

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790487

研究課題名（和文） 1型インターフェロンによる脾臓辺縁帯環境の制御を中心とした肺炎球菌感染防御機構

研究課題名（英文） Type-I IFNs regulate the protective response against pneumococcal infection in splenic marginal zone.

研究代表者

内山 良介（UCHIYAMA RYOSUKE）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：20456891

研究成果の概要（和文）：肺炎などの起原菌である肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）は、その菌体表面が莢膜多糖で覆われており、これが宿主免疫機構を回避することで病原性を発揮する。そのため、莢膜多糖に対する抗体は感染防御に有効である。I型インターフェロン（I型IFNs）は肺炎球菌の感染で産生誘導されることが報告されているが、莢膜多糖に対する抗体産生における効果は不明である。本研究では、脾臓辺縁帯 B 細胞からの抗体産生における I 型IFNs の細胞維持メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus pneumoniae* is a causative agent of bacterial pneumonia in human. The bacterial cell wall components contain the capsular polysaccharides which play an important role for evading the host immune responses. That is why the antibody specific for capsular polysaccharides is protective against *S. pneumoniae* infection by inducing the activation of complements system and phagocytosis by macrophages or dendritic cells. Type-I interferons (IFNs) were shown to be induced in response to *S. pneumoniae* infection, and possibly regulate the bacterial infection. However, it is not clear whether the type-I IFNs affect the antibody production against pneumococcal capsular polysaccharides from splenic marginal zone B cells. This study revealed the effects of Type-I IFNs against marginal zone B cells for production of IgM specific for pneumococcal capsular polysaccharides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：感染免疫

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎は本邦における死亡原因の第4位を占め、その死亡者は毎年10万人にもものぼり、社会的にその制御が重要な疾患である。肺炎の発症要因の中でも、肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）による感染症は重要な原因の一つである。本菌による感染症は、とくに乳幼児や高齢者における発症率が高く、さらに菌が粘膜から血中に移行し、

敗血症や髄膜炎など重症化することが多いため、临床上その感染制御が重要な課題になっている。

肺炎球菌の表層は多糖成分で構成された莢膜構造で覆われており、これが主要な病原因子となっている。すなわち、莢膜多糖が表面を覆っているため、菌体表面における補体活性化が阻害され、マクロファージなどからの食食に抵抗性を示し、生体防御系を回避す

。莢膜抗原に対する抗体は菌のオプソニン化を促進して補体系の活性化を誘導する。その結果、補体による殺菌機構の誘導およびマクロファージによる貪食を活性化することで、すみやかな菌の排除を促進する。そのため、莢膜に対する抗体は感染防御に有効である。

莢膜抗原に対する IgM 抗体は、主に脾臓の辺縁帯と呼ばれる領域に存在する B 細胞群（辺縁帯 B 細胞, Marginal Zone B cells: MZ B 細胞）から産生される。MZ B 細胞は莢膜抗原刺激を受けると、T 細胞の介在なしに IgM などの抗体産生を誘導する。現在、精製した肺炎球菌莢膜抗原を接種するワクチン (PneumovaxNP, PPV23) が臨床応用されているが、これは上述のように T 細胞の介在しない免疫系を刺激するため、免疫記憶が成立せず、数年間でその効果が減弱するとされている。さらに、MZ B 細胞からの詳細な抗体産生機序が不明な点があるため、有効な免疫賦活アジュバンドも存在しないことから、その解明が必要であると考えられる。

I 型インターフェロン (I 型 IFNs: IFN- $\alpha/\beta$ ) は、ウイルス感染防御に重要なサイトカインであり、C 型肝炎ウイルス感染症に対する治療などにおいて臨床応用されている。一方、細菌感染防御における I 型 IFNs の役割についても研究が行われつつある。肺炎球菌感染防御における役割としては、I 型 IFNs 受容体の遺伝子欠損マウスを用いた検討から、肺炎球菌の感染防御に I 型 IFNs が関与する可能性が示された。しかし、MZ B 細胞に対する I 型 IFNs の効果と、その感染防御における役割については不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまで、ウイルス感染防御に注目されてきた I 型 IFN が、脾臓の辺縁帯環境を制御し、MZ B 細胞からの抗体産生を誘導・促進し、肺炎球菌感染防御に作用するという、新たな生体防御メカニズムの解明を目的として検討を行った。

具体的には、PPV23 ワクチン接種したマウスの MZ B 細胞に対する I 型 IFNs の影響を、*in vivo* および *in vitro* で検討を行う。IgM 抗体産生や細胞増殖などに影響が認められた場合には、その機序の解明を目的として研究を行う。

## 3. 研究の方法

マウス *in vivo* における IgM 抗体濃度は、PPV23 ワクチン接種後もしくは *S. pneumoniae* D39 株の感染後に血清を回収し、IgM 抗体価を ELISA 法で測定した。脾摘したマウスに対するワクチン効果は、マウス脾臓を摘出した 7 日後、PPV23 を接種し、その血清中の IgM 抗体価を測定した。脾細胞からの

抗体産生における I 型 IFN の効果については、PPV23 接種マウスより脾臓を回収し、*in vitro* で IFN- $\beta$  で刺激した後、その培養上清中の抗体価を測定した。また、*in vivo* でその効果を検討するため、マウス腹腔に IFN- $\beta$  を接種し、脾細胞からの抗体産生に対する影響を検討した。さらに、PPV23 ワクチン効果を調べるため、PPV23 を接種したマウスに D39 攻撃感染し、その生存日数を観察した。また、脾摘したマウスについても同様にワクチン効果を検討した。脾臓における MZ B 細胞数の変化は、細胞表面の IgM, CD23 および CD21/35 の発現量を FACS で解析した。

## 4. 研究成果

脾臓は重要な免疫臓器の一つであるが、細菌感染制御における脾臓の果たす役割は、感染症 (病原体) の種類によって異なっている。代表的な細胞内寄生性細菌である結核菌は、ヒト結核症の起原菌である。この免疫応答の解析において、BCG 感染マウスモデルが用いられている。まず、BCG 感染制御における脾臓の役割を明らかにするため、マウス脾摘群と sham 群 (対照処置群) を用いて、BCG 感染における菌数変化を検討したところ、いずれのマウスも肺や肝臓における菌の排除能に差は認められなかった。この結果より、結核菌などの細胞内寄生性細菌の排除における脾臓の寄与は小さいと考えられた。一方、細胞外で増殖し、肺炎などの疾患を発症する肺炎球菌について脾臓の果たす役割を検討するため、脾摘および sham 群マウスに肺炎球菌を感染し、生存日数を比較した。その結果、脾摘群は sham 群に比べて生存率の低下が認められ、肺炎球菌感染制御における脾臓の重要性が示された。

脾臓は肺炎球菌の莢膜多糖に対する抗体産生の主要な場所である。実際、マウスに PPV23 ワクチンを皮下接種すると、7 日後、血清中の抗 PPV23 IgM 抗体価が上昇するが、ここで脾摘処置を行うと、抗体価が減少した。この抗体価の減少は、PPV23 ワクチン接種前に脾摘処置を行っても同様であったことから、脾臓は抗 PPV23 IgM 抗体産生に重要な役割を果たしていることが示された。さらにこの PPV23 ワクチン接種マウスに致死量の肺炎球菌 D39 株を感染後、生存日数を観察したところ、ワクチン非接種群に比べて接種群では生存率の上昇が認められた。これより、PPV23 ワクチンは脾臓における IgM 抗体産生を上昇させ、肺炎球菌感染防御に有効であることがわかった。

脾臓細胞からの抗 PPV23 IgM 抗体産生における I 型 IFNs の役割を検討する目的で、PPV23 ワクチン接種マウスに I 型 IFN (IFN- $\alpha$  または IFN- $\beta$ ) を接種し、回収した脾細胞からの抗体産生を検討した。その結果、総 IgM 抗体価は、

PPV23 ワクチン接種および非接種マウスのいずれにおいてもI型IFNsの接種によって上昇した。一方、抗PPV23 特異的IgM抗体産生量は、*in vivo*でPPV23 接種したマウスからの脾細胞においてのみ、I型IFNs存在下で、抗体価の上昇が認められた。これは、ワクチン接種したマウスから脾細胞を回収し、*in vitro*でI型IFNs刺激した場合にも、同様に抗体産生量の増加が認められた(図1)。さらに、I型IFNs受容体欠損(*Ifnar1*<sup>-/-</sup>)マウス由来の細胞では、これは認められなかった(図1)。以上の結果より、I型IFNsは、脾細胞からの総IgM抗体産生を上昇させるが、MZ B細胞においては、PPV23 により刺激を受けた細胞にのみ作用し、抗原特異的にIgM抗体産生を上昇させることが示された。

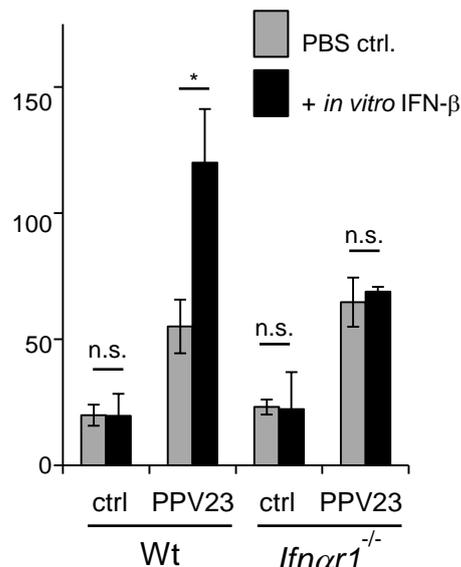
I型IFNsは肺炎球菌感染制御に重要であることが報告されている。では、抗PPV23 IgM抗体産生に内因性I型IFNは関与しているのか、検討を行った。まず、野生型およびI型IFNs受容体欠損マウスでMZ B細胞の数に差があるのか検討を行った。MZ B細胞は細胞表面抗原でIgM<sup>high</sup> CD23<sup>int</sup> CD21/35<sup>high</sup>として解析を行った。その結果、野生型および*Ifnar1*<sup>-/-</sup>マウスでその細胞数で差は認められなかった。PPV23 ワクチン接種マウスでは、いずれのマウスでもMZ B細胞数の増加が認められたが、野生型および*Ifnar1*<sup>-/-</sup>マウスにおける細胞数の差は認められず、さらに血清中IgM抗体価にも差は認められなかった。さらに、PPV23 接種後のマウス脾臓における*Ifnβ*遺伝子発現をリアルタイムPCRで解析したところ、遺伝子発現の上昇は認められなかった。以上の結果から、PPV23 ワクチン接種によるIgM抗体産生では、I型IFNsは必須の因子ではなく、その効果を増強するものであることがわかった。

今回の解析により、I型IFNsが肺炎球菌感染防御に有効なIgM抗体産生を上昇させることがわかった。これは、脾臓のMZ B細胞からの抗体産生を抗原特異的に刺激するものである可能性が示唆された。

本研究では、I型IFNsがPPV23 ワクチン接種マウスのMZ B細胞からのIgM抗体産生を上昇させることを明らかにした。I型IFNsは、主にマクロファージや樹状細胞によって産生される。その産生メカニズムは、これらの細胞の形質膜上に存在するToll様受容体(TLR)を介して病原体などのリガンドが認識され、細胞内シグナル伝達の結果、I型IFNs遺伝子発現が誘導される。これまでに、TLRリガンド投与により産生されたI型IFNが、濾胞性B細胞のIgG抗体へのクラススイッチを誘導することが報告されているが(Swanson, C.L., et al., *J Exp Med.* 2010;207(7):1485-500.)、莢膜抗原に対する

IgM抗体値を抗原特異的にI型IFNsが上昇させるという報告は当該研究が初めてである。今回の研究によって、PPV23 ワクチン接種の効果をさらに高めることのできるアジュバントの探索などに効果を発揮すると考えている。

(図1)  
IgM (anti-PPV23)



## 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)

[学会発表] (計1件)

(1) Uchiyama Ryosuke, Tsutsui Hiroko, Protective effect of polysaccharide vaccine in splenectomized mice against infection of *Streptococcus pneumoniae*. 第84回日本細菌学会総会、札幌、2011. 9. 8

[その他]

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/micro/index.htm>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 良介 (UCHIYAMA RYOSUKE)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：20456891

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：