

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08848

研究課題名(和文) 鼻咽頭定着の制御に基づく新たな肺炎球菌感染症予防法の開発

研究課題名(英文) Development of preventive method for pneumococcal infection based on control of nasopharyngeal colonization

研究代表者

中村 茂樹 (Nakamura, Shigeki)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：20399752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌上気道免疫の病態解明においてNKT細胞と肺炎球菌の線毛タンパクに着目した。鼻咽頭定着実験を行ったが、NKT細胞KOマウスと野生型マウスと比較し定着菌数に有意差は認めなかった。またNKT細胞のリガンドである α -GalCerを投与したが、非投与群との間で定着菌数に有意差は認められなかった。次に線毛piliの粘膜接着における役割を解析するためのpili欠損株の作成、およびワクチン抗原として使用するためのpiliタンパクのクローニング・精製作業を行なった。今後の方針は、精製タンパクでマウスを免疫し特異的抗体量を測定、免疫したマウスの鼻咽頭定着菌数の評価、線毛遺伝子破壊株の機能解析を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺炎球菌感染症において鼻咽頭定着は感染症発症の第一段階として極めて重要である。また無菌環境の下気道とは異なり、鼻咽頭は常在細菌叢が存在するため、粘膜免疫応答もまた異なる。本研究は、鼻咽頭免疫の詳細を解明し、新たな同定した宿主因子および細菌側因子を介して粘膜免疫を活性化することで肺炎球菌の定着を抑制し、感染症の発症そのものを制御できる点で、既存のワクチンとは異なる新規性の高い予防法であり学術的意義は高い。また表層タンパクをワクチン抗原に使用するため莢膜型に依存することのない全肺炎球菌型の予防ワクチン開発につながる可能性があり、社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathogenesis of pneumococcal upper respiratory tract immunity, we focused on NKT cells and pili proteins of pneumococci. We conducted nasopharyngeal colonization experiments with NKT cell KO mice, but no significant difference was observed in the number of colonized bacteria in the nasopharynx compared with wild-type mice. In addition, α -GalCer, a ligand for NKT cells, was administered, but there was no significant difference in the number of colonized bacteria in the nasopharynx between the non-administered group and the control group. Next, we created pili-deficient strains to analyze the role of pili in mucosal adhesion, and cloned and purified the pili protein for use as a vaccine antigen. In the future, we will immunize mice with the purified protein, measure the amount of specific antibodies, evaluate the number of nasopharyngeal colonizers in the immunized mice, and perform functional analysis of the pili gene disruption strain.

研究分野：感染症内科学

キーワード：肺炎球菌 鼻咽頭定着 感染免疫 NKT細胞 線毛タンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国の死因統計において肺炎は第5位であり、臨床的重要度の高い疾患である。中でも肺炎球菌は成人市中肺炎で最も分離頻度の高く、髄膜炎など侵襲性感染症の原因菌としても重要である。肺炎球菌感染症の予防ワクチンは、現在莢膜多糖をワクチン抗原とする三種類の肺炎球菌ワクチン(23価莢膜多糖体ワクチンおよび13価/15価タンパク結合型ワクチン)が接種可能である。しかし肺炎球菌の莢膜血清型は100種類存在することから、近年、非ワクチン株による侵襲性感染症の増加が多数報告されており、現行ワクチンによる肺炎球菌感染症の予防にも限界がある。肺炎球菌をはじめとする呼吸器病原体は、まず宿主の鼻咽頭に定着後、局所で増殖し感染症を発症する。つまり鼻咽頭定着は感染症発症の第一段階として極めて重要である。また無菌環境の下気道とは異なり、鼻咽頭は常在細菌叢が存在するため、粘膜免疫応答もまた異なる。鼻咽頭定着の制御により続発する肺炎球菌感染症の抑制が可能となることが推察されるが、鼻咽頭(上気道)免疫に関しては依然として不明な点が多い。

ナチュラルキラーT細胞(NKT細胞)はMHCクラスI様タンパク質であるCD1dに提示された糖脂質抗原を認識する。下気道の肺炎球菌に対する免疫応答として、NKT細胞より産生されるIFN- γ が好中球遊走を促進し肺炎球菌性肺炎に対する宿主抵抗性を高めることが報告されている(Kawakami K, et al. *Eur J Immunol*; 2003)。しかしNKT細胞と肺炎球菌の鼻咽頭クリアランス機構との関連性を証明した報告はこれまでに認められない。

2. 研究の目的

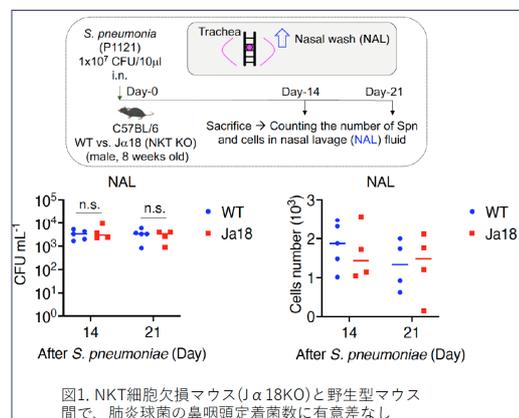
本研究は、肺炎球菌の鼻咽頭定着に重要な新規宿主因子や細菌側因子を明らかにし、その賦活化によって鼻咽頭定着を抑制し、続発する感染症の発症そのものを制御することを目的としたものである。肺炎球菌に対する上気道免疫の新たなプレーヤーとしてNKT細胞、そして細菌因子として線毛タンパクに着目し、鼻咽頭クリアランスにおける役割について検討した。

3. 研究の方法

先行研究においてNKT細胞KOマウスは野生型マウスと比較し、鼻咽頭定着21日後の定着菌数が増加することを確認していた。しかし、これまで使用していたNKT細胞KOマウス(J α 18 KO)において、NKT細胞以外の一部のT細胞にも影響が出ることが判明したため、2016年に理化学研究所で新たに樹立されたNKT細胞KOマウス(J α 18 KO)を購入し、これまでの研究成果の再現性について確認実験を行った。さらに、鼻咽頭定着に重要な細菌側因子を同定し、肺炎球菌のワクチン抗原として利用する新たなユニバーサルワクチン開発研究に着手した。

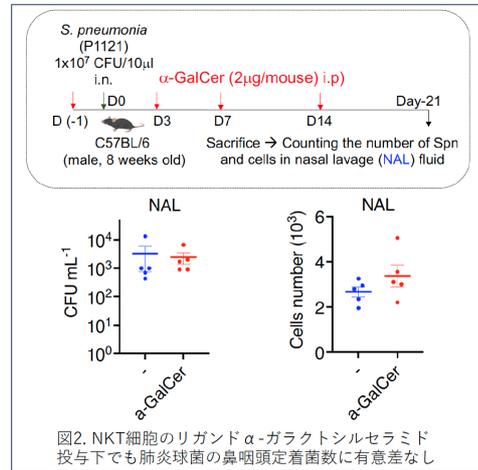
4. 研究成果

肺炎球菌の鼻咽頭定着マウスモデルを用いて、野生型マウス(8週齢,雄)およびNKT細胞KOマウスに対し、マウス鼻咽頭へ効率化かつ長期に定着する肺炎球菌P1121株(1×10^9 CFU/mL)を経鼻感染させ、14日後と21日後に鼻腔洗浄を行い、鼻咽頭定着菌数の経時的推移を評価した。その結果、これまで認められていたNKT細胞KOマウスにおける肺炎球菌感染21日後の鼻咽頭定着菌数の有意な増加が認められなかった(図1)。次にNKT



細胞のリガンドである α -ガラクトシルセラミド (2 μ g/匹)を肺炎球菌感染前、感染3日後、7日後、14日後に腹腔内投与し、肺炎球菌感染21日後の鼻咽頭定着菌数を確認したところ、やはりこれまでと異なり感染21日後の定着菌数の低下が認められなかった (図2)。

再現性が得られない理由が実験動物の変更が影響しているのか、肺炎球菌や研究手技の違いが影響しているのか不明であったが、NKT細胞欠損マウスを用いた鼻咽頭定着実験は一旦中断することとした。

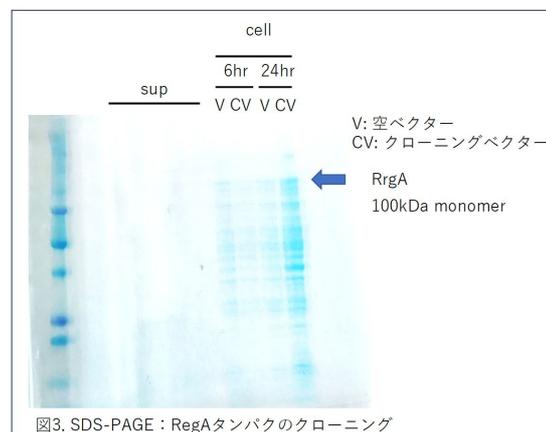


次に、鼻咽頭定着に重要な細菌側因子を同定し、肺炎球菌のワクチン抗原として利用する新たなユニバーサルワクチン開発研究に着手した。我々のこれまでの研究で、結合型肺炎球菌ワクチンの小児に対する定期接種導入によって、肺炎球菌の血清型置換現象が生じ、非ワクチン株、特に血清型35Bの肺炎球菌感染症が増加することが明らかとなった (J Infect Chemother. 2020)。さらに分離された35B株の多くが線毛遺伝子を有していることが分かり、菌血症をきたす高病原性株から、ワクチンの選択圧によって線毛 pili を発現し鼻咽頭のニッチ環境で長期定着を来す低病原性株へ変化している可能性が示唆された。そこで、鼻咽頭定着を制御する新たな肺炎球菌感染症の予防法として、鼻咽頭定着に重要な線毛に対する免疫を誘導し、血清型に依存しないユニバーサルワクチン開発を行うこととした。

本研究に際し、線毛 pili の粘膜接着における役割を解析するための pili 欠損株の作成、およびワクチン抗原として使用するための pili タンパクのクローニング・精製作業を進めることとした。

(1) pili 遺伝子破壊株の作成：ゲノム DNA から増幅したターゲット遺伝子の DNA 断片を TA cloning し、*E. coli* DH5 に形質転換。PCR断片とエリスロマイシン耐性遺伝子とつなぎ合わせ作成した遺伝子破壊用 DNA を肺炎球菌に形質転換し、エリスロマイシン含有培地で遺伝子破壊株を選択した。

(2) pili タンパクのクローニング・精製：肺炎球菌 (TIGR4 株)をヒツジ血液寒天培地 (5%CO₂ 存在下 37 度)で培養後、コロニーからシカジニアス DNA 抽出試薬を用いて PCR テンプレートを調製した。線毛タンパク質をコードする RrgA 領域を増幅するために、RrgA-FW(5' - ATGCTTAACAGGGAGACACA CATG-3')および RrgA-REV(5' - TTACGGATGTTCCGTGTGTATAA-3')のプライマーセットを用意し、アニール 55 度、伸長反応 72 度で PCR を行った。増幅した PCR 産物は、pCold DNA ベクターのマルチクローニングサイトに挿入し、発現用プラスミドを作製した。



発現用プラスミドで大腸菌 TaKaRa Competent Cells BL21 を形質転換し、アンピシリンを含む LB 培地に植菌後 37 度で培養した。OD₆₀₀ が 0.5 に到達した時点で培養液を 15 度に冷却し、0.1

mM となるよう IPTG を添加後、15 度で 24 時間培養した後の菌体とその上清を回収した。回収したサンプルから、SDS-PAGE で RrgA モノマーと想定されるおよそ 100kDa のバンドを確認した (図 3)。その後、標的遺伝子を PCR で増幅し、pET21b ベクターにクローニング後、大腸菌 BL21 株に導入する。大腸菌よりタンパクを抽出し HisTaq モノクローナル抗体を用いた western blot によりタンパクの存在を確認後、Ni-NTA レジンによって精製した。

今後の方針

- (1) 精製したタンパクによるマウスの免疫と線毛タンパク特異的抗体の産生量を ELISA で測定
- (2) 免疫したマウスに肺炎球菌を感染させ鼻咽頭定着菌数の経時的推移を評価
- (3) 線毛遺伝子破壊株を用いた機能解析として、肺胞上皮細胞 A549 cell line による *in vitro* 実験系を用いて野生株および pili 遺伝子欠損株の細胞接着性の評価を行う。

今回の検討によって、宿主免疫だけでなく、定着関連病原因子を特定し免疫することで、鼻咽頭定着の制御による新たなワクチン開発の可能性を示すことができた。本研究結果を基盤として、今後も研究を継続していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------