

平成22年 5月 14 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20890017  
 研究課題名（和文） iNKT細胞とB-1B細胞移入による重症型急性肺炎治療の研究  
 研究課題名（英文） Therapeutic efficacy by adoptive transfer of iNKT cells and B-1B cells to severe acute bacterial pneumonia

## 研究代表者

山本 夏男 (YAMAMOTO NATSUO)  
 東北大学・病院・助教  
 研究者番号：50466562

研究成果の概要（和文）：iNKT細胞に依存したB-1B細胞の、肺感染後の活性化、脾臓への移動、脾臓内での抗ハプテンIgM抗体産生性の変化などが新しく観察された。肺初感染後2日以内に、腹腔由来B-1B細胞がactivation-induced cytidine deaminase (AID)依存的に感染抵抗性に寄与する点は極めて新しい知見である。

研究成果の概要（英文）：B-1B cells were rapidly activated by an acute lung infection with a crucial involvement of iNKT cells upstream. B-1B cells then migrate to the spleen where an increase of B-1B cell numbers were shown by the measurements of ELISPOT assay for anti-phosphorylcholine IgM producing cells. Further, the activated B-1B cells acted more protectively with utilizing activation-induced cytidine deaminase (AID) within 2 days post airway infection than their naïve status.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：感染症内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：(1) 肺炎球菌性急性肺炎 (2) B-1B細胞 (3) activation-induced cytidine deaminase (AID) (4) 抗ホスホリルコリン IgM抗体 (5) iNKT細胞 (6) 接触性過敏反応 (Contact Sensitivity; CS) (7) ELISPOTアッセイ (8) Interleukin (IL)-13

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺炎球菌の夾膜成分である低分子のホスホリルコリンに対するIgM抗体が、宿主防御的な応答をするという概念が1981年に確立された。またこのIgM抗体は体腔内に恒常

的に存在するB-1B細胞由来であるという点も当時明らかとなった。

(2) 他方、古典的な接触性皮膚炎の概念は、細胞性免疫主体でIFN- $\gamma$ に依存したTh1応答を主軸とすると考えられていた。しかしこの

応答に、皮膚免疫後に活性化した B-1B 細胞由来の IgM が重要であるという新しい概念が、P. W. Askenase らの研究室（エール大学医学部）より提唱された。これに加えて、B-1 細胞の惹起する CS 応答に、更に上流の iNKT 細胞機能や補体 C5a など積極的に寄与する点も同教室から 2002 年にかけて相次いで報告された。

(3) iNKT 細胞が肺炎球菌による急性気道感染防御に極めて重要な役割を持つという知見を、報告者らは琉球大学第一内科で 2003 年にかけて見出した。iNKT 細胞の役割は、免疫刺激後の極めて早い炎症応答の時相で IL-4 や IFN- $\gamma$  など、その後の免疫応答の方向を決定付ける重要なサイトカインを放出する点である。この細胞の肺感染時の機能を更に検討した。

(4) ハプテンによる皮膚免疫刺激、iNKT 細胞活性化と B-1B 細胞由来 IgM、局所炎症応答とメモリー T 細胞を含む局所細胞浸潤という一連の皮膚の炎症モデルが Askenase らにより確立された。夾膜成分にハプテンであるホスホリルコリンを含有する肺炎球菌は肺炎の原因となる代表的な微生物である。気道感染した際に、B-1B 細胞のみでなく iNKT 細胞が、肺局所で TNF- $\alpha$  を主軸とした Th1 関連応答を主体として宿主防御に重要な寄与をする点を報告者が明らかにした。

(5) 以上の学問的背景より、皮膚での局所炎症応答と、微生物による肺局所での炎症の両方に共通の機序を見出す可能性・仮説を 2004 年にかけて申請者らが提唱した。これを敷衍する目的で 2005 年 7 月より申請者が Askenase の教室で博士研究員として研究に 2 年間従事することとなった。

## 2. 研究の目的

肺炎球菌初感染による急性肺炎の初期に、炎症の惹起と宿主防御に寄与する B-1B 細胞と iNKT 細胞それぞれの役割と、両者の機能分担・接点・関連などを明らかにする。特に B-1B 細胞では、非感染時に生理学的に産生されている自然抗体と、感染発症後の初期抗体にどのような違いが生じるのかを検討する。iNKT 細胞に関しては、肺初感染後にどのようにして活性化し、更に B-1B 細胞をどのように活性化するのかを明らかにする目的で本研究を施行した。

## 3. 研究の方法

(1) 臨床的に重篤な肺炎患者より分離された肺炎球菌を、実験動物に気道経路で感染させる感染実験を中心に行った。肺感染後数日以内に肺内の生菌数をカウントし、肺炎の重症度を群ごとに定量した。宿主抵抗性の減弱し

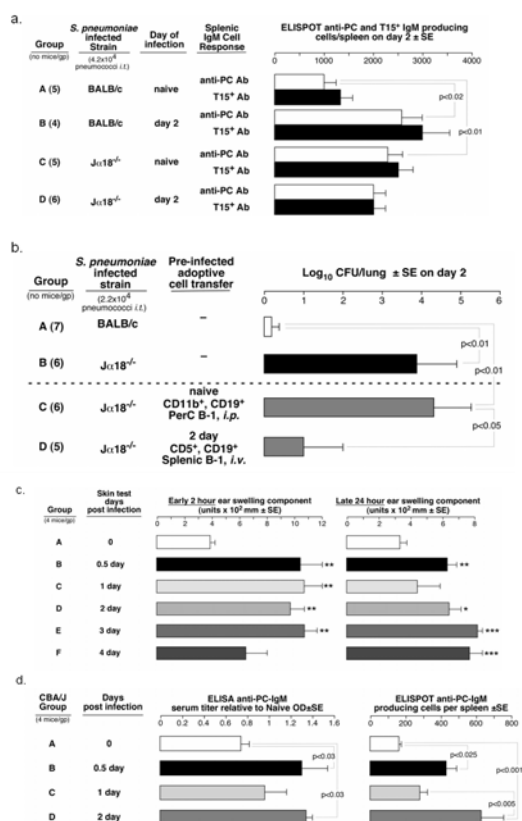
た群で、肺内の生菌数が有意に増加する場合には、生存期間も観察記録した。これは感染症予後に関する医学的に必要な情報と考えられるからであり、被実験動物の数と、与える苦痛を最小限とする配慮を行った。

(2) 免疫学的に健全なドナーより、肝臓由来 iNKT 細胞や腹腔由来、脾臓由来の B-1B 細胞などの自然免疫細胞を（フローサイトメトリーによる細胞分離精製も用いる）分離精製した。遺伝的に免疫機能不全を有する動物に、精製された自然免疫細胞を移植して養子免疫を行った。免疫不全を有する動物に比べて、自然免疫細胞移植を受けた群で、感染症（肺炎）治療効果が得られるか否かを検討した。

## 4. 研究成果

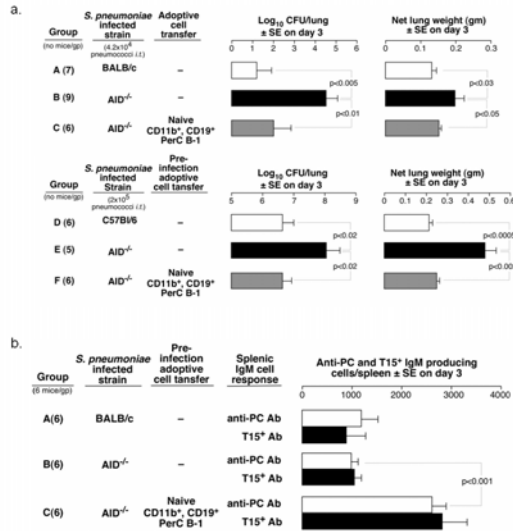
(1) B-1B 細胞の宿主保護的な応答には、感染後体腔での活性化と、脾臓への migration、そして感染微生物に対する迅速な獲得型 IgM 抗体産生などの機能が必要であると推測された。iNKT 細胞欠損マウスでは B-1 細胞の活性化が認められず、また獲得型早期 IgM 産生能も欠如している点を、ホスホリルコリン (PC) 産生脾臓細胞に対する ELISPOT アッセイで確認した (Fig 1, a, and b)。抗 PC IgM 産生脾細胞は急性肺炎後 12 時間で増加し、この増加とハプテンである PC への接触性過敏応答 (CS を ear response として測定した) が連鎖している点を初めて観察した (Fig 1, c, and d)。

Fig 1



(2) 2008 年度の成果要旨は、①急性肺炎における B-1B 細胞の宿主保護機構、②①における B-1B 細胞の iNKT 細胞(iNKT 細胞による活性化)依存性、③急性肺炎による腹腔 B-1B 細胞の脾臓への移動と活性化、④急性肺炎後の CS 応答の活性化、⑤B-1B 細胞由来の IgM に関与する AID 機能の重要性 (Fig 2, a, and b) などである。

Fig 2



(3) 以上の研究結果は既に論文化しており、投稿作業を行っている。世界的に認められた学術雑誌の査読者による査読と評価を受けている時期であり、本報告書記載時にはまだ受理決定はなされていない。

(4) 2009 年度の観察事項と、新しい知見は以下の通りであった。iNKT 細胞の産生する重要で代表的なサイトカインは IL-4 と IFN- $\gamma$  である。このそれぞれを単独で欠損したマウスに肺炎球菌を気道感染させ、コントロールとしての野生型と比較しても、肺内 CFU や生存期間に有意な差異が認められなかった。

(5) IL-4 と類似の生理学的な機能を有する IL-13 に関して更に検討する目的で、IL-4 および IL-13 を同時に欠損 (IL-4/13 両欠損) したマウスを用いて同様の気道感染実験を行ったところ、感染抵抗性が有意に減弱した (Fig 3a)。これより IL-13 単独欠損マウスを千葉大学中山俊憲先生より供与いただき、同様の実験を敷衍した。

(6) IL-13 単独欠損マウスでは、コントロールの野生型に比べて気道感染後の肺内生菌数増加や (Fig 3b)、静脈感染後の平均生存時間の有意な短縮が認められた (Fig 3c)。更に野生型で観察される感染後脾臓内の抗 PC 産生細胞の有意な増加が、IL-13 を欠損すると欠如していた。これは 2008 年度に観察した

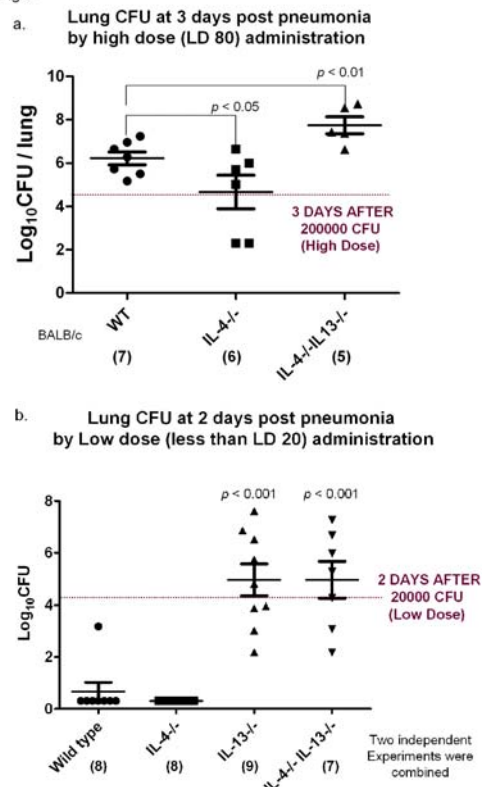
iNKT 細胞欠損マウスと同様の現象であった。(7) iNKT 細胞との関連有無を検討する目的で、iNKT 細胞の豊富な肝臓、B-1 細胞の豊富な脾臓、肺腔内の細胞を感染動物より採取・単離して IL-13 欠損動物へ移入すると、肺内 CFU が有意に改善し、治療効果が得られた。

(8) また IL-13 は感染前後の肺組織からはほとんど検出されず、血清中、また感染後 3 日に肺所属リンパ節内の T 細胞から産生されていることを確認した。

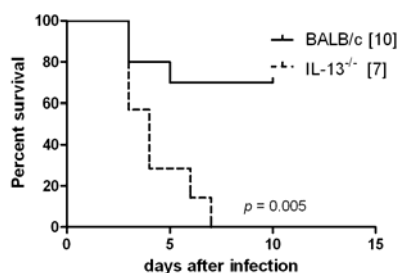
(9) 以上の結果は、①宿主予後に寄与する IL-13 が iNKT 細胞由来である可能性、②また①の IL-13 が肺炎球菌感染症における宿主保護機構の中で液性因子を介した重要な因子である可能性、③2008 年度までに観察した B-1B 細胞の機能に IL-13 が寄与している可能性、などを示唆している。

(10) (9) で推察した全ての事項が新しい知見であり、今後の研究課題として重要であると報告者は考えている。これらの可能性については、2010 年度より、新たに報告者が研究代表者として開始している基盤研究 C の研究課題 (研究課題番号 22591103) 「IL-13 と B-1 細胞による急性感染症予後制御機構」として更に研究を発展させていく予定である。

Fig 3



c Survival proportions post intravenous infection with *S. pneumoniae*



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 山本夏男、金光敬二、B-1 細胞と呼吸器疾患、炎症と免疫、査読無、18 巻、2010 年 (in press)

[学会発表] (計9件)

- ① Yamamoto N, Steven KM, Aoyagi T, Charles DC, Kunishima H, Kawakami K, Kaku M, Askenase PW, et al. Pathogen specific IL-13-producing T cells and B-1B cell interaction in lung associated lymph nodes and spleen. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009年12月2日 大阪国際会議場 (大阪府)

- ② Yamamoto N, Steven KM, Aoyagi T, Hatta M, Kunishima H, Miyazato A, Hirakata Y, Kawakami K, Kaku M, Askenase PW, et al. IL-13 Dependent Early Protective Role of B-1 Cell Function in Acute Bacterial Pneumonia. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 2009年6月12日 東京国際フォーラム

- ③ 宮坂智充, 青柳哲史, 内山美寧, 國島広之, 山本夏男, 平瀧洋一, 石井恵子, 大石和徳, 賀来満夫, 川上和義. 23価肺炎球菌ワクチンに対する液性免疫応答と、natural killer T細胞の役割に関する検討 第83回日本感染症学会総会学術講演会 2009年4月23日 京王プラザホテル(東京都)

- ④ Yamamoto N, Steven KM, Kawakami K, Kaku M, Askenase PW. Roles of B-1B cells and AID in early acquired resistance to acute *S. pneumoniae* lung infection.

第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月1日 国立京都国際会館 (京都府)

- ⑤ Yamamoto N, Steven KM, Kawakami K, Kaku M, Askenase PW. IL-13 Dependent Role of Early Protective B-1 Cell Function in Lung Infection with *S. pneumoniae*. 第48回国際化学療法学会(ICAAC) 2008年10月28日 Washington Convention Center (ワシントンDC, USA)

- ⑥ Yamamoto N, Kunishima H, Charles DC, Steven KM, Marian S, Kawakami K, Askenase PW, Kaku M. IL-13 dependent protective role of early B-1 cell function in lung infection with *S. pneumoniae*. 第8回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2008年9月9日 あわじ夢舞台国際会議場(兵庫県)

- ⑦ 山本夏男, Steven K., 青柳哲史, 丹野大樹, 國島広之, 川上和義, 賀来満夫, Philip W. Askenase. B-1B 細胞由来獲得型 IgM 抗体が急性細菌肺炎時に AID 及び IL-13 依存的に応答する機構の解明 3 学会合同大会(第 73 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会/ 第 19 回日本生体防御学会学術総会/ 第 45 回補体シンポジウム)、2008 年 7 月 11 日 北海道大学学術交流会館 (北海道、札幌市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/kenkyu/Profiles/39/0003823/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 夏男 (YAMAMOTO NATSUO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50466562

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：