

201210009B

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

平成 22-24 年度 総合研究報告書

平成 25 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 22-24 年度 総合研究報告書

平成 25 年 3 月

研究代表者

金城 雄樹

(国立感染症研究所)

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

研究者名簿(平成 22-24 年度)

氏 名	所 属	職 名
金城 雄樹	国立感染症研究所 生物活性物質部	室 長
川上 和義	東北大学大学院医学系研究科	教授
大石 和徳	国立感染症研究所 感染症情報センター	センター長
朴 貞玉	大阪大学微生物病研究所	特任研究員
大川原 明子	国立感染症研究所 生物活性物質部	主任研究官
金子 幸弘	国立感染症研究所 生物活性物質部	主任研究官

目 次

I. 総合研究報告書	1
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)	
II. 研究成果に関する刊行一覧表	17

I. 総合研究報告書(平成 22-24 年度)

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

研究要旨 本研究では、新規の肺炎球菌ワクチン開発および肺炎球菌多糖抗原ワクチンの認識機構の解明を目指した基礎的検討を行った。私達は、マウスの系で、新規の肺炎球菌ワクチンが有効であることを示唆する結果を得た。マウスに肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原の新規併用ワクチンを接種することにより、蛋白抗原に対する IgG 抗体価が上昇し、肺炎球菌の排除が促進され、高い生存率をもたらした。また、肺炎球菌多糖抗原ワクチンによる抗体産生機序を解析し、肺炎球菌多糖ワクチン抗原の認識に Dectin-2 という分子が重要な役割を担うことを見出した。Dectin-2 を欠損したマウスでは、肺炎球菌多糖抗原ワクチンによる抗体産生の障害を認めたが、糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化により抗体産生が回復した。そのことより NKT 細胞が抗体産生に影響を与える可能性が示唆された。以上の結果から、糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化は、肺炎球菌ワクチンの効果を増強させるのに有用であることが示唆された。

研究協力者氏名、所属機関名及び職名

A. 研究目的

川上 和義 東北大学大学院医学系
研究科 教授

大石 和徳 国立感染症研究所 感染症
情報センター センター長

朴 貞玉 大阪大学微生物病研究所
特任研究員

大川原明子 国立感染症研究所生物活性
物質部 主任研究官

金子 幸弘 国立感染症研究所生物活性
物質部 主任研究官

肺炎は日本人の死因の第 3 位であり、特に高齢者においては主要な死亡原因であることから、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、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る。

現行の成人肺炎球菌ワクチンは 23 価の莢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、メモリー細胞が誘導されず、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いえ、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。また、より効果的な新規のワクチン開発も重要である。

我々はこれまでにマウスモデルにおいて、自然免疫に関与するリンパ球の 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。本研究では、NKT 細胞による肺炎球菌感染防御機構の解明と共に、これまでに得た知見を効果的な肺炎球菌ワクチンの開発に応用することを目標として、蛋白抗原と糖脂質抗原の併用ワクチンの肺炎球菌感染防御効果と抗体産生の解析を行った。また、肺炎球菌多糖ワクチン抗原の認識と抗体産生誘導機序の解明を目指し、Dectin-2 という分子の役割について詳細な解析を行った。

B. 研究方法

1) 肺炎球菌排除に及ぼす糖脂質抗原認識を阻害する抗体投与の影響：

C57BL/6 マウスに抗 CD1d 抗体またはアソタイプ抗体を 200 μ g ずつ、感染前日と感染直前に腹腔内投与した。肺炎球菌（血清 3 型）を気管内接種して感染させ、3 日後の肺内菌数を調べた。

2) 肺炎球菌糖脂質による NKT 細胞のサイトカイン産生の解析：

C57BL/6 マウスの骨髄由来の樹状細胞に肺炎球菌糖脂質をパルスし、C57BL/6 マウスに静脈内接種した。接種 14 時間後に肝臓や脾臓を摘出し、NKT 細胞 (α GalCer CD1d テトラマー陽性細胞) の細胞内サイトカイン染色を行った。

3) 肺炎球菌糖脂質によるヒト NKT 細胞の刺激：

ヒトの末梢血より採取し、樹立した NKT 細胞を樹状細胞と共に培養した。NKT 細胞が肺炎球菌糖脂質によって刺激されるかどうか調べるため、肺炎球菌より精製した糖脂質、合成糖脂質または陽性コントロールとしてのモデル抗原の α -galactosylceramide (α -GalCer) と共に培養し、上清中のサイトカインを測定した。

4) 肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原の併用ワクチンの投与スケジュールと感染防御効果の解析：

C57BL/6 マウスに肺炎球菌蛋白抗原 PspA と糖脂質抗原を経鼻接種した。蛋白抗原は 1 週間毎に 3 回接種したが、糖脂質抗原は初回のみ接種した。無処置群、蛋白抗原のみ接種した群、蛋白抗原と糖脂質併用接種群のマウスに肺炎球菌（血清 3 型）を気管内接種し、生存期間を調べた。

5) 血漿中の抗体価の測定：

前述の方法で免役したマウスより最終免疫の 1 週後に血漿を採取し、抗 PspA IgG 抗体、抗 IgG1 抗体、抗 IgG2b 抗体、

抗 IgG2c 抗体、及び抗 IgG3 抗体を ELISA にて測定した。

6) 蛋白抗原特異的 CD4T 細胞のサイトカイン産生 :

上記の方法で免役したマウスの脾臓から CD4T 細胞を精製し、蛋白抗原刺激に対するサイトカイン (IFN γ 及び IL-4) 産生を調べた。

7) 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 マウスまたは Dectin-2KO マウス (東京大学医科学研究所 岩倉洋一郎教授より供与) 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を作製した。樹状細胞 (1 \times 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、TNF- α 濃度を ELISA にて測定した。

8) 肺炎球菌多糖ワクチン接種による抗体産生の解析 :

C57BL/6 マウスまたは Dectin-2KO マウスの腹腔内に 23 価肺炎球菌ワクチン (PPV; Pneumovax® NP, MSD より購入し、生理食塩水にて 10 倍に薄めたもの) を接種し、2 週後に血清を採取した。血清中の血清型 3、6B、14、19F、23F 肺炎球菌莢膜多糖に対する特異 IgM、IgG 抗体量を ELISA 法にて測定した。

9) 肺炎球菌多糖ワクチンによる感染防御効果における Dectin-2 の役割の解析 :

PPV 接種後 14 日目に WT マウスまたは Dectin-2KO マウスから脾細胞を採取した。採取された脾細胞 (2 \times 10⁷ 個/mouse)

を経静脈的にレシピエント WT マウスに移植し、24 時間後、肺炎球菌 (血清 3 型、1.6 \times 10⁶ CFU/mouse) を気管内に接種し感染させた。

10) ヒト B 細胞の分離 :

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。

11) ヒト NKT 細胞株 :

CD4⁺ または CD4⁻CD8 α ⁻ (DN) 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。これらの細胞を糖脂質抗原 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。

12) ヒト B 細胞と NKT 細胞の共培養 :

ヒト B 細胞を CD4⁺ または DN 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。

13) 統計解析 :

2 群間の比較は student's-*t* test を用いて検定し、3 群間以上の有意差検定は ANOVA with a post hoc 検定を用いて行った。生存曲線は Kaplan-Meier log rank 検定を用いて行った。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及び倫理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および肺炎球菌感染防御における重要性：

NKT 細胞による糖脂質の認識が、肺炎球菌感染防御において重要な役割を担うかどうか明らかにするために、マウスに糖脂質の認識を阻害する抗体を投与し、肺内菌数を調べた。糖脂質の認識を阻害する抗 CD1d 抗体投与群では、コントロール群と比較して、肺内菌数の有意な増加を認めた (図 1)。NKT 細胞による糖脂質の認識が肺炎球菌の排除に重要な役割を担うことが明らかになった。

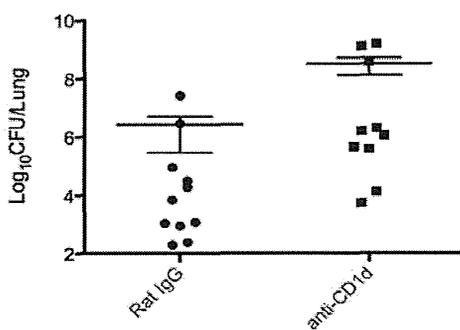


図 1. NKT 細胞による糖脂質の認識は肺炎球菌の排除に重要である

糖脂質の認識を阻害する抗 CD1d 抗体を投与した群では、対照群と比較して、肺炎球菌感染 3 日後の肺内菌数が有意に増加した。

NKT 細胞が肺炎球菌糖脂質を認識するかどうか明らかにするために、検討を行った。肺炎球菌から糖脂質を精製し、

構造解析を行った結果、肺炎球菌糖脂質は単糖型と二糖型のグリセロ糖脂質であり、糖としてグルコースまたは、グルコースとガラクトースを有することが分かった (図 2)。また、脂肪酸として主にパルミチン酸 C_{16:0} と哺乳類ではほとんど検出されないバクセン酸 C_{18:1} (n-7) を有していることが分かった。

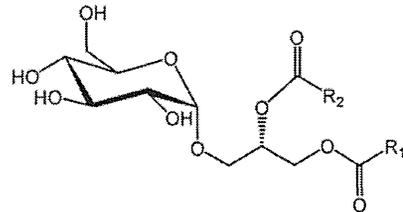


図 2. 肺炎球菌糖脂質抗原 (単糖型) の構造
肺炎球菌糖脂質抗原はグリセロール型の糖脂質で、糖と脂質が(アノマー結合している。哺乳類では検出することが稀なバクセン酸をもつことが特徴である。

精製した肺炎球菌糖脂質が NKT 細胞を活性化するか調べるため、糖脂質をパルスした樹状細胞をマウスに投与し、サイトカイン産生を細胞内サイトカイン染色で調べた。肺炎球菌糖脂質を投与したマウスでは、NKT 細胞の細胞内 IFN γ 及び IL-4 が陽性となり、肺炎球菌糖脂質は NKT 細胞のサイトカイン産生を誘導することが明らかになった (図 3)。また、単糖型の糖脂質の方が二糖型よりもサイトカイン産生誘導が高いことが分かった。

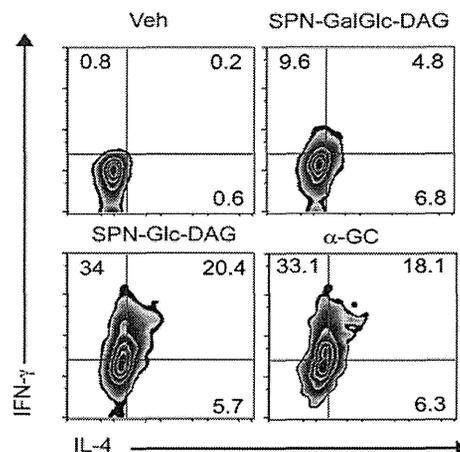


図 3. 肺炎球菌糖脂質抗原によるサイトカイン産生誘導

マウス骨髄由来の樹状細胞に、肺炎球菌糖脂質をパルスし、マウスに投与した。投与 14 時間後の肝臓の NKT 細胞の細胞内サイトカイン染色を行った。二糖型の肺炎球菌糖脂質抗原 (SPN-GalGlc-DAG) または単糖型の肺炎球菌糖脂質抗原 (SPN-Glc-DAG) 投与マウスでは、モデル抗原の α -GC を投与したマウスで認められるように、細胞内の IFN γ 及び IL-4 が陽性となった。Veh; 糖脂質を溶かす溶媒

肺炎球菌糖脂質の主要な脂肪酸は、パルミチン酸 C_{16:0} とバクセン酸 C_{18:1 (n-7)} である。しかし、これらの脂肪酸が R₁、R₂ のどの位置に結合するか分かっていなかった (図 2)。そのため、パルミチン酸 C_{16:0}、バクセン酸 C_{18:1 (n-7)} またはオレイン酸 C_{18:1 (n-9)} の何れかの脂肪酸を持つ数種類の化合物を合成し (表 1)、ヒト NKT 細胞株を用いて、その活性について IFN γ 産生を指標に調べた。その結果、ヒト NKT 細胞は肺炎球菌から精製した糖脂質を認識し、サイトカインを産生することが分かった (図 4)。また、合成化合物を用いた解析から、抗原となる肺炎球菌糖脂質は R₁ にパルミチン酸、R₂ にバクセン酸をもっていることが明らかになった (図 4、図 5)。バクセン酸は、哺乳類ではほとんど検出されないことから、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。

Glycolipid	R ₁	R ₂
Glc-DAG-s1	C _{18:1(n-7)}	C _{16:0}
Glc-DAG-s2	C _{16:0}	C _{18:1(n-7)}
Glc-DAG-s3	C _{18:1(n-7)}	C _{18:1(n-7)}
Glc-DAG-s4	C _{18:1(n-9)}	C _{16:0}
Glc-DAG-s5	C _{18:1(n-9)}	C _{18:1(n-9)}

表 1. 異なる脂肪酸をもつ単糖型の肺炎球菌糖脂質の合成化合物

パルミチン酸 C_{16:0}、バクセン酸 C_{18:1 (n-7)} またはオレイン酸 C_{18:1 (n-9)} の何れかの脂肪酸を持つ数種類の単糖型肺炎球菌糖脂質 Glc-DAG を化学合成した。

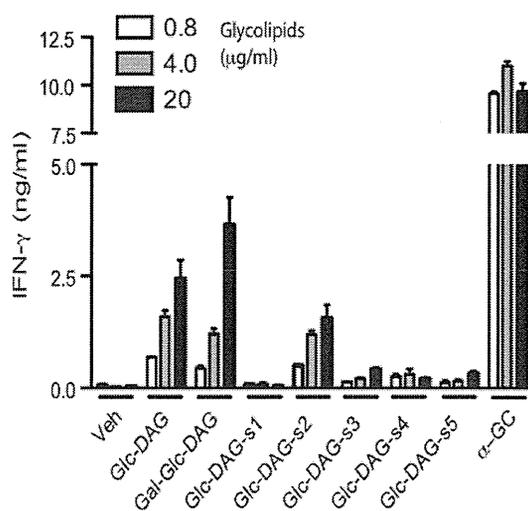


図 4. ヒト NKT 細胞による肺炎球菌糖脂質認識
肺炎球菌より精製した糖脂質 (Glc-DAG, Gal-Glc-DAG) 及び合成化合物 (Glc-DAG-s1 ~ s5) 存在下にヒト NKT 細胞株と樹状細胞を 24 時間培養し、IFN γ を測定した。

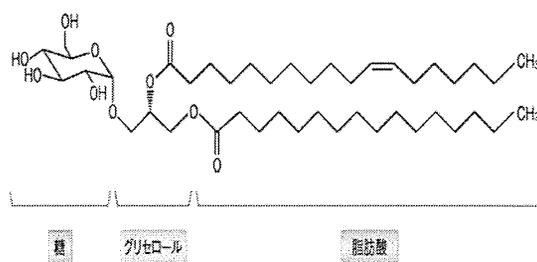


図 5. 肺炎球菌糖脂質抗原 (単糖型) の構造
抗原となる肺炎球菌糖脂質は R₁ にパルミチン酸、R₂ にバクセン酸を有する。

以上の結果より、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見出した (論文 1)。

次に、抗原提示分子 CD1d、CD1d に提示された肺炎球菌糖脂質及び T 細胞抗原受容体の 3 量体が結合する様式を X 線結晶構造解析にて明らかにした。その結果、NKT 細胞の T 細胞抗原受容体による肺炎球菌糖脂質の認識様式が分子レベルで明らかになった (図 6)。

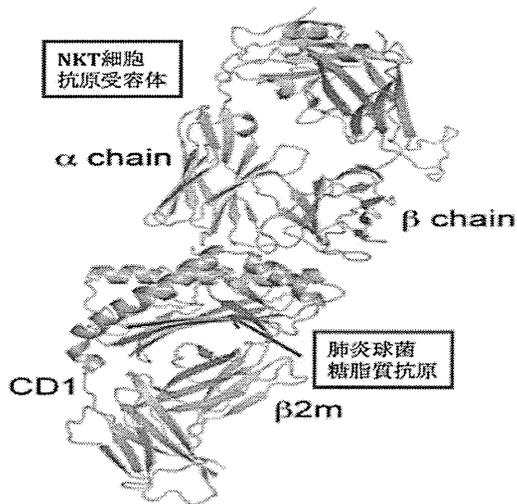


図 6. NKT 細胞による肺炎球菌糖脂質認識機序
抗原提示分子 CD1d に提示された肺炎球菌糖脂質と NKT 細胞の T 細胞抗原受容体の結合様式を X 線結晶構造解析にて、明らかにした。

2) 糖脂質抗原併用接種による肺炎球菌蛋白抗原ワクチンの増強：

糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化が、肺炎球菌蛋白抗原に対する抗体産生に影響を及ぼすかどうか検討した。多くの菌株で共通の構造をもつ蛋白抗原の PspA (pneumococcal surface protein A) 単独あるいは蛋白抗原と糖脂質抗原の併用ワクチンでマウスを免疫し、高い菌量で肺炎球菌を感染させ、生存期間を調べた。無処置群、蛋白抗原単独接種群では、全例死亡したのに対し、蛋白抗原と糖脂質の併用接種群では高い生存率を示した (図 7)。

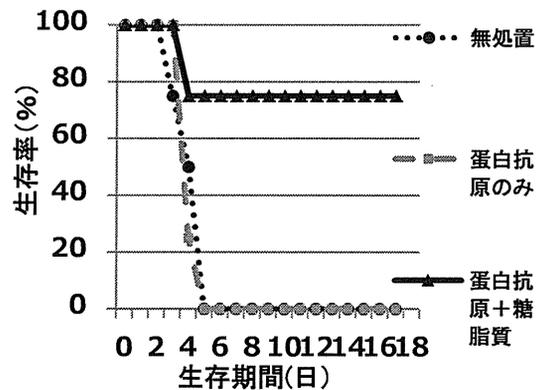


図 7. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチンの肺炎球菌感染防御効果 (生存期間)

マウスに蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種し、肺炎球菌感染後の生存期間を測定した。

次に、蛋白抗原ワクチンによる抗体産生に及ぼす糖脂質の併用効果を調べるために、血中の抗体価を測定した。図 8 に示すように、蛋白抗原単独では有効な抗体価の上昇を認めないものの、蛋白抗原と糖脂質抗原の併用接種群では、著明な IgG 抗体価の上昇を認めた。

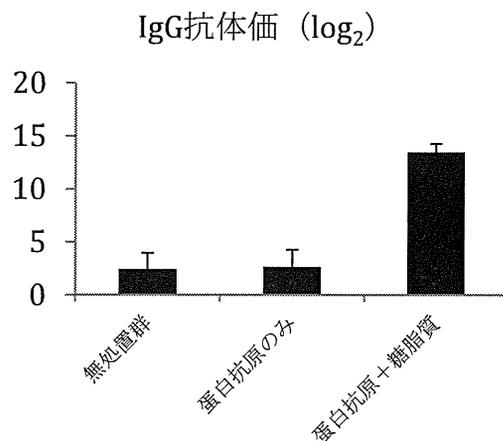


図 8. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチンによる抗体産生誘導

マウスに蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種し、血中の蛋白抗原に対する IgG 抗体価を測定した。

IgG 抗体のサブクラスを調べたところ、蛋白抗原と糖脂質の併用接種群では IgG1 (図 9)、IgG2b (図 10)、IgG2c (図 11)、IgG3 (図 12) の各サブクラスの抗体価の上昇を認めた。特に IgG1 と IgG2b 抗体において高い抗体価を示した。

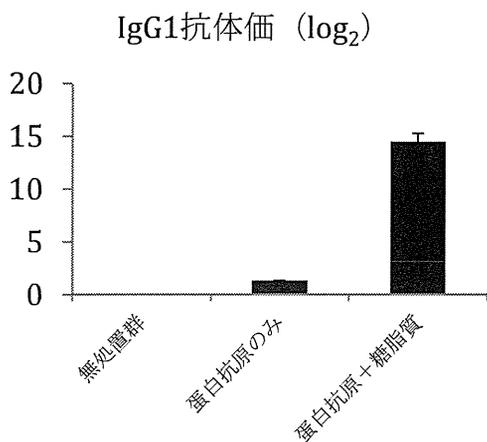


図 9. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチンによる抗 IgG1 抗体産生誘導

マウスに蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種し、血中の蛋白抗原に対する IgG1 抗体価を測定した。

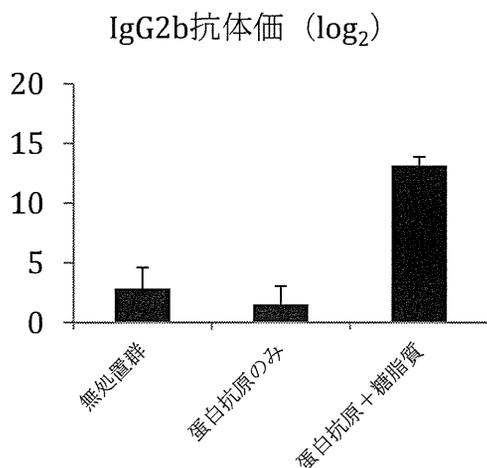


図 10. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチンによる抗 IgG2b 抗体産生誘導

マウスに蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種し、血中の蛋白抗原に対する IgG2b 抗体価を測定した。

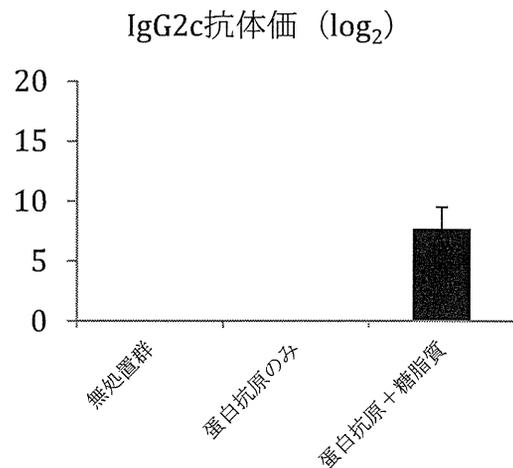


図 11. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチンによる抗 IgG2c 抗体産生誘導

マウスに蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種し、血中の蛋白抗原に対する IgG2c 抗体価を測定した。

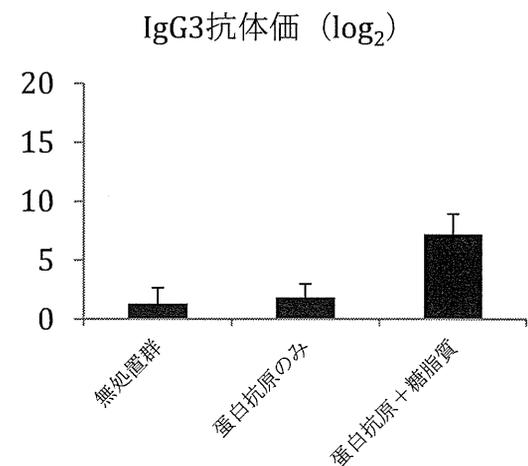


図 12. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチンによる抗 IgG3 抗体産生誘導

マウスに蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種し、血中の蛋白抗原に対する IgG3 抗体価を測定した。

気道において抗体産生を認めるかどうか調べるため、免疫したマウスから気管支肺胞洗浄液を採取し、IgG 抗体価を測定した。蛋白抗原と糖脂質の併用接種群において、有意な IgG 抗体価の上昇を

認めた (図 13)。

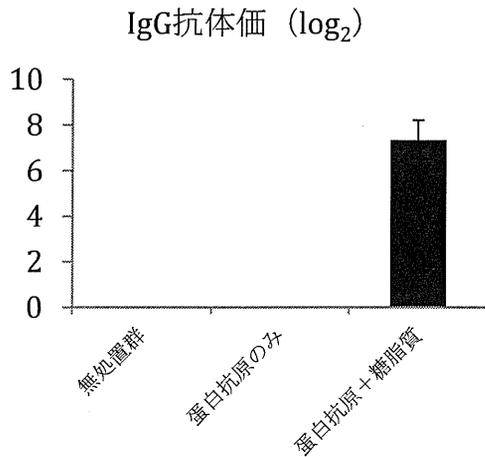


図 13. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチンによる気道における IgG 抗体産生誘導

マウスに蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種し、気管支肺胞洗浄液中の蛋白抗原に対する IgG 抗体価を測定した。

蛋白抗原と糖脂質の併用ワクチンにより、抗原特異的な CD4T 細胞の分化が誘導されるか調べるため、ワクチン接種マウスから脾臓の CD4T 細胞を精製し、蛋白抗原刺激に対するサイトカイン産生を調べた。蛋白抗原と糖脂質の併用ワクチン接種マウスでは、蛋白抗原特異的な CD4T 細胞が IFN γ や IL-4 などのサイトカインを産生することが分かった (図 14、図 15)

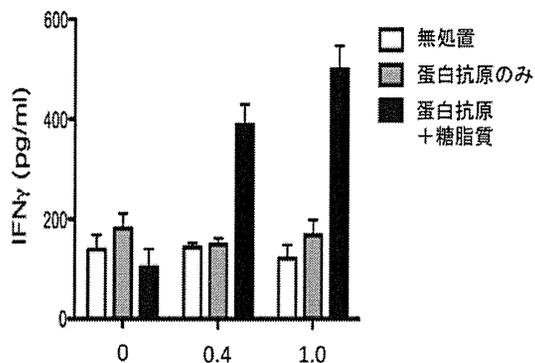


図 14. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチン接種マウスの脾臓 CD4T 細胞の IFN γ 産生

蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種したマウスから脾臓の CD4T 細胞を精製し、抗原刺激 ($\mu\text{g/ml}$) による IFN γ 産生を測定した。

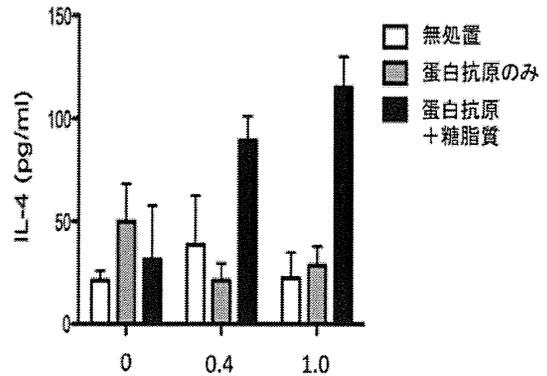


図 15. 蛋白抗原と糖脂質併用ワクチン接種マウスの脾臓 CD4T 細胞の IL-4 産生

蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原と糖脂質を併用接種したマウスから脾臓の CD4T 細胞を精製し、抗原刺激 ($\mu\text{g/ml}$) による IL-4 産生を測定した。

3) 肺炎球菌多糖抗原ワクチンによる抗体産生への Dectin-2 の役割:

肺炎球菌多糖抗原ワクチン抗原 (PPV) の認識機序を解明するため、肺炎球菌多糖抗原ワクチン直接刺激による骨髄由来の樹状細胞のサイトカイン産生を調べた。その結果、抗原の濃度依存的に IL-12p40 産生が誘導されることを明らかにした。PPV の成分は肺炎球菌の莢膜多糖であることから、樹状細胞の活性化に何らかの C タイプレクチン受容体の関与が推定された。そこでマンノース結合多糖の認識受容体と考えられる Dectin-2 の関与を想定し、Dectin-2KO マウスと WT マウスから得られた骨髄由来樹状細胞を PPV で刺激した際の IL-12p40、

TNF- α 産生を両マウス間で比較した。

図 16 に示すように、WT マウス由来の樹状細胞では PPV の濃度依存的に両サイトカインの産生が誘導されたが、Dectin-2KO マウス由来の樹状細胞ではその産生が完全に消失した。

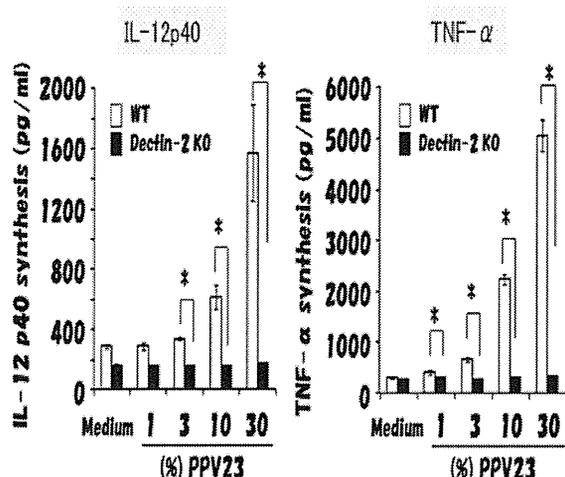


図 16. 肺炎球菌多糖抗原ワクチンによる樹状細胞からの IL-12p40, TNF- α 産生は Dectin-2 依存性である

マウス骨髄由来樹状細胞を PPV で 24 時間刺激し、培養上清中の IL-12p40 及び TNF- α を測定した。

これらの結果から、樹状細胞による PPV の認識に Dectin-2 が深く関わっていることが明らかになった。次に、本ワクチンによる抗体産生に Dectin-2 が必要かどうかを検討した。Dectin-2KO マウスまたは WT マウスに PPV を接種し、2 週後に血清中の肺炎球菌多糖抗原に対する IgM、IgG 濃度を測定したところ、何れの抗体も Dectin-2KO マウスで有意に減少した (図 17)。

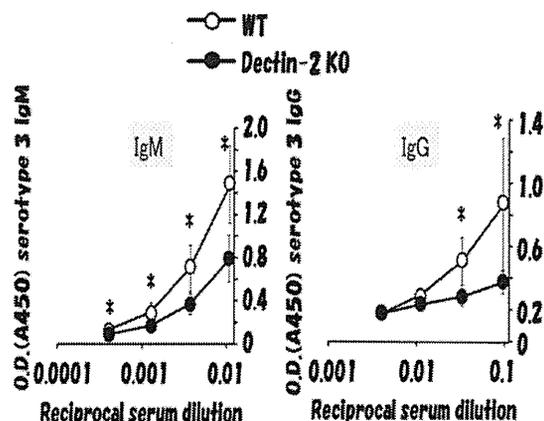


図 17. ニューモバックス®による抗体産生は Dectin-2 依存性である

WT および Dectin-2KO マウスにニューモバックス®を接種し、14 日後の血中の抗体価 (血清 3 型の多糖抗原に対する) を測定した。

さらに、他の血清型に対する抗体価を測定したところ、WT マウスと比較して Dectin-2KO マウスでは血清型 6B および 19F に対する IgM 抗体と IgG 抗体の産生は有意に減少した (図 18)。同様に、Dectin-2KO マウスにおいて、血清型 14 と 23F に対する IgM 抗体の産生が低下していたが、IgG 抗体の産生に差は認められなかった。これらの結果から、肺炎球菌莢膜多糖に対する抗体産生が Dectin-2 依存的に誘導されることが明らかとなった。

次に、PPV による感染防御効果における Dectin-2 の役割を明らかにするために免疫細胞の移植実験を行った。PPV 接種後 14 日目に WT マウスと Dectin-2KO マウスから脾細胞を採取し、未感染の WT マウスに移植した。脾細胞を移植されたレシピエント WT マウスに肺炎球菌を感染させたところ、図 19 に示すように

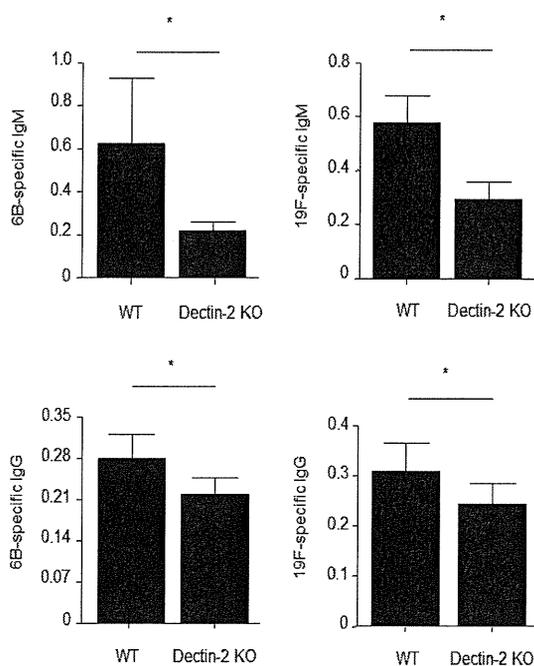


図 18. 肺炎球菌多糖抗原ワクチンによる抗体産生は Dectin-2 依存性である

WT および Dectin-2KO マウスに肺炎球菌多糖抗原ワクチンを接種し、14 日後の血中の抗体価を測定した。

Dectin-2KO マウス由来の脾細胞を移植されたマウスでは、感染後 3 日目に全匹が死亡したのに対し、WT マウス由来の脾細胞を移植されたマウスでは生存期間が延長した。これらの結果から、Dectin-2 による肺炎球菌莢膜多糖の認識は PPV の感染防御効果に関与することが明らかとなった。

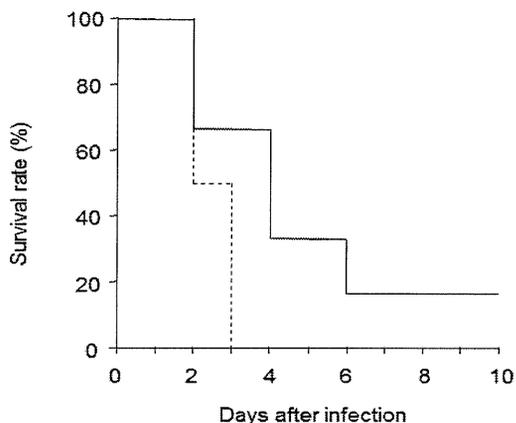


図 19. PPV の感染予防効果における Dectin-2 の役割

PPV 投与 Dectin-2KO マウスからの脾細胞を移植したマウス (破線) では肺炎球菌感染後 3 日以内に全例死亡したが、WT マウスの脾細胞を移植したマウス (実線) では有意な生存期間の延長が観察された。

PPV 接種後の Dectin-2 を介した抗体産生における NKT 細胞の関与について調べるために、NKT 細胞の抗原である糖脂質抗原 α -GalCer の投与が Dectin-2KO マウスにおける抗体産生にどのような影響を及ぼすか調べた。その結果、PPV 接種 7 日目における α -GalCer の投与により Dectin-2KO マウスにおいて低下していた IgM 抗体 (図 20) および IgG 抗体 (図 21) 産生が有意に増加した。

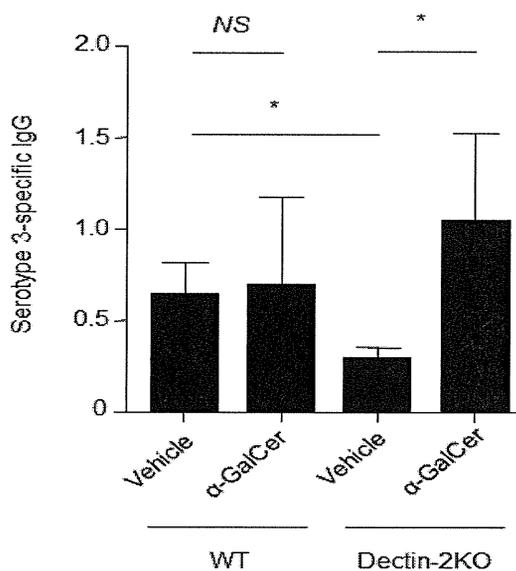


図 20. PPV による IgM 抗体産生への NKT 細胞活性化の影響

α -GalCer 投与による NKT 細胞の活性化によって、Dectin-2KO マウスで低下していた PPV 投与による IgM 抗体産生が有意に増加した。

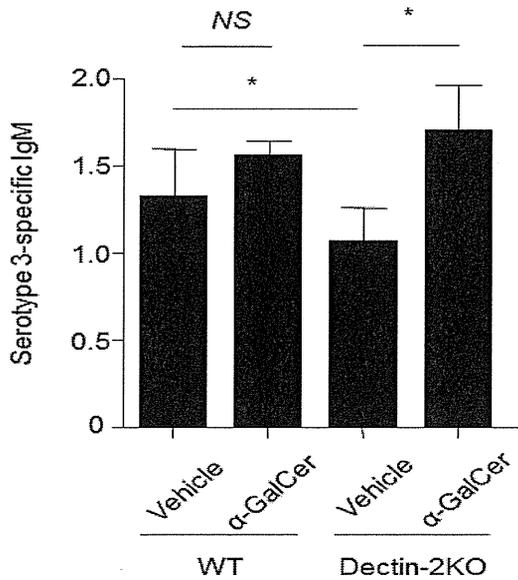


図 21. PPV による IgG 抗体産生への NKT 細胞活性化の影響

α-GalCer 投与による NKT 細胞の活性化によって、Dectin-2KO マウスで低下していた PPV 投与による IgG 抗体産生が有意に増加した。

さらに、PPV 接種後の脾細胞中の NKT 細胞における IFN-γ 産生が、WT マウスと比較して Dectin-2KO マウスにおいて減少することを示唆する結果を得た。これらの結果から NKT 細胞から分泌される IFN-γ が肺炎球菌ワクチン接種後の抗体産生に参与する可能性が示唆された。

4) ヒト B 細胞による抗体産生における NKT 細胞の影響

ヒト NKT 細胞株によるヒト B 細胞からの IgG 抗体産生への影響について検討した。抗 μ 抗体刺激による IgG 産生が NKT 細胞添加によって有意に増加した (図 22)。

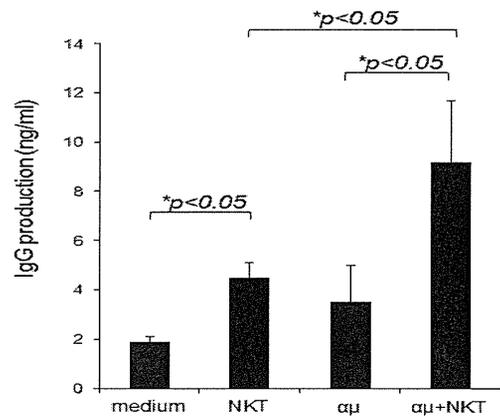
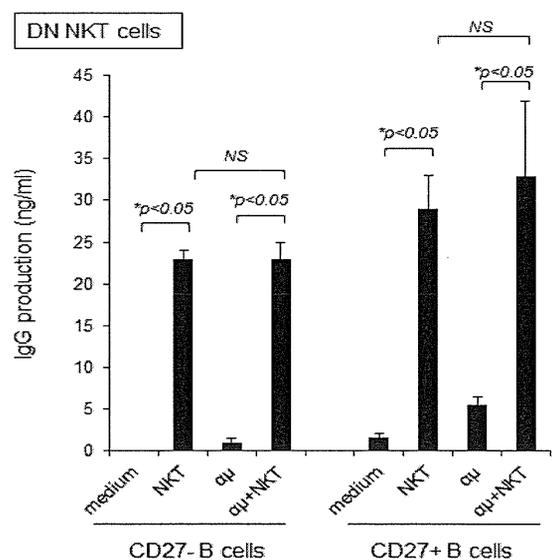


図 22. NKT 細胞によるヒト B 細胞からの抗体産生増強

抗 μ 抗体刺激によるヒト B 細胞からの抗体産生は NKT 細胞を添加することで優位に増加した。

さらに、その効果について、CD4⁺NKT 細胞と DN NKT 細胞間で比較検討したところ、DN NKT 細胞では CD4⁺NKT 細胞に比べて 5~10 倍の IgG 抗体産生の増強を示した。これらの効果は、休止期 B 細胞 (CD27⁻)、メモリー B 細胞 (CD27⁺) ともに同様であった (図 23)。



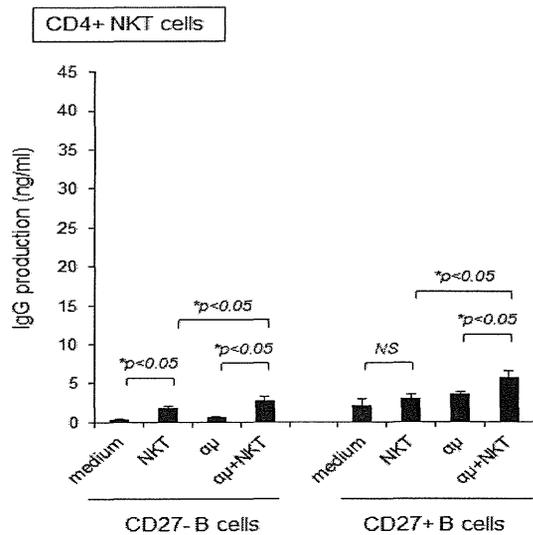


図23. DN、CD4+NKT 細胞によるヒトB細胞からのIgG産生増強

NKT細胞によるヒトB細胞からのIgG産生増強効果は、DN NKT細胞がCD4+NKT細胞よりも5~10倍強く認められ、CD27-とCD27+B細胞で同様であった。

D. 考察

私達はこれまでに、NKT 細胞が肺炎球菌感染早期において、好中球の肺への集積を増強し、菌の排除を促進させることを明らかにした。しかし、肺炎球菌感染防御における NKT 細胞の反応性の詳細な機序は明らかになっていなかった。本研究により、NKT 細胞が感染早期に肺炎球菌糖脂質を認識し、IFN γ などのサイトカインを産生することを見出した。また、NKT 細胞による糖脂質の認識を阻害すると、肺炎球菌の排除が阻害されたことより、NKT 細胞による糖脂質の認識は、肺炎球菌感染防御に重要な役割を担うと考えられた。肺炎球菌糖脂質は単糖または二糖型の糖脂質で、哺乳類では検出することが稀なバクセン酸を有しており、NKT 細胞の反応性にはその特

徴的な脂肪酸の存在が重要であることが明らかになった。そのことより、NKT 細胞は肺炎球菌などの微生物に特徴的な構造を認識していることが示唆された。さらに、肺炎球菌糖脂質に対する NKT 細胞の反応性はマウスのみならず、ヒトでも保存されていた。以上の結果から、NKT 細胞の多様性に乏しい T 細胞抗原受容体は、肺炎球菌などの臨床上、極めて重要な細菌を認識するのに有用であり、そのことが長い進化の過程で保存されてきた理由ではないかと考えられた。

また、肺炎球菌に対する新しいワクチンの開発を目指し、肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原の併用ワクチンの効果も解析した。マウスに経鼻的に肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原の併用ワクチンを接種し、肺炎球菌感染防御効果を調べたところ、併用接種群では菌の排除が促進され、生存率が高いという結果を得た。肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原の併用により、血中及び気道において、抗原特異的 IgG 抗体の産生誘導が増強され、菌の排除が促進されることが示された。

蛋白抗原に対する IgG 抗体産生には CD4T 細胞による B 細胞の活性化が必要と考えられている。肺炎球菌蛋白抗原及び糖脂質抗原の併用マウスの CD4T 細胞を蛋白抗原で刺激したところ、IFN γ 及び IL-4 の産生を認めたことより、蛋白抗原特異的な CD4T 細胞が誘導されていることが分かった。以上の結果より、蛋白抗原と糖脂質抗原併用接種群では、糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化により、蛋白抗原を特異的に認識する CD4T 細胞が誘導されることで、B 細胞を刺激して抗体産生が増強されることが示唆された。

本研究では現行の肺炎球菌多糖抗原ワクチンの有効性を高める方法の確立

を模索するために、ワクチンによる免疫誘導機序の解析を行った。その結果、Dectin-2 という糖鎖を認識する分子が肺炎球菌多糖抗原ワクチンの認識に関与することを見出した。Dectin-2 は α -mannans や高マンノース残基をカルシウムイオン依存的に認識し、病原微生物に対する様々な免疫応答を誘導する。Dectin-2 を介した PAMPs の認識は、会合分子である FcR γ の細胞質ドメインに含まれる ITAM を介して SyK-CARD9 経路、さらには NF- κ B へのシグナル伝達を活性化する。真菌では、Dectin-2 を介して *Candida albicans*、*Microsporium audouinii*、*Trichophyton rubrum* の菌糸を認識することが報告された。これらの病原真菌は Dectin-2 を発現したマクロファージによる TNF- α や IL-6 などのサイトカイン産生を誘導した。これらの報告と一致して、Dectin-2 を介した肺炎球菌莢膜多糖の認識が、マウスの骨髄由来樹状細胞から IL-12p40, TNF- α および IL-6 の産生を誘導することを明らかにした。

また、肺炎球菌多糖抗原ワクチンによる抗体産生の誘導における Dectin-2 の役割の解析を行った。血清型 6B、14、19F および 23F に対する IgM 産生は WT マウスと比較して Dectin-2KO マウスにおいて有意に減少していた。一方、6B および 19F に対する IgG 抗体産生は Dectin-2 マウスで有意に減少していたのに対し、14 および 19 では低下はみられなかった。これらの結果から、Dectin-2 がすべての莢膜多糖を等しく認識するわけではない可能性が推測された。6B および 19F は、14 や 23F と比べて側鎖を持たない比較的単純な構造である。そのために、これらの莢膜多糖間において Dectin-2 の

関与に差が生じた可能性が推測される。

さらに肺炎球菌の莢膜多糖成分中の ConA に結合する成分が Dectin-2 との相互作用に深く関与することを示す結果を得ている。このことから、恐らくは、肺炎球菌多糖抗原ワクチン中のマンノース多糖が樹状細胞の Dectin-2 に作用し、その下流シグナルが活性化され IL-12 産生が誘導されると予想される。

これまでの研究から、肺炎球菌感染における IL-12 の重要な役割が示唆されている。IL-12 の投与は IFN- γ を誘導することにより、肺炎球菌感染時の肺における免疫応答を促進し、感染に対する宿主防御反応を増強する。過去の我々の研究では、IL-12KO マウスでは IFN- γ の産生が低下する事により肺炎球菌感染に対する感受性が高くなる可能性を報告してきた。このように IL-12 は肺炎球菌感染の病態を考察するうえで重要なサイトカインである。本研究では、肺炎球菌ワクチン接種後の血清中 IL-12 濃度を測定したところ、WT マウスと比較して Dectin-2KO マウスにおいて有意に低下していた。これらの結果から Dectin-2 依存的に産生される IL-12 は肺炎球菌ワクチン接種後の抗体産生に重要な役割を果たしていると考えられる。IL-12 は NKT 細胞からの IFN- γ 産生を誘導する。そのため、NKT 細胞の活性化と IFN- γ が肺炎球菌莢膜多糖特異な抗体産生に大きく関与する可能性が推測される。

これらのマウスの解析だけでなく、ヒト B 細胞を用いた研究でも NKT 細胞との相互作用を示唆する可能性が明らかとなった。本研究では、抗 μ 抗体を B 細胞の一次刺激剤として用いたが、これは II 型胸腺非依存性抗原による刺激様

式を模したものであり、したがって、マウスを用いた *in vivo* での解析から得られた知見が、ヒトにも当てはまる可能性を強く示唆するものと考えられる。NKT 細胞には表面抗原の違いにより $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+CD8^-(DN)$ 、 $CD4^+CD8^+$ の 4 種類のサブセットが存在し、ヒトでは $CD4^+$ 、DN NKT 細胞が主要なサブセットである。 $CD4^+$ 、DN NKT 細胞には産生されるサイトカインのタイプに違いが認められることから、今回の解析で DN NKT 細胞が強く B 細胞からの抗体産生を増強したことは、このサブセットがより深く関与することを示唆するものである。このことは、我々の臨床研究で観察した PPV 接種後の血清 IgG 抗体濃度の上昇と DN NKT 細胞数の増加が正の相関関係を示したこととよく一致する結果であった。

以上の結果より、糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化は、肺炎球菌ワクチンの効果を増強するのに極めて有用であることが示唆された。

E. 結論

本研究により、肺炎球菌感染早期において、リンパ球の NKT 細胞が肺炎球菌糖脂質抗原を認識して、感染防御に重要な役割を担うことが明らかになった。また、マウスにおいて、肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原の併用ワクチンは、抗体産生を増強させ、感染防御効果を高めることを見出した。糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化により、蛋白抗原を特異的に認識する $CD4^+$ 細胞が誘導されることで、B 細胞を刺激して抗体産生が増強されることが示唆された。さらに、ヒトの

NKT 細胞においても直接 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ようと考えられた。また、肺炎球菌多糖抗原ワクチンによる免疫誘導機序を解析し、Dectin-2 という分子が多糖抗原認識及び抗体産生の誘導に重要であることが明らかになった。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知見と一致する結果であった。以上の結果から、NKT 細胞の糖脂質抗原をアジュバントとして用いることは、肺炎球菌ワクチンの効果を増強するうえで有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Girardi E, Li X, Li Y, Imamura M, Kaneko Y, Okawara A, Miyazaki Y, Gomez-Velasco A, Rogers P, Dahesh S, Uchiyama S, Khurana A, Kawahara K, Yashilkaya H, Andrew PA, Wong CH, Kawakami K, Nizet V, Besra GS, Tsuji M, Zajonc DM, Kronenberg M. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol.* 12: 966-974, 2011.
2. Girardi E, Yu ED, Li Y, Tarumoto N, Pei B, Wang J, Illarionov PA, Kinjo Y, Kronenberg M, Zajonc DM. Unique

Interplay between Sugar and Lipid in Determining the Antigenic Potency of Bacterial Antigens for NKT Cells. *PLoS Biol.* 9:e1001189, 2011.

3. Kinjo Y, Ueno K. *i*NKT cells in microbial immunity: recognition of microbial glycolipids. *Microbiol Immunol.* 55: 472-482, 2011.

4. Miyasaka T, Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku M, Kawakami K. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. *Vaccine.* 30:3304-3310, 2012.

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.

3. 金城雄樹, 金子幸弘, 樽本憲人, 大川原明子, 川上和義, 宮崎義継. 自然リンパ球による肺炎球菌認識機構の解析. 第 85 回日本感染症学会総会・学術

講演会, 東京, 2011 年 4 月.

4. Kinjo Y, Illarionov PA, Vela JL, Pei B, Li X, Kaneko Y, Miyazaki Y, Nizet V, Kawakami K, Tsuji M, Kronenberg M. NKT cells recognize glycolipids from *Streptococcus pneumoniae* and GBS. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), Sapporo, September 2011.

5. Li Y, Girardi E, Yu ED, Wang J, Tarumoto N, Pei B, Painter GF, Illarionov PA, Kinjo Y, Kronenberg M, Zajonc DM. Microbial glycolipid antigen recognition by invariant Natural killer T cells. The 6th International Symposium on CD1 and NKT, Chicago, September 2011.

6. Miyasaka T, Miyamura N, Saijo S, Iwakura Y, Kawakami K: A critical role for Dectin-2 in the production of serotype-specific antibody caused by pneumococcal polysaccharide vaccine. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2011 年 11 月.

7. 金城雄樹. Meet the Expert 4 「自然リンパ球による感染防御～感染免疫における NKT 細胞の役割とワクチンへの応用の可能性～」. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会. 4 月 25-26 日, 2012 年, 長崎.

8. Miyasaka T, Akahori Y, Miyamura N, Toyama M, Saijo S, Iwakura Y, Kinjo Y, Oishi K, Kawakami K: Role of Dectin-2 in the serotype-specific antibody production