

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10013

研究課題名(和文) 酸化鉄ナノ粒子を用いた粘膜免疫を標的とする新規肺炎球菌ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of a novel pneumococcal vaccine with iron oxide nanoparticle for mucosal immunity

研究代表者

石井 恵子 (Ishii, Keiko)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00291253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺炎球菌のすべての血清型の菌に存在するpneumococcal surface protein A (PspA) を酸化鉄ナノ粒子(iron oxide nanoparticle: IONP)に独自の方法で結合させることにより、PspA-IONP を作成した。PspA-IONPのマウス気管内への投与により、粘膜および全身でPspA単独よりも高いIgG産生が認められ、粘膜ではPspA単独では起こらないIgAの産生を認めた。免疫後のマウスに肺炎球菌を感染させると、肺や脳での菌の増殖が抑制され、生存率が著しく改善したことから、PspA-IONPが粘膜ワクチンとして有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の肺炎球菌ワクチンは一部の血清型の菌に有効であるが、ワクチンに含まれない血清型の菌が増加する「血清型置換」の解決が課題となっている。本研究では、すべての血清型の菌に存在するpneumococcal surface protein A (PspA) を酸化鉄ナノ粒子(iron oxide nanoparticle: IONP)に独自の方法で結合させたPspA-IONPを作成し、マウスでその効果を実証した。IONPは吸入用ドライパウダー製剤化を目指したアジュバントであり、他のワクチンにも応用可能である。

研究成果の概要(英文)：We constructed a novel pneumococcal vaccine, PspA-IONP, consisted of pneumococcal surface protein A (PspA) and iron oxide nanoparticle (IONP) with a novel technique. Intratracheal immunization of mice with PspA-IONP induced high levels of systemic PspA-specific IgG antibody than with PspA alone and mucosal PspA-specific IgA antibody that was not detected with PspA alone. When the PspA-IONP-immunized mice were infected with Streptococcus pneumoniae, bacterial proliferation was suppressed, and survival was markedly improved. These results suggest the availability of PspA-IONP as a mucosal immunity-inducing pneumococcal vaccine.

研究分野：感染免疫学

キーワード：新規肺炎球菌ワクチン ユニバーサルワクチン 酸化鉄ナノ粒子 アジュバント 感染防御効果

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺炎の原因細菌とワクチン：研究開始当初に得られていた平成 28 年の厚生労働省の人口動態統計で、肺炎は我が国の死亡原因の第 3 位であり、肺炎による死亡者の 97.3%が 65 歳以上であった。肺炎の主な原因微生物は肺炎球菌であり、子供の鼻咽頭粘膜に定着した菌が高齢者や基礎疾患を有する患者に伝播すると、髄膜炎などの重篤な侵襲性感染症を引き起こすため、ワクチンによる予防が重要である。肺炎球菌は厚い莢膜を持つため、感染後に出現する莢膜多糖抗体がオプソニンとして働くことにより好中球による排除が進行する。そのため、莢膜多糖を抗原とする PPSV23 や、小児への有効性を高めるために莢膜多糖を不活化ジフテリア毒素と結合させた PCV10 及び PCV13 がワクチンとして用いられている。肺炎球菌の莢膜は 90 種以上の血清型に分類されており、現行のワクチンはそれぞれ 23、10、13 種類の血清型の莢膜多糖を抗原として使用している。PCV10 及び PCV13 が小児に使用されるようになって以降、ワクチンに含まれる血清型の菌は減少したが、ワクチンに含まれない血清型の菌が増加する傾向が認められ、血清型置換（セロタイププリプレイスメント）として問題となっていた。

(2) 新規肺炎球菌ワクチンの開発：現行のワクチンはカバーする血清型が少ないことから、より多くの血清型の莢膜多糖を含む PCV15 や PCV20 の開発が進んでいた。しかしながら、90 種以上の血清型全てはもとより、流行を起こす約 30 種の血清型の莢膜多糖を加えることも技術的に難しいと考えられている。そのため、血清型に左右されないユニバーサルワクチンが模索されている。菌全体をワクチンとして使用するために弱毒菌が検討されていた。この場合、多種類の表面成分も抗原となるため、莢膜多糖の血清型は問題とならない。一方で、血清型にかかわらず肺炎球菌に共通の細胞壁成分や分泌物質がリコンビナントタンパク質として作製され、抗原として用いられた。抗原タンパク質とアジュバントについて、種々の組み合わせが試されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は肺炎球菌の新規ユニバーサルワクチンを開発することを目指して行った。抗原として、これまでにユニバーサルワクチンで実績がある pneumococcal surface protein A (PspA)を用いた。本研究の新規性は、アジュバントとして酸化鉄ナノ粒子(iron oxide nanoparticle; IONP)を用いた点にある。IONP は核磁気共鳴画像法 (MRI) の造影剤として医療応用される安全な物質であり、マクロファージなどの貪食細胞に取り込まれやすい性質をもつことから、ワクチン効果を高めることを期待した。また、乾燥に強く安定であることから、鼻腔や咽頭に噴霧するパウダーワクチンとして製剤化することを視野に入れ、粘膜免疫の誘導を期待した。本研究では、独自の方法で PspA に酸化鉄ナノ粒子を結合させて PspA-IONP を作製し、経気道的に免疫したマウスの肺炎球菌感染モデル系を用いて、ワクチン効果を検証した。

## 3. 研究の方法

(1) PspA-IONP ワクチンの作製：PspA を大腸菌で発現するプラスミドは大阪大学明田幸宏博士より分与された。このプラスミドに IONP と結合させるためのアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を挿入し、大腸菌で発現させた IONP 結合性 PspA をアフィニティークロマトグラフィー法で精製した。LPS を除去したのち、IONP と結合させ、PspA-IONP を作製した。

(2) PspA-IONP は C57BL/6 マウスに経気道的に週 1 回の頻度で 3 回投与した。この免疫マウスにおける免疫の誘導は気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中および血清中の抗 PspA-IgA, IgG, IgE 抗体などの産生によって評価した。肺感染防御効果は、免疫後のマウスおよび免疫マウスの血清を経静脈投与したマウスに肺炎球菌 (WU2 株) を経気道的に感染させ、肺内菌数を測定して評価した。血流を介した播種感染防御効果は、経静脈的に肺炎球菌を感染させた免疫マウスにおける脳内菌数と生存率により評価した。

## 4. 研究成果

(1) PspA-IONP の作製：酸化鉄ナノ粒子にタンパク質を結合させる方法を開発し、PspA-IONP を作製した。

(2) PspA-IONP で免疫したマウスにおける粘膜免疫誘導：PspA-IONP で経気道的に免疫したマウスの BALF 中に、PspA 単独よりも約 100 倍多い IgG の産生および、PspA 単独では検出されなかった IgA の産生を認めた (図 1A)。一方血清中では、PspA 単独よりも約 100 倍多い IgG の産生が認められ、IgA は検出されなかった (図 1B)。これらの結果から、IONP は PspA による免疫応答を活性化するとともに、粘膜関連リンパ組織 (membrane-associated lymphoid tissue: MALT) における IgA へのクラススイッチを誘導するアジュバントとして機能することが示唆された。また、アレルギーを引き起こす IgE は BALF、血清のいずれでも検出されなかったことから、ワクチンとしての安全性に関する懸念が一つ解決された。

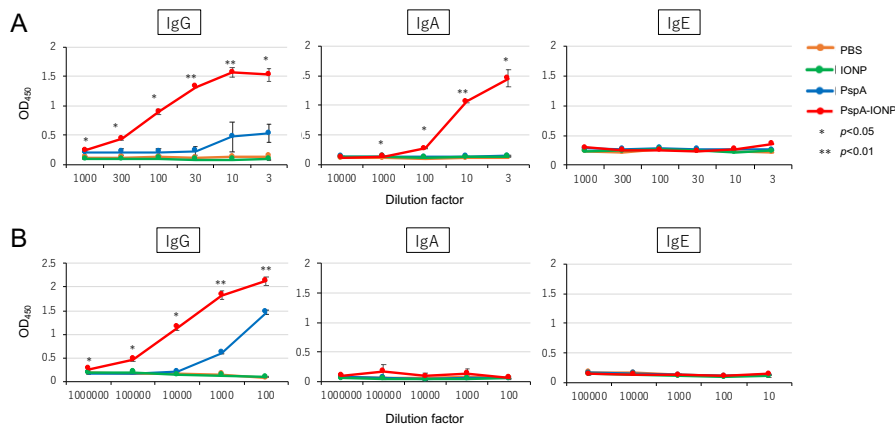


図1. PspA-IONP免疫マウスにおけるPspA特異的抗体産生 A: BALF, B: 血清

(3) PspA-IONP による肺感染防御：PspA-IONP で経気道的に免疫したマウスに経気道的に肺炎球菌を感染させたところ、肺内生菌数は PspA 単独投与マウスに比べ有意に低下した (図 2A)。また、PspA-IONP で経気道的に免疫したマウスから採取した血清を血中に移入したマウスにおいても、肺での菌の増殖が抑制された (図 2B)。これらの結果は、PspA に IONP を結合させたことにより、肺での局所感染防御作用が増加したことを示し、その作用に粘膜上に分泌された PspA 特異的 IgA や血清中の多量の PspA 特異的 IgG 抗体が寄与したことを示唆する。

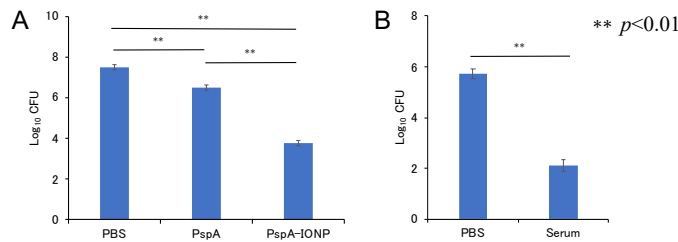


図2. PspA-IONP免疫マウス (A) および PspA-IONP免疫マウスの血清を移入したマウス (B) に肺炎球菌を経気道的に感染させた後の肺内生菌数

(4) PspA-IONP による播種感染防御：PspA-IONP で経気道的に免疫したマウスに経静脈的に肺炎球菌を感染させたところ、脳内生菌数は PBS 投与マウス及び IONP 単独投与マウスに比べ低下し、PspA 単独免疫マウスと同等であった (図 3A)。この結果は、PspA 及び PspA-IONP によって誘導された IgG が血流中の肺炎球菌の脳への播種を抑制したことを示す。しかし、生存日数の延長は PspA-IONP 免疫マウスの全てで見られた一方、PspA 単独では一部のマウスに見られたのみであった (図 3B)。この結果から、PspA-IONP により誘導された血流中の大量の IgG が脳以外の組織での菌の増殖に抑制的に働いたと推測される。

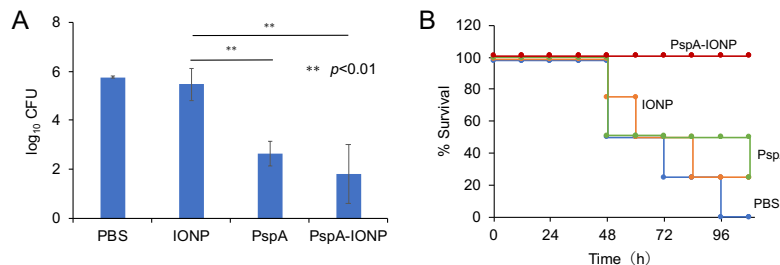


図3. PspA-IONP免疫マウスへの肺炎球菌の経静脈感染後の脳内生菌数 (A) と生存時間 (B)

(5) まとめ：本研究では、PspA-IONP を作製し、そのワクチン効果を PspA 単独と比較することにより、IONP が粘膜 IgA の分泌や循環中の IgG を増加させる機能をもつことを明らかにした。IONP には任意の抗原タンパク質を結合させることができるため、IONP は様々なワクチンに利用可能な有用なアジュバントと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中平絢子、岩岡大貴、佐藤光、笠松純、石井恵子、川上和義
2. 発表標題 新規肺炎球菌ナノ粒子ワクチンによる抗体産生と感染防御効果
3. 学会等名 第30回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中平絢子、岩岡大貴、石井恵子、明田幸宏、川上和義
2. 発表標題 酸化鉄ナノ粒子を用いた新規肺炎球菌ワクチンの開発
3. 学会等名 第68回日本感染症学会東日本地方会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Nakahira, Hiroki Iwaoka, Ko Sato, Jun Kasamatsu, Keiko Ishii, Kazuyoshi Kawakami
2. 発表標題 Antibody production and host protection from pneumococcal infection by a novel nanoparticle vaccine
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	川上 和義  (Kawakami Kazuyoshi)  (10253973)	東北大学・医学系研究科・教授    (11301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	高見 誠一 (Takami Seiichi)  (40311550)	東北大学・多元物質科学研究所・准教授  (11301)	
連携研究者	宮坂 智充 (Miyasaka Tomomitsu)  (50709912)	東北医科薬科大学・薬学部・助教  (31305)	