

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月22日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590115

研究課題名（和文）肺炎球菌莢膜糖鎖ワクチンに対する免疫記憶成立のメカニズム解析

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of immunological memory against the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*

研究代表者

築地 信 (TSUIJI MAKOTO)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90302611

研究成果の概要（和文）：肺炎球菌莢膜糖鎖ワクチン(PneumoVax23)の投与を受けた被験者においては、IgM陽性記憶細胞集団中に、投与された糖鎖を特異的に認識する抗体を産生するB細胞クローンが誘導されることが分かっている。今回マウス腹腔内に肺炎球菌血清型3莢膜糖鎖(PPS3)を投与したところ3日後に多重反応性のB細胞の増加が見られ、7日後までに特異的なクローンが選択されていることが分かった。このことよりPPS3は免疫初期においてはTI-1型の活性を有し免疫記憶の成立に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus pneumoniae* is a common pathogen of pneumonia among children and elderly persons. To identify the population of B cells, which have an important role of inducing the primary responses and memory responses against pneumococcal polysaccharides, the pneumococcal polysaccharides of serotype 3 (PPS3) were injected into the peritoneal cavity of mice. We found that expansion of polyreactive IgM+ B cell clones were detected in spleen on day 3, afterward specific IgM+ B cell clones were selected on day 7. It suggests that PPS3 is thought as TI type 1 antigens during the primary phase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物・感染症学

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は、高齢者の死因のトップである肺炎の最大原因菌であり、その莢膜糖鎖は免疫応答から逃れる特徴的構造を有している。

抗原性としてのエピトープはまだ不明な点がある。現在、臨床において莢膜糖鎖ワクチンが使用され投与の効果が報告されつつあるが、その詳細な分子メカニズムについて十分な知見が得られていない。肺炎球菌糖鎖ワ

クチン (Pneumovax23) の投与を受けた被験者においては、IgM 陽性記憶 B 細胞集団中に、投与された糖鎖を特異的に認識する抗体を産生する B 細胞クローンが誘導され、その抗体が細菌に対する免疫応答に重要な役割を担うことが推測された。そこで、マウスへの糖鎖ワクチン投与によって (1) 免疫記憶成立が起こっているか？ (2) 誘導される抗体が肺炎球菌の感染予防として機能しうる抗体であるか？ の疑問点の解明を目的とし本研究を計画した。本研究によって得られる知見は、臨床現場での使用方法に有用な情報を与えるとともに、普及率を上げることに貢献し、肺炎発症率の減少が期待される。さらに他の莢膜糖鎖を有する細菌に対する免疫応答の解明へのヒントを提供できることと、更なる効果的なワクチンの開発に貢献できる。免疫学へのインパクトは、T 細胞非依存性と依存性の免疫応答の解明に貢献できることであり、自己免疫や癌免疫における糖鎖抗原の自己と非自己の識別の分子メカニズムの解明に貢献することにより、糖鎖生物学への大きなインパクトが期待される。

2. 研究の目的

肺炎球菌、髄膜炎菌、インフルエンザ菌に代表される感染能力の高い病原性細菌は、細菌表層に莢膜糖鎖を有していることが特徴である。莢膜糖鎖は、初期免疫を司る貪食能を有する顆粒球やマクロファージなどに対して貪食への抵抗性を示し、ホスト側の免疫システムから逃れることができ、細菌の増殖に有利である。

特に肺炎球菌は肺炎の最大原因菌であり、高齢者や幼児のみならず、最近話題となっているインフルエンザウイルス感染後の致命的な 2 次感染の原因菌となる細菌である。

肺炎球菌の莢膜糖鎖は、Galactose を主成分とし、主鎖の繰り返し構造や側鎖の修飾の違いなどにより 90 種類以上の多様なセロタイプが存在することと、強い免疫応答を誘導する黄色ブドウ球菌などとは異なる構造のリポテイコ酸を有することが、肺炎球菌の免疫応答から逃れる特徴であり、この特徴的構造については、NMR などにより精力的に解析が進められているが、抗原性を有するエpitep構造については、まだ不明な点が多い。

現在、臨床においては、肺炎球菌、髄膜炎菌、インフルエンザ菌に対して、細菌からの精製糖鎖が主成分である糖鎖ワクチンが使用され、投与の効果が報告されつつあるが、その詳細な分子メカニズムについて十分な

知見が得られていないのが現状である。さらに、日本における肺炎球菌ワクチンの知名度が低く使われる機会が低いという問題点がある。米国においては、乳幼児にたいして殆どの人に投与されるということと、65 歳以上の高齢者の 60% を超えるひとがワクチン接種を受けているが日本では 1% にも達していない。

これら糖鎖ワクチンは莢膜糖鎖に対する抗体を誘導することにより、細菌のオプソニン化を促進させて貪食効率、抗原性を高めることが期待される効果であるが、その機能的抗体の誘導と免疫記憶の維持が重要なファクターであり、抗生物質に対する耐性獲得能力の高さの問題を解決するためにも、その分子メカニズムを明らかにすることは必要不可欠である。そこで、私は、研究課題として「肺炎球菌莢膜糖鎖ワクチンに対する免疫記憶成立のメカニズム解析」を行うことを計画した。

免疫応答において抗原除去に重要な抗体の産生を担う B 細胞は、抗原と出会った後に、末梢のリンパ組織で、クローンの選択、高親和性成熟、クラススイッチの現象を伴いつつ、記憶 B 細胞もしくは抗体産生プラズマ細胞へと分化する。私たちはこれまでに、シングル B 細胞の解析法を用いて、ヒト末梢血中の抗体クラスの違いを記憶 B 細胞画分について、糖鎖抗原の認識に重要な IgM 陽性画分と IgG 陽性画分では、ナイーブ成熟 B 細胞画分からの選択のされ方が、異なっていることを見つけた (Tsuiji et al., JEM 2006, Tiller et al., Immunity 2007)。さらに、肺炎球菌莢膜糖鎖ワクチン (Pneumovax23) の投与を受けた被験者においては、7.4% と高い割合で、投与された糖鎖に対する反応性を有する抗体を産生する B 細胞が存在しており、このヒト IgM 陽性記憶 B 細胞集団中に、外来糖鎖を特異的に認識する B 細胞クローンが誘導され、そこから産生される抗体が、その糖鎖を有する細菌に対する免疫応答に重要な役割を担うことが推測された (Tsuiji et al., JEM 2006, Tiller et al., Immunity 2007)。

そこで、この IgM 陽性記憶 B 細胞に注目した詳細な解析を計画し遂行してきた。これまでに、肺炎球菌血清型 3 莢膜糖鎖 (PPS3) をマウスに投与することで誘導される免疫応答を、(1) ELISA 法による血清の抗体価、(2) ELISPOT 法による抗体産生細胞数の測定によって記述する方法を確立した。

これらの研究結果を更に発展させるために、計画した研究の大きな柱は以下の通りである。

1-1. 肺炎球菌莢膜糖鎖ワクチン特異的抗体を産生するB細胞の検出と特徴解析

1-2. 特異的B細胞の選択メカニズムの解析 (抗原と細胞の存在様式からB細胞選択の場の解析)

3. 研究の方法

肺炎球菌血清型3莢膜糖鎖(PPS3)をC57BL/6Nマウスに腹腔内投与することで誘導される免疫応答を、(1)ELISA法による血清の抗体価と、(2)ELISPOT法による抗体産生細胞数の経時変化により記述した。

4. 研究成果

肺炎球菌血清型3莢膜糖鎖(PPS3)をマウスに投与することで誘導される免疫応答を、(1)ELISA法による血清の抗体価、(2)ELISPOT法による抗体産生細胞数の測定を行った。腹腔内投与を行って3日後と7日後の経時変化を測定した結果、3日後に脾臓においてIgM抗体産生細胞(APC)数の一過性の増加が観察された。この増加したクローンの反応特異性について解析したところ多重反応性クローンが増加しており、7日後までに特異的なクローンが選択されて残ることが分かった。これよりPPS3は免疫初期においてはTI-1型の活性を有していることが分かった。

このB細胞群は記憶B細胞の前駆体であると考えられたので、PAI細胞とフュージョンし特異的抗体産生ハイブリドーマを取得した。得られた4クローンについて抗体遺伝子のcDNAをクローニングした。そのうち3クローンは独立のマウスから得られたが軽鎖がlambda鎖、重鎖がVh10.2bであり限られた可変部フラグメントを利用したクローンが応答している可能性が考えられた。残りの1クローンについては軽鎖がkappa鎖であり重鎖はVh2-9を使用していた。

in vivoでの特異的B細胞の分科成熟の解析のために、これら抗PPS3抗体の抗体遺伝子を単独産生する遺伝子改変マウスの作製を遂行した。軽鎖Kappa(Vkgj38c-Jk1)トランスジェニックマウスを作製し、重鎖については2種類の重鎖(Vh10.2b-DEL16.2-Jh2)、(Vh2-9-IDPS2.x-Jh1)をマウスJh遺伝子座に組換えさせたES細胞を取得した。現在キメラマウスの作製を進行中である。

さらに、活性化マーカーでありかつ胚中心の明調域に高発現するCD83に注目した。CD83のリガンド分子は不明であるが、抗CD83抗

体の投与によりT細胞非依存性抗原に対する応答(IgM)がT細胞依存性応答(IgM→IgG)へと変化することが報告されているので、記憶B細胞の分化成熟過程への関与が考えられる。そこでそのリガンド分子の探索を行ったところ、CD83が結合するある特定の細胞集団を同定することに成功した。

現在は、(1)CD83リガンド分子の同定と結合細胞の形質解析を進めることと、(2)特異性が既知なクローンの選択機序をモニターできるPPS3特異的抗体遺伝子ノックインマウスを利用したIgM陽性記憶B細胞の分化成熟過程の解析を遂行している。

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4件)

① Denda-Nagai K, Aida S, Saba K, Suzuki K, Moriyama S, Oo-Puthinan S, Tsuiji M, Morikawa A, Kumamoto Y, Sugiura D, Kudo A, Akimoto Y, Kawakami H, Bovin NV, Irimura T. Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2

(MGL2/CD301b): efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. *J Biol Chem.* 2010 Jun 18;285(25):19193-204. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M110.113613. Epub 2010 Mar 19.

② Tanaka M, Suganami T, Kim-Saijo M, Toda C, Tsuiji M, Ochi K, Kamei Y, Minokoshi Y, Ogawa Y. Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B-cell development. *J Neurosci.* 2011 Jun 8;31(23):8373-80. 査読有
doi: 10.1523/JNEUROSCI.6562-10.2011.

③ Kamoshida G, Matsuda A, Katabami K, Kato T, Mizuno H, Sekine W, Oku T, Itoh S, Tsuiji M, Hattori Y, Maitani Y, Tsuji T. Involvement of transcription factor Ets-1 in the expression of the $\alpha 3$ integrin subunit gene. *FEBS J.* 2012 Dec;279(24):4535-46. 再読有
doi: 10.1111/febs.12040. Epub 2012 Nov 22.

④ Oku T, Nakano M, Kaneko Y, Ando Y, Kenmotsu H, Itoh S, Tsuiji M, Seyama Y, Toyoshima S, Tsuji T. Constitutive turnover of phosphorylation at Thr-412 of human p57/coronin-1 regulates the interaction with actin. *J Biol Chem.* 2012 Dec 14;287(51):42910-20. 査読有
doi: 10.1074/jbc.M112.349829. Epub 2012 Oct 24.

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① Tanaka M, Imai N, Tsubata T, Tsuiji M. The immune response during the primary phase against capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. 14th International congress of Immunology, Aug. 25th, 2010
- ② Tsuiji M, Tanaka M, Imai N, Hayashizaki K, Tsubata T. The immune response during the primary phase against capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. The 28th Naito conference on Glycan Expression and Regulation, Jul. 28th, 2010.
- ③ 築地信, 安藤祐介, 鏑田武志, Michel C. Nussenzweig, 辻勉. 末梢血記憶 B 細胞抗体遺伝子レパトローム解析 第 13 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム Jun. 15th, 2012
- ④ Tsuiji M, Ando Y, Tanaka M, Imai N, Hayashizaki K, Kurisaka C, Oku T, Tsubata T, Tsuji T. Analysis of the immune response against capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* and the ligands of CD83, a candidate for sugar-recognizing molecule. International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Nov. 30th - Dec. 1st, 2012
- ⑤ 安藤祐介, 栗坂知里, 奥輝明, 築地信, 辻勉. 免疫細胞活性化マーカー CD83 のリガンド探索 第 35 回日本分子生物学会年会 Dec. 12th, 2012

〔図書〕（計 0 件）

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

該当なし

○取得状況（計 0 件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hoshi.ac.jp/home/kyoiku/kenkyusosiki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築地 信 (TSUIJI MAKOTO)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90302611

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし