

201318075A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

自然リンパ球の活性化を介した肺炎球菌ワクチン開発

平成 25 年度 総括研究報告書

平成 26 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
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

自然リンパ球の活性化を介した肺炎球菌ワクチン開発

平成 25 年度 総括研究報告書

平成 26 年 3 月

研究代表者

金城 雄樹

(国立感染症研究所)

目 次

I. 自然リンパ球の活性化を介した肺炎球菌ワクチン開発	
総括研究報告書（平成 25 年度）	1
研究代表者：金城 雄樹（国立感染症研究所真菌部）	
研究協力者：川上 和義（東北大学大学院医学系研究科）	
大石 和徳（国立感染症研究所感染症情報センター）	
明田 幸宏（大阪大学微生物病研究所）	
朴 貞玉（大阪大学微生物病研究所）	

自然リンパ球の活性化を介した肺炎球菌ワクチン開発

研究代表者 金城 雄樹 国立感染症研究所真菌部 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
大石 和徳 国立感染症研究所感染症疫学センター センター長
明田 幸宏 大阪大学微生物病研究所 特任講師
朴 貞玉 大阪大学微生物病研究所 特任研究員

研究要旨 肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原を併用した新規肺炎球菌ワクチンの感染防御効果をマウスモデルで解析した。また、現行の肺炎球菌多糖抗原ワクチンの効果を増強する方法を模索する目的で、多糖ワクチン抗原の認識機構の解明に関する基礎的研究を行った。マウスに肺炎球菌蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンを接種することにより、蛋白抗原特異的 IgG 抗体産生 B 細胞の誘導及び血中 IgG 抗体価の有意な上昇を認めた。併用ワクチン接種マウスでは、肺炎球菌の排除が促進され、高い生存率を示し、肺炎球菌感染防御効果は複数の血清型に対して認められた。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効果の増強に有用であることが示唆された。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 欠損マウスでは、肺炎球菌多糖抗原ワクチンによる NKT 細胞の IFN- γ 産生及び IgG 抗体産生の障害を認めた。IFN- γ 中和抗体を用いた解析から IgG 抗体産生に IFN- γ が関与することが示唆された。さらに、Dectin-2 欠損マウスに NKT 細胞を活性化する糖脂質や IL-12、IFN- γ を投与することで IgG 抗体産生が回復した。その結果、NKT 細胞が産生する IFN- γ が抗体産生に関与することが示唆された。

A. 研究目的

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

現行の成人用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り、メモリー細胞が誘導されないことから効果の持続性に懸念がある。一方、小児用ワクチンは7価または13価の莢膜多糖体を含んだ結合型のワクチンで有効性が高い。しかし、す

で13価ワクチンに含まれない血清型による侵襲性感染症の増加を認めている。そのため近い将来、現行ワクチンで対応できない血清型の感染増加の懸念がある。

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早期に糖脂質抗原を認識し、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。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た。

本研究ではこれらの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、多くの肺炎球菌株で共通の構造をもつ蛋白抗原のPspA (pneumococcal surface protein A)と糖脂質抗原の併用ワクチンの肺炎球菌感染防御効果の解析を行った。また、現行の肺炎球菌多糖ワクチンの効果を増強する方法を模索する目的で、多糖ワクチン抗原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解析を行った。

B. 研究方法

1) 肺炎球菌株：

肺炎球菌は血清3型 (URF918株またはWU2株) または血清6B型 (BG7322株) を実験に用いた。肺炎球菌はTodd-Hewitt液体培地 (Difco) を用いて37°C 5% CO₂環境下で培養した。培養開始6時間後の

対数増殖期に菌液を回収し、2回洗浄後、約3×10⁸ CFU/mlに菌液を調整し使用まで-80°Cにて保存した。

2) 肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原併用ワクチンの投与スケジュール、血漿中の抗体価の測定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。最終免疫の1週後にマウスより血漿を採取し、抗PspA IgG抗体をELISAにて測定した。また、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 (WU2株) を気管内接種し、生存期間及び感染3日後の肺内菌数を調べた。また、血清型の異なる菌株に対する反応性を調べるため、血清6B型 (BG7322株) の肺炎球菌株感染後の生存期間を調べた。

3) 蛋白抗原特異的抗体産生細胞の誘導：

上記の方法で免疫したマウスの頸部リンパ節の細胞を精製し、蛋白抗原に対するIgG抗体産生細胞の誘導をELISPOT法で解析した。

4) 肺炎球菌多糖ワクチン接種による抗体産生の解析：

6週齢～12週齢のC57BL/6マウスまたはDectin-2KOマウス (東京理科大学 岩倉洋一郎教授より供与) 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

IgG3抗体価をELISA法にて測定した。

5) CD69 の発現と細胞内 IFN- γ の測定 :
WTマウスまたはDectin-2KOマウスから採取した脾細胞を、FITC標識抗CD3抗体 (Clone 145-2C11; BioLegend)、PE標識抗NK1.1抗体 (clone PK136; BioLegend)、APC標識抗CD3抗体 (clone 145-2C11; BioLegend) および抗CD69抗体 (clone H1.2F3; BioLegend) で染色した。対照群にはアイソタイプが一致したコントロールIgGを用いた。また、脾細胞を5 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate、500 ng/ml イオノマイシンおよび、2 μ Mモネンシン (Sigma-Aldrich) と共に37°Cで4時間培養し、PE標識抗NK1.1、APC標識抗CD3抗体で染色した後に、細胞内のIFN- γ をFITC標識抗体 (clone XMG1.2; BD Biosciences) またはアイソタイプコントロールIgGを用いて染色した。染色された細胞はFACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences) を用いて解析した。

6) 抗 IFN- γ 抗体、IFN- γ 、IL-12 投与
内因性に産生されたIFN- γ を中和する目的で、IFN- γ ハイブリドーマ (R4-6A2、ATCC) から精製した抗IFN- γ mAb (200 μ g/mouse) をPPV接種後6、7、10日目にマウス腹腔内に接種した。対照群にはラットIgG抗体 (ICN Pharmaceuticals Inc.) を接種した。また、PPV接種後7日目から4日間にわたって、WTマウスとDectin-2KOマウスの腹腔内にリコンビナント (r) IFN- γ (2000 U/mouse/day) (PeproTech Inc) を接種した。また、rIL-12 (0.1 μ g/mouse/day) (PeproTech Inc.) をPPV接種直後から7日間腹腔内に接種した。

7) 血清 IL-12p40 濃度の測定 :
PPV 接種 9 日後のマウス血清中のIL-12p40の濃度をELISAにて測定した。

8) Dectin-2KO マウスにおける肺炎球菌感染後の肺内菌数定量 :

WT および Dectin-2KO マウスに、 $7.5 \times 10^4 \sim 3.0 \times 10^5$ Colony forming units (CFU) の肺炎球菌を気管内投与により感染させ、感染 3 日後の肺を摘出し、5ml の PBS でホモジネート後、1/2 生理食塩水で希釈系列を作製した。ヒツジ血液寒天培地に 100 μ l を均一に塗抹し、37°C、5%CO₂ 存在下で一晩培養し、各コロニー数をカウント、肺内生菌数の定量を行った。

9) 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。 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

(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) 蛋白抗原・糖脂質併用接種による抗体産生誘導 :

蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンにより、蛋白抗原特異的抗体産生が誘導される

か調べるために、最終免疫の翌週に血中の抗体価を測定した。その結果、図 1 に示すように、蛋白抗原単独では有意な抗体価の上昇を認めないものの、蛋白抗原・糖脂質併用接種群では、著明な IgG 抗体価の上昇を認めた。IgG 抗体のサブクラスを調べたところ、蛋白抗原・糖脂質の併用接種群では IgG1、IgG2b、IgG2c、IgG3 の各サブクラスの抗体価の上昇を認めた。

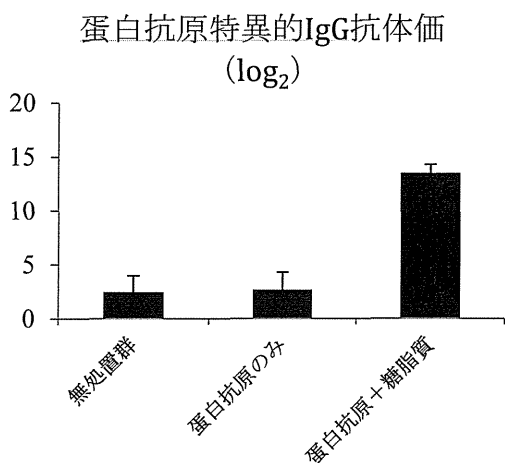


図 1. 蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンによる抗体産生誘導

蛋白抗原・糖脂質を併用接種群では、血中の蛋白抗原に対する IgG 抗体価の有意な上昇を認めた。

致死性肺炎球菌感染症に対する蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンの感染予防効果を調べるため、蛋白抗原単独あるいは蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンでマウスを免疫し、血清 3 型の肺炎球菌を感染させ、生存期間を調べた。その結果、蛋白抗原・糖脂質の併用接種群では、無処置群、蛋白抗原単独接種群と比較して、高い生存率を示した (図 2)。

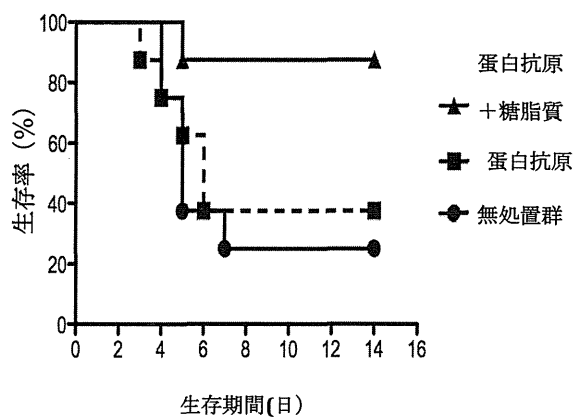


図 2. 蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンの肺炎球菌感染防御効果 (血清 3 型)

蛋白抗原・糖脂質併用接種群では、血清 3 型の肺炎球菌感染後の生存率が有意に高かった。

次に、菌体排除に及ぼす影響を調べるため、肺炎球菌感染後の肺内菌数を測定したところ、蛋白抗原・糖脂質併用接種群では、肺内菌数の有意な低下を認めた (図 3)。

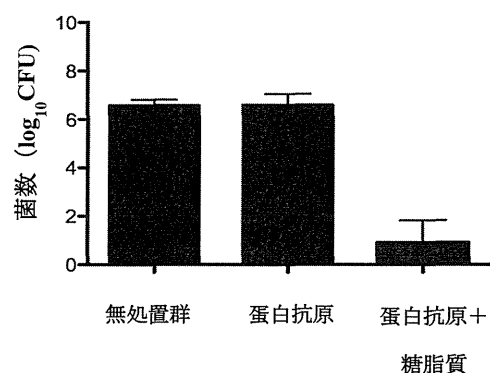


図 3. 蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンによる菌体排除促進

蛋白抗原・糖脂質併用接種群では、血清 3 型の肺炎球菌感染 3 日後の肺内菌数の有意な減少を認めた。

以上の結果から、肺炎球菌蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンの接種により、血中の蛋白抗原に対する IgG 抗体産生が誘導されること、また、菌の排除が促進され、感染防御効果が高まることが明らかになった。

他の血清型の肺炎球菌感染に対する感染防御効果を調べるため、血清 6B 型の肺炎球菌株感染後の生存期間を調べた。その結果、肺炎球菌蛋白抗原・糖脂質併用ワクチン接種群では、蛋白抗原単独接種群と比較して、高い生存率を示した (図 4)。

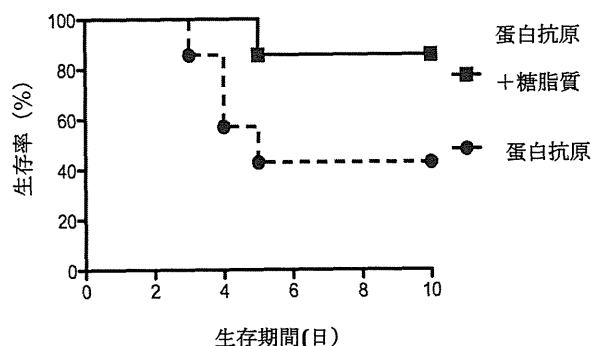


図 4. 蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンの肺炎球菌感染防御効果 (血清 6B 型)

蛋白抗原・糖脂質併用群では、血清 6B 型の肺炎球菌感染後の生存率が有意に高かった。

本併用ワクチンは経鼻接種にて投与している。所属リンパ節と考えられる頸部リンパ節において、抗体産生細胞が誘導されるかどうか ELISPOT 法で解析した。その結果、肺炎球菌蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンの接種により、蛋白抗原

特異的 IgG 抗体産生細胞の誘導を認めた (図 5)。

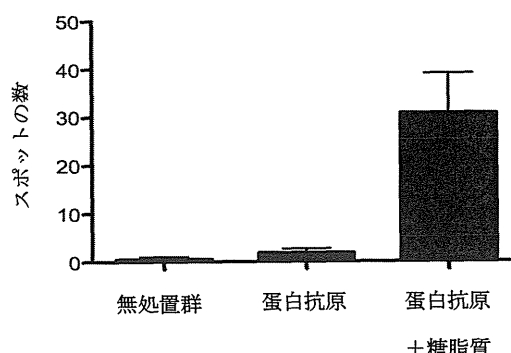


図 5. 蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンによる IgG 抗体産生細胞の誘導

蛋白抗原・糖脂質併用接種群では、頸部リンパ節において、蛋白抗原抗体特異的 IgG 抗体産生細胞が多く検出された。

2) 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 :

これまでの研究で、WT マウスと Dectin-2KO マウスに PPV を接種し、14 日目の血清 3 型莢膜多糖に対する血清中 IgG 抗体価を解析し、Dectin-2KO マウスで有意に低下することを見出した。一方、ヒトでは PPV 接種により血清中の特異的 IgG2 抗体が上昇することが報告されており、マウスでは IgG3 がヒトの IgG2 に相当するサブクラスであることが知られている。そこで、WT マウスと Dectin-2KO マウスに PPV を接種し、14 日目の血清 3 型莢膜多糖に対する血清中 IgG3 抗体価を測定したところ、同様に Dectin-2KO マウスで顕著な低下がみられた (図 6)。

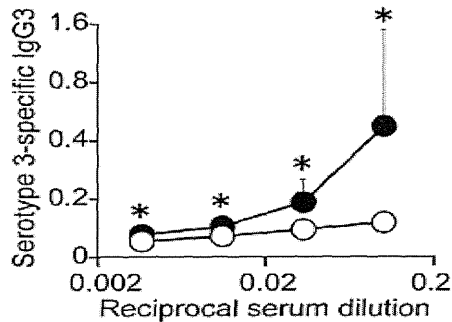


図6. 肺炎球菌多糖抗原によるIgG3抗体産生におけるDectin-2欠損の影響(血清3型)

Dectin-2KO マウスでは、PPV 投与による血清3型荚膜多糖に対するIgG3抗体産生がWTマウスに比べて有意に低下した。* $p < 0.05$

さらに、他の血清型として6B、14、19F、23Fに対するIgG3抗体価についても検討したところ、図7のようにいずれの血清型でも有意な低下が観察された。これらの結果から、Dectin-2がPPV接種によりヒトで増加するIgG2(マウスではIgG3)抗体産生に深く関与する可能性が示唆された。

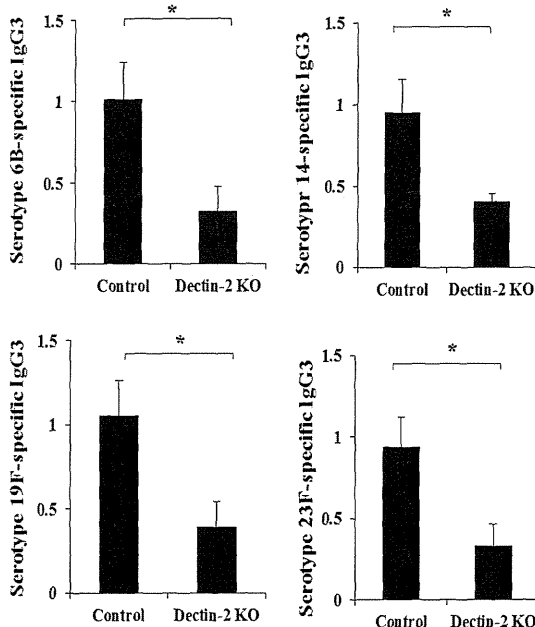


図7. 肺炎球菌多糖抗原によるIgG3抗体産生におけるDectin-2欠損の影響

Dectin-2KO マウスでは、PPV 投与による血清6B、14、19F、23F型荚膜多糖に対するIgG3抗体産生がWTマウスに比べて有意に低下した。

* $p < 0.05$

PPV接種後の抗体産生におけるNKT細胞の関与を調べる目的で、NKT細胞を活性化する糖脂質抗原投与がDectin-2KOマウスにおける抗体産生に及ぼす影響について解析したところ、糖脂質投与によりNKT細胞を活性化することでDectin-2KOマウスにおいて低下していたIgMおよびIgG抗体産生が有意に増加することが分かった。

そこで、PPV接種後9日目のWTマウスとDectin-2KOマウスにおける脾細胞中のNKT細胞の活性化をCD69発現により検討したところ、CD69陽性NKT細胞の割合はDectin-2KOマウスで有意に減少した。一方で、NK細胞やT細胞では違いを認めなかった(図8)。

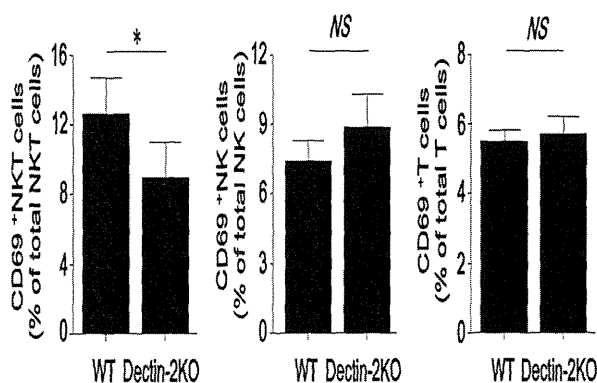


図8. 肺炎球菌多糖抗原によるNKT細胞の活性化とDectin-2欠損の影響

Dectin-2KOマウスでは、PPV投与による脾臓のNKT細胞における活性化抗原CD69の発現が有意に低下した。* $p < 0.05$

さらに、脾細胞中の NKT 細胞における細胞内 IFN- γ 発現は、WT マウスと比較して Dectin-2KO マウスにおいて有意に減少した (図 9)。これらの結果から、活性化 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関与する可能性が明らかとなった。

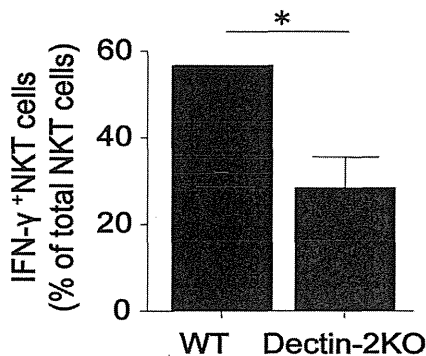


図 9. 肺炎球菌多糖抗原による NKT 細胞の IFN- γ 産生と Dectin-2 欠損の影響

Dectin-2KO マウスでは、PPV 投与による脾臓の NKT 細胞内 IFN- γ の発現が有意に低下した。* $p < 0.05$

PPV 接種後の Dectin-2 を介した抗体産生における IFN- γ の役割を調べるために、WT マウスに IFN- γ に対する中和抗体を投与したところ、コントロール IgG 投与群と比較して PPV 接種後 14 日目の IgG 抗体産生を有意に減少させた (図 10)。

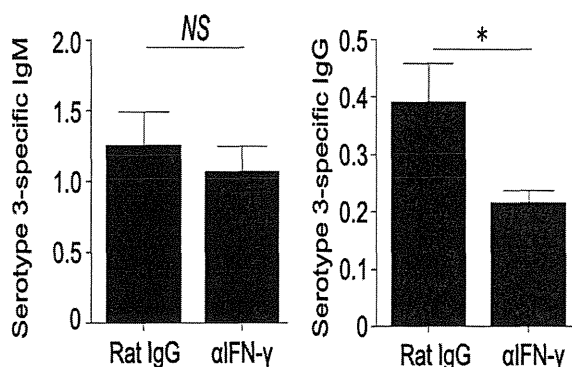


図 10. 肺炎球菌多糖抗原による抗体産生における IFN- γ 中和の影響

PPV による IgG 抗体産生は抗 IFN- γ 抗体投与によって有意に減少した。* $p < 0.05$

この結果から、PPV 接種後の IgG 産生への IFN- γ の関与が示唆されたため、Dectin-2KO マウスに rIFN- γ 及びその上流で働く rIL-12 を投与し PPV 接種による IgG 抗体産生への影響を検討した。図 11 に示すように、Dectin-2KO マウスにいずれのサイトカインを投与しても、Dectin-2KO マウスで低下していた PPV 接種後の IgG 抗体産生が WT マウスと同程度まで回復した。

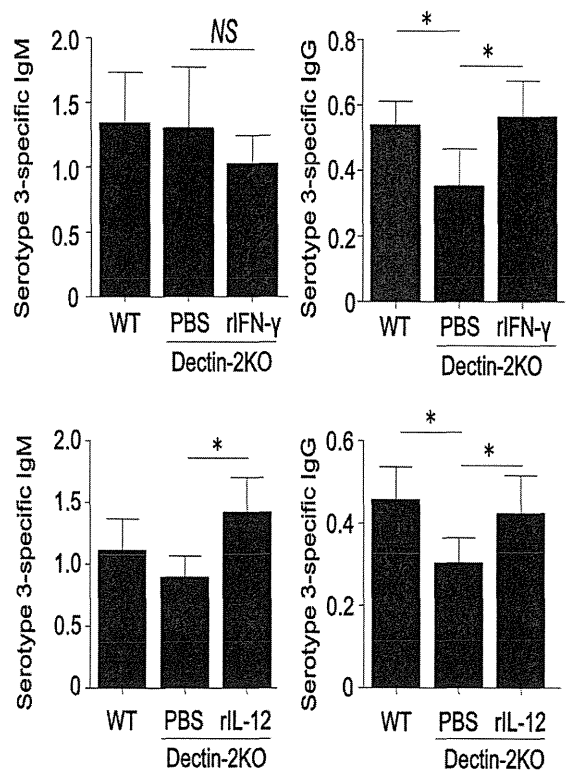


図 11. 肺炎球菌多糖抗原による抗体産生における IFN- γ 、IL-12 投与の影響

Dectin-2KO マウスで低下していた PPV による IgG 抗体産生は rIFN- γ または rIL-12 の投与により有意に増加した。* $p < 0.05$

PPV 接種後 9 日目の血清 IL-12p40 濃度を測定したところ、WT マウスに比べ Dectin-2KO マウスで有意に低下していた。これらの結果から、IFN- γ が PPV による IgG 抗体産生に深く関与することが明らかとなった。

3) 肺炎球菌感染防御における Dectin-2 の役割 :

これまで PPV 接種による IgG 抗体産生への Dectin-2 の重要性を明らかにしてきたが、次に肺炎球菌そのものに対する感染防御への Dectin-2 の役割についても解析を行った。WT マウスと Dectin-2KO マウスに肺炎球菌を感染させ生存率を比較したところ、Dectin-2KO マウスで有意な低下が観察された (図 12)。

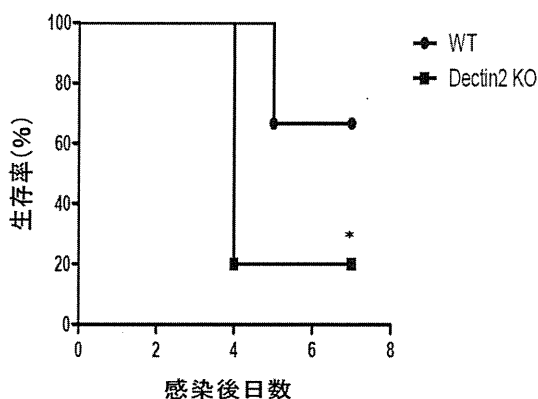


図 12. 肺炎球菌感染防御における Dectin-2 欠損の影響

WT、Dectin-2KO マウスに肺炎球菌を感染させ、生存率を調べたところ、Dectin-2KO マウスでは生存率の低下を認めた。* $p < 0.05$

さらに、肺炎球菌感染 3 日後の肺内生菌数を調べたところ、WT マウスと比較して、Dectin-2KO マウスでは有意に肺内生菌数が増加していた (図 13)。これらの結果から、Dectin-2 は PPV 接種による IgG 抗体産生だけでなく肺炎球菌感染防御にも重要なことが明らかとなり、肺炎球菌感染予防において重要な分子であることが確認できた。

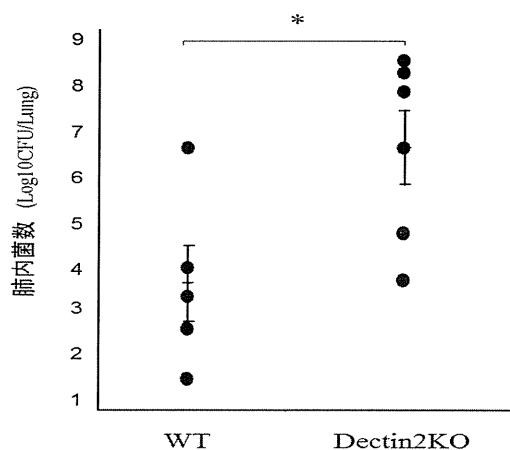


図 13. 肺炎球菌感染防御における Dectin-2 欠損の影響

WT、Dectin-2KO マウスに肺炎球菌を感染させ、感染 3 日後の肺内生菌数を調べたところ、Dectin-2KO マウスでは有意な菌数の増加を認めた。* $p < 0.05$

D. 考察

肺炎球菌は 90 種類以上の血清型が存在する。多くの肺炎球菌株に対して有効な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を解析した。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、血中の抗原特異的 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。今年度の解析にて、併用ワクチンによる肺炎球菌感染防御効果は血清 3 型及び 6B 型の菌株を用いた解析で示された。次年度以降、さらに他の血清型の菌株に対する感染防御効果を解析する予定である。

肺炎球菌蛋白抗原・糖脂質併用ワクチンの接種により、頸部リンパ節にて蛋白抗原に対する IgG 抗体産生 B 細胞が検出された。しかし、解析した時点においては脾臓では IgG 抗体産生 B 細胞が検出されなかったことより、本併用ワクチンの経鼻接種において、少なくとも接種後早期の時点においては、接種部位の所属リンパ節である頸部リンパ節において、抗体産生を誘導する免疫応答がおこると考えられた。そのことから、本併用ワクチンの経鼻接種では肺炎球菌感染部位において、抗体産生が誘導されることから有効性が期待される。

本研究では、蛋白抗原に対する免疫応答を誘導するアジュバント効果を期待して、NKT 細胞を活性化する糖脂質抗原を用いている。糖脂質抗原による NKT 細胞の活性化により、B 細胞刺激を誘導し、抗体産生が増強されることが示唆された。次年度以降、肺炎球菌蛋白抗原・糖脂質併用ワクチン投与による抗体産生誘導機序の解明を目指し、NKT 細胞の活性化や B 細胞の抗体産生を補助する濾胞性 T 細胞の誘導などの解析を行う予定である。

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 -マンナン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。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ているが、細菌感染防御における役割に関しては明らかになっていない点が多い。

これまでの我々の研究で、Dectin-2KO マウスでは PPV を接種後の血清 3 型莢膜多糖に対する血清中 IgG 抗体価が有意に低下することが分かった。一方、ヒトでは PPV 接種により血清中の特異的 IgG2 抗体が上昇することが報告されており、マウスでは IgG3 がヒトの IgG2 に相当するサブクラスであることが知られている。本研究では、IgG3 抗体についても同様な解析を行い、血清型 3、6B、14、19F、23F のすべてにおいて、Dectin-2 欠損によりその産生が低下することを明らかにした。この結果から、Dectin-2 が PPV 接種によりヒトで増加する IgG2 抗体産生に深く関与する可能性が示唆された。

IL-12 は NKT 細胞からの IFN- γ 産生を誘導することから、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。この可能性と一致して、本研究でも PPV 接種後に、Dectin-2 依存的に脾細胞

中 NKT 細胞の CD69 の発現増加、細胞内 IFN- γ の産生増加が観察された。また、PPV 接種マウスに糖脂質抗原、あるいは rIFN- γ を投与すると、Dectin-2KO マウスにおいて減少した IgG 抗体産生が回復した。さらに、PPV 接種マウスに抗 IFN- γ 中和抗体を投与すると、WT マウスでの IgG 抗体産生を有意に低下させた。興味深いことに、Snapper らの研究グループも、II 型胸腺非依存性抗原であるデキストラン標識抗 IgD 抗体によって刺激を受けたマウス B 細胞による IgG2 および IgG3 の産生が IFN- γ の存在下で誘導されることを報告している。このように、肺炎球菌ワクチンのような II 型胸腺非依存性抗原に対する抗体産生では、IgG へのクラススイッチにおいて IFN- γ がその過程に大きく関与する可能性が示唆された。

これまで PPV 接種による IgG 抗体産生への Dectin-2 の重要性を明らかにしてきたが、本研究では肺炎球菌そのものに対する感染防御への Dectin-2 の役割についても解析を行った。Dectin-2KO マウスでは、WT マウスに比べ、肺炎球菌感染後の生存率が低下し、感染 3 日後の肺内生菌数が増加することが明らかとなり、Dectin-2 が PPV 接種による IgG 抗体産生だけでなく肺炎球菌感染防御においても重要なことが明らかとなり、肺炎球菌感染予防において重要な分子であることが確認できた。

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

本研究では、多くの肺炎球菌株に対して有効な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をマウスモデルで解析した。肺炎球菌蛋白抗原と糖脂質抗原の併用ワクチンは、蛋白抗原に対する IgG 抗体産生を増強させ、感染防御効果を高めることが明らかになった。本併用ワクチンでは、糖脂質抗原により NKT 細胞が活性化され、抗体産生 B 細胞の誘導を促進すると考えられた。本併用ワクチンは経鼻接種を行ったが、頸部リンパ節において IgG 抗体産生 B 細胞が検出され、肺炎球菌の感染部位で感染防御に必要な免疫応答が誘導されることから、肺炎球菌感染症を予防するのに有効であることが示唆された。

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も明らかにした。また、肺炎球菌多糖ワクチンによる抗体産生においても NKT 細胞が重要な役割を担うことが分かった。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であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyasaka T, Akahori Y, Toyama M, Miyamura N, Ishii K, Saijo S, Iwakura Y, Kinjo Y, Miyazaki Y, Oishi K, Kawakami K. Dectin-2-dependent NKT cell activation and serotype-specific antibody production in mice immunized with pneumococcal polysaccharide vaccine. *PLoS One* 8(10): e78611, 2013.

2. Kinjo Y, Kitano N, Kronenberg M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. *J Infect Chemother.* 19:560-570, 2013.

3. 金城雄樹. 特集 注目される natural killer T (NKT) 細胞 2. 感染防御に重要な NKT 細胞. 血液フロンティア. 23:33-39, 2013.

4. 金城雄樹. 感染症ワクチン戦略における iNKT 細胞の活性化の応用. 医学のあゆみ. 246:188-189, 2013.

2. 学会発表

1. 井澤由衣奈, 大川原明子, 朴 貞玉, 金子幸弘, 川上和義, 竹山春子, 大石和徳, 金城雄樹. 肺炎球菌感染に対する蛋白・糖脂質併用ワクチンの防御効果. 第24回日本生体防御学会学術総会. 7月10-12日, 2013年, 熊本.

2. 金城雄樹, 金子幸弘, 朴 貞玉, 川上和義, 大石和徳, 宮崎義継. 肺炎球菌蛋白・糖脂質併用ワクチンのマウスモデ

ルによる評価. 第62回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第60回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 10月30-11月1日, 2013年, 東京.

3. 渡邊祐里絵, 宮坂智充, 石井恵子, 金城雄樹, 宮崎義継, 大石和徳, 川上和義. 肺炎球菌莢膜多糖ワクチンによる Dectin-2 依存的な NKT 細胞活性化と抗体産生. 第62回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第60回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 10月30-11月1日, 2013年, 東京.

4. 金城雄樹. 特別講演1 感染免疫における iNKT 細胞の役割. 感染症研究グローバルネットワークフォーラム2013. 11月30日, 2013年, 千葉.

5. Yuina izawa, Akiko Okawara, Keigo Ueno, Kazuyoshi Kawakami, Yuki Kinjo. Glycolipid mediated NKT cell activation enhances protective effect of protein vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. Annual meeting of the Japanese Society for Immunology, 2013. Dec11-13, 2013, Chiba.

6. 金城雄樹. iNKT 細胞を介した肺炎球菌感染防御. 糖鎖免疫 2014. 2月17-18日, 2014年, 東京.

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

