化には樹状細胞を含めた何らかの細胞から産生されるIL-12が関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

肺炎は高齢者の主要な死亡原因であり、高齢化社会を迎えたわが国ではその予防が重要な対策となる。肺炎球菌は成人肺炎の最も頻度の高い起炎菌であり、65歳以上の高齢者や慢性心肺疾患を有する患者では肺炎球菌ワクチンの接種が推奨されている。しかしながら、わが国のワクチン摂取率は欧米に比べて極めて低く、高齢者のわずか6.5%にとどま

っているのが現状である。その背景としては、肺炎球菌ワクチンの低い認知度や接種経費の問題、被接種者の副作用に対する不安などに加えて、本ワクチンの作用機序が必ずしも十分には解明されていないことや、臨床的有効性についてのわが国のエビデンスが十分に確立されていないことが重要な要因となっている。

現行の成人肺炎球菌ワクチンは23価の荚膜多糖体を含んだもので、胸腺非依

存性抗原であることから、産生される抗体のclass switchingやaffinity maturationが限定され、メモリー細胞が誘導されないことからブースター効果が期待できない。このような免疫学的特徴とも関連して、敗血症や髄膜炎など侵襲性感染症への予防効果はみられるものの、肺炎や中耳炎など粘膜領域感染症ではその臨床効果がエビデンスとして十分には確立されていない状況である。このように現行の成人用肺炎球菌ワクチンは、ワクチンとして完全とは言えず、アジュバントなどその効果を高めるための何らかの方策が望まれている。

我々はこれまでにマウスモデルにおいて、自然リンパ球のNatural killer T (NKT) 細胞が肺炎球菌感染防御に重要な役割を担うこと、NKT細胞を活性化する糖脂質抗原 α -galactosylceramide (α GalCer) 投与にて肺炎球菌感染に対する抵抗性が高まることを明らかにした。また、臨床研究により成人肺炎球菌ワクチン接種による抗体産生とNKT細胞との関連性を示唆する結果を得ている（論文作成中）。本研究ではこれらの知見を効果的なワクチンの開発に応用することを目標として、基礎的実験を通して、ワクチンによる抗体産生における糖脂質抗原による免疫活性化の効果の解析を行った。また、ワクチンによる抗体産生へのNKT細胞の関与について詳細な解析を行った。

B. 研究方法

1) マウス脾細胞の培養と糖脂質抗原によるB細胞の活性化の解析：
C57BL/6マウスの脾細胞 (1×10^6 /well) を α GalCer (100ng/ml) またはLPS (200ng/ml)

存在下に3日間培養し、CD19⁺B細胞のCD86、I-Ab (MHC class II)、CD40やCD69などの活性化マーカーの発現をフローサイトメーターで解析した。

2) 肺炎球菌ワクチン、糖脂質投与マウスの血中抗体価測定及びMZB細胞活性化の解析：

C57BL/6マウスにニューモバックス® 25 μ g (各血清型あたり)、 α GalCer 2 μ g を腹腔内投与した。投与4日後に脾臓の辺縁帯B細胞 (marginal zone B: MZB) の活性状態の解析を行った。また、投与7日後に血液を採取し、肺炎球菌血清3型の多糖体抗原に対するIgM産生を測定した。

3) ヒトB細胞及びヒトNKT細胞株：

健常成人の末梢血からFicoll-Paqueにより単核球 (PBMC) を採取し、磁気細胞分離装置 (Magnetic Cell Sorting : MACS) を用いてCD19⁺B細胞を精製した。CD4⁺またはCD4⁻CD8 α ⁻ヒトNKT細胞株は愛知県がんセンター研究所植村靖史博士から分与された。凍結保存されたこれらの細胞を、 α GalCerをパルスした放射線照射PBMCとIL-2で9日から12日間刺激することによって増殖させ、休止期に近い状態で回収してB細胞との実験に供した。

4) ヒトB細胞とNKT細胞の共培養：

ヒトB細胞を、CD4⁺またはCD4⁻CD8 α ⁻NKT細胞株の存在または非存在下に、F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgM抗体で刺激し、培養上清中のIgM、IgG濃度を測定した。成人肺炎球菌ワクチンは胸腺非依存性抗原であるため、そのB細胞刺激様式を再現するために、B細胞上の抗原受容体(膜

結合IgM)に抗IgM抗体を結合させ、さらにその架橋効率を高めるためにF(ab')₂抗ヤギIgG抗体を用いた。

5) マウス骨髄由来樹状細胞の作製及び肺炎球菌ワクチンによる刺激:

C57BL/6マウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、GM-CSF (20 ng/ml) と9日間培養することで樹状細胞 (BM-DCs) を作製した。BM-DCs (1×10⁵/ml) を各種濃度のニューモバックス®で24時間刺激し、その培養上清中のIL-12p40濃度をELISAにて測定した。

6) 統計解析:

2群間の比較はPaired student's-*t* testを用いて検定し、*P*<0.05を有意差有りと判定した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験では、国立感染症研究所または東北大学の動物実験専門委員会からの承認を得ている。

C. 研究結果

1) NKT細胞が認識する肺炎球菌糖脂質抗原の同定:

これまでにNKT細胞は合成化合物のαGalCerを認識することが明らかになっているものの、肺炎球菌由来の糖脂質を認識するかどうか分かっていなかった。我々は、肺炎球菌糖脂質がマウス及びヒトのNKT細胞の認識抗原であることを明らかにした (論文投稿中)。肺炎球菌糖脂質はグリセロール型の糖脂質であり、スフィンゴ型の糖脂質であるαGalCerとは異なる種類の糖脂質である (図1、2)。しかし、どちらも単糖型の糖脂質であり、糖と脂質の結合様式はα

アノマー結合である。このことより、NKT細胞は構造が極めて類似したこれらの糖脂質を認識することが明らかになった。

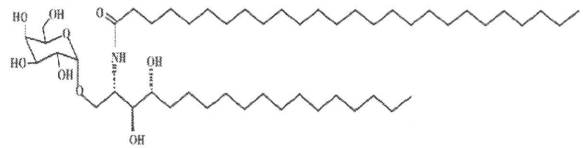


図1. αGalCerの構造

αGalCerはNKT細胞の認識抗原として最初に同定された合成糖脂質である。αGalCerは単糖型のスフィンゴ糖脂質であり、糖と脂質がαアノマー結合しているという特徴がある。

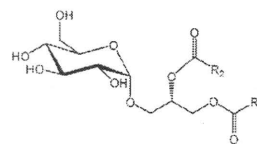


図2. 肺炎球菌糖脂質抗原の構造

肺炎球菌糖脂質抗原はグリセロール型の糖脂質である。αGalCerと同様に、単糖型の糖脂質であり、糖と脂質がαアノマー結合している。

αGalCerがガラクトースを有するのに対し、肺炎球菌糖脂質はグルコースを有している。

構造解析の結果から、肺炎球菌糖脂質は、脂肪酸として主にパルミチン酸 (C16:0) とバクセン酸 (C18:1) を有していることが分かった。バクセン酸は、哺乳類ではほとんど検出されず、NKT細胞が肺炎球菌糖脂質を外来性の抗原として認識する際の特徴となると考えられた。

肺炎球菌糖脂質とαGalCerのNKT細胞刺激活性を比較したところ、α-GalCerの方が強い活性を示した。そのため、まずα-GalCerを肺炎球菌ワクチンのアジュバントとして用いて解析を行った。

2) 糖脂質抗原によるNKT細胞活性化を介したマウスB細胞の活性化 :

マウス脾細胞を3日間、 α GalCerの存在下または非存在下に培養し、B細胞が活性化されるかどうか調べた。その結果、 α GalCer存在下では、B細胞表面のCD86やMHC class IIなどの発現が高くなり、B細胞が活性化していることが分かった(図3)。陽性コントロールとして用いたLPSと同等以上の効果を認めた。また、 α GalCer 添加により B細胞表面のCD40及びCD69の発現増加も認めた。そのことから、糖脂質抗原によるNKT細胞の活性化がB細胞の活性化を誘導すると考えられた。

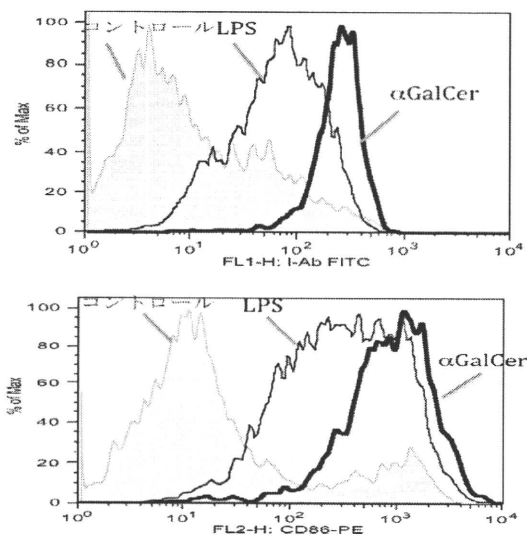


図3. 糖脂質抗原によるB細胞の活性化誘導

マウス脾細胞を α GalCerまたはLPS存在下に培養した。 α GalCerはB細胞のMHC class II分子 I-Ab (上) 及びCD86 (下) の発現増加を誘導した。

次に、肺炎球菌ワクチン(ニューモバックス®)接種マウスにおいて、 α GalCer投与が、多糖体に対する抗体産生に重要な役割を担う脾臓の辺縁帯B細胞(marginal zone B: MZB)細胞の活性化を増強するか調べた。MZB細胞は通常、 $CD21^{high}CD23^{low}$ の細胞として検出され

る。しかし、ニューモバックス®投与マウスでは、CD21の発現が低下した。特に α GalCerを併用投与したマウスでは、それが顕著であり、CD21の発現によるMZB細胞の同定はできないことが分かった。しかし、MZB細胞は糖脂質抗原提示分子であるCD1dの発現レベルが他の細胞よりも高く、ニューモバックス®や α GalCer投与においてもCD1d発現は低下しないことが分かった(図4)。

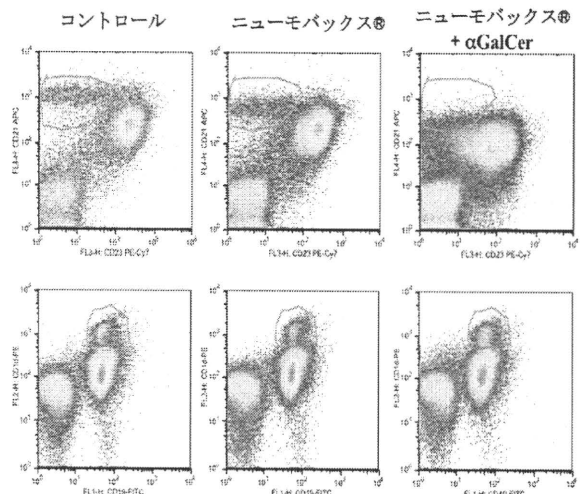


図4. ワクチン、糖脂質投与マウスにおけるMZB細胞の同定

マウスにニューモバックス®及び α GalCerを投与し、脾臓のMZB細胞のCD21(上図 縦軸)及びCD23(上図 横軸)発現を調べた。また、CD1d(下図 縦軸)及びCD19(下図 横軸)発現を調べた。

そこで、CD1dの発現を用いてMZB細胞を同定し、CD86やMHC class IIなどの発現を調べたところ、ニューモバックス®単独投与と比較して、 α GalCer投与にてこれらの分子の発現が高くなることが分かった。また、 α GalCer投与によりMZB細胞表面のCD40及びCD69の発現増加も認めた。この結果より、 α GalCer

投与によりMZB細胞が強く活性化されることが分かった (図5)。

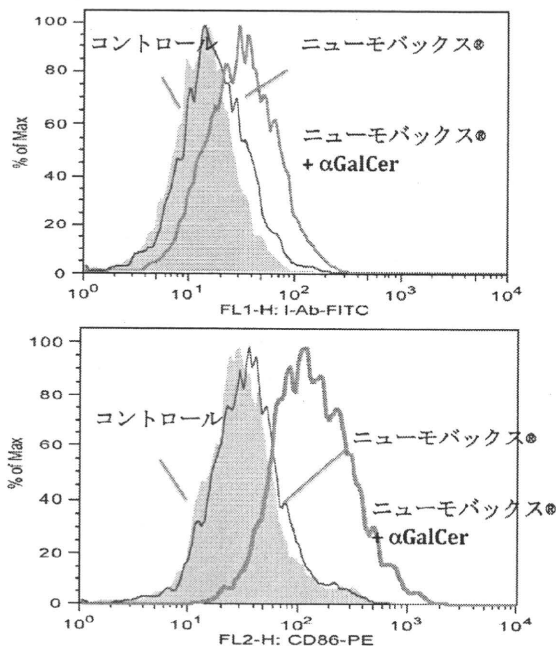


図5. 糖脂質抗原によるMZB細胞の活性化誘導
マウスにニューモバックス®及びαGalCerを投与し、脾臓のMZB細胞のMHC class II分子 I-Ab (上) 及びCD86 (下) の発現を調べた。αGalCerはMZB細胞のI-Ab及びCD86の発現増加を誘導した。

3) 糖脂質投与による抗体産生増強：
αGalCer投与によるMZB細胞の活性化が、ニューモバックス®による肺炎球菌莢膜多糖体に対する抗体産生に影響を及ぼすかどうか検討した。ニューモバックス®投与により、肺炎球菌莢膜多糖体に対するIgM産生を認めた。そのIgM産生はαGalCer投与により増加を認めた。その抗体産生増強効果は、αGalCerはニューモバックス®投与2日後に投与した場合に認められた (図6)。

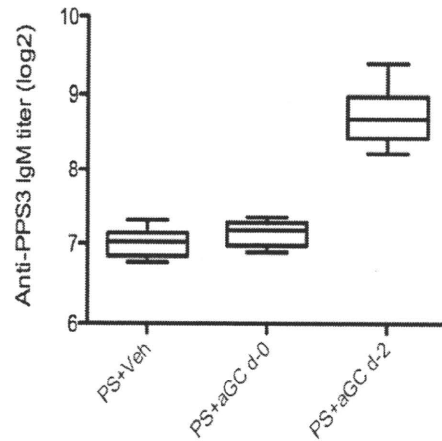


図6. 糖脂質抗原による抗体産生増強

マウスにニューモバックス® (PS) 及びαGalCer (aGC) を投与し、1週間後の血中の肺炎球菌莢膜多糖抗原 (血清3型) に対するIgMの抗体価を測定した。ニューモバックス®接種2日後にαGalCerを投与した場合 (PS+aGC d-2) に、IgMの抗体価上昇を認めた。

4) ヒトNKT細胞による抗体産生の増強：
NKT細胞によるB細胞からの抗体産生に与える影響を調べるために、B細胞抗原受容体を架橋したCD19⁺B細胞をCD4⁺CD8α⁻ヒトNKT細胞株の存在または非存在下で培養し、IgM、IgG産生量を測定した。抗IgM抗体及び架橋抗体によるB細胞刺激では、IgM産生量が増加したが、IgG産生量は無刺激と差は認められなかった (図7)。NKT細胞株の存在下ではB細胞からのIgM抗体量は有意に減少した。一方、IgG抗体量はNKT細胞株の存在下で増加した (図7)。CD4⁺NKT細胞株でも同じ効果が認められた。

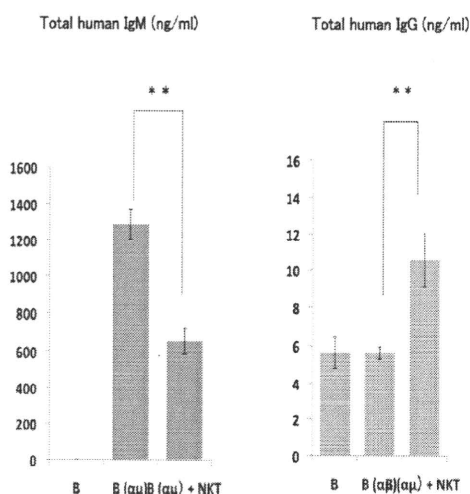


図7. ヒトNKT細胞によるヒトB細胞の抗体産生増強

ヒトB細胞をCD4⁺CD8α⁻NKT細胞株の存在または非存在下で抗μ抗体で架橋刺激し、産生されるIgM、IgGを測定した。B(αμ)：抗μ抗体で架橋刺激したB細胞

5) ニューモバックス®によるマウス樹状細胞からのIL-12産生：

これまでに我々は、遺伝的にNKT細胞を欠損したマウスを用いた実験において、ニューモバックス®による抗体産生にNKT細胞が必要なことを明らかにしてきた（未発表データ）。一方、成人肺炎球菌ワクチンによるNKT細胞の活性化には樹状細胞など何らかの細胞からのIL-12産生が重要なことが予想されるため、ニューモバックス®がマウスBM-DCsに対して直接的な刺激効果を示すかどうかについて検討を行った。図8に示すように、ニューモバックス®の直接刺激によりBM-DCから濃度依存的にIL-12p40産生が誘導された。

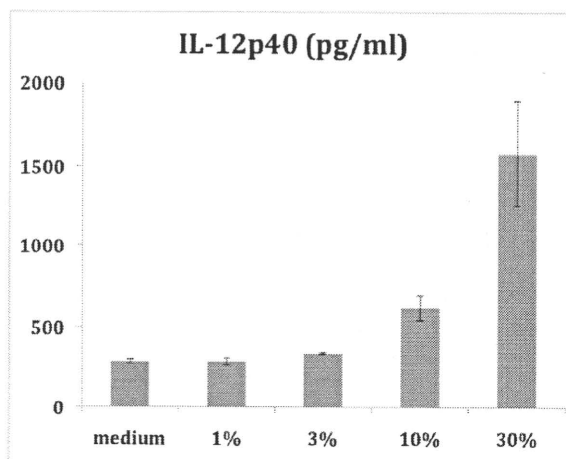


図8. 肺炎球菌ワクチンによる樹状細胞からのIL-12産生誘導

マウス骨髄由来樹状細胞を各種濃度のニューモバックス®で刺激し、産生されるIL-12p40を測定した。

D. 考察

これまでの研究から、成人肺炎球菌ワクチンによる抗体産生にNKT細胞が何らかの形で関与する可能性が浮かび上がってきている。近年の報告では、NKT細胞とMZB細胞やB1-B細胞との機能的相互連携の可能性が明らかにされつつある。MZB細胞やB1-B細胞も自然免疫リンパ球に属し、細菌の普遍的な抗原に対する抗体を極めて早期に産生分泌することで初期の感染防御に重要な役割を担うことが知られている。肺炎球菌が気道粘膜細胞に付着する際にアドヘジンとして重要なホスホリルコリンに対する抗体の産生にもB1-B細胞が深く関与している。これまでにNKT細胞が、成人肺炎球菌抗原に対する抗体産生において必須な細胞であること、そして特異的活性化剤であるαGalCerを投与することで肺炎球菌感染に対する抵抗性が高まることがマウスモデルを用いた研究

で明らかにされている。これらの知見からも、NKT細胞と成人肺炎球菌感染とが密接な関わりを有している可能性が強く推察される。

今年度の研究では、マウスにおいてNKT細胞の糖脂質抗原である α GalCer投与により、成人肺炎球菌ワクチンによる抗体産生誘導が増強するかどうかが解析を行った。その結果、 α GalCerの投与によりIgM産生が増強することが明らかになった。その効果は、肺炎球菌ワクチン投与2日後に糖脂質抗原を投与した場合に認められたが、同時投与では認められなかった。そのことから、糖脂質抗原投与のタイミングが重要であると考えられた。次年度には、糖脂質投与による抗体産生増強効果が肺炎球菌感染防御に有用であるかどうか解析を行う予定である。

また、糖脂質抗原非投与時の成人肺炎球菌ワクチンによる抗体産生とNKT細胞の関係についても解析を行った。その結果、NKT細胞がB細胞に直接作用することで、ワクチンと同様に抗原受容体を介したB細胞の活性化と抗体産生を促進することが明らかとなった。しかしながら、本研究で用いているNKT細胞株は静止期に近い状態で用いているものの、使用直前までその強力な活性化剤である α GalCerで刺激しているためにある程度活性化されている可能性は否定できない。その影響からか、B細胞との培養にNKT細胞の強力な活性化剤である α GalCerを添加しても、抗体産生への明確な増強効果は認められなかった（未発表データ）。その上、実験によっては、抗IgM抗体によるB細胞の一次刺激がない状態でもNKT細胞を加えるだけで十分量の抗体が産生される場合があり（未発表データ）、これは活性化されたNKT細胞上のCD40L（CD154）とB細胞上のCD40との相互作用が関係しているものと推測される。そのため、今後は完全な

静止期状態にあるNKT細胞を用いることでCD40Lの発現を減少させるか、B細胞との培養系に抗CD40L抗体を添加するなどの工夫が必要と思われ次年度への課題としたい。

成人肺炎球菌ワクチンを接種する際に、NKT細胞が活性化されB細胞からの抗体産生を増強するとの考えは魅力的ではあるが、果たしてワクチンの中にNKT細胞を活性化するような成分があるのだろうか。NKT細胞の活性化に関わるのは糖脂質抗原であることが分かっている。ニューモバックス®の成分は肺炎球菌由来の莢膜多糖と安定化剤などと思われ、そのような糖脂質成分が存在する可能性は低いと考えられる。一方、ニューモバックス®に糖脂質抗原が存在しない場合でも、何らかの成分が樹状細胞などを刺激することでIL-12やIL-18を産生させ、既に内因性に存在する何らかの糖脂質抗原で弱く活性化されたNKT細胞をさらに強く刺激する可能性が考えられる。その意味でも、今回の検討で、成人肺炎球菌ワクチンが直接的に樹状細胞を刺激してIL-12産生を誘導できたことは重要な意味をもつ。今後は、成人肺炎球菌ワクチンによるNKT細胞の活性化機序についても明らかにしていく必要があると考えられる。

E. 結論

本研究を通して、マウスにおいて、NKT細胞の糖脂質抗原の併用により、成人肺炎球菌ワクチンによる抗体産生を増強させることが明らかになった。また、ヒトのNKT細胞が直接B細胞に作用して胸腺非依存性抗原刺激による抗体産生誘導を増強させることが明らかとなった。さらに、マウスの系ながら成人肺炎球菌ワクチンが直接樹状細胞を活性化できることも分かり、実際のワクチン接種症例でもNKT細胞が深く関与する

という我々の当初の仮説を強く支持こととなった。このように、NKT細胞の糖脂質抗原をアジュバントとして用いることで、成人肺炎球菌ワクチンの抗体産生誘導効果をさらに増強できる可能性が高まったものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Miyasaka T, Uchiyama B, Kunishima H, Yamamoto N, Hirakata Y, Ishii K, Oishi K, Nakayama T, Kaku M, Kawakami K:
Possible role for natural killer T cells in the humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination, 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 2010.

2. Kinjo Y, Illarionov P, Pei B, Vela JL, Giradi E, Li X, Li Y, Kawakami K, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M.
Invariant NKT cells detect pathogenic Gram-positive bacteria, 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 2010.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

