

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591161

研究課題名(和文)肺炎球菌ワクチンが誘導するクラススイッチ機構の解明と新規ワクチンへの応用

研究課題名(英文)Class-switching of immunoglobulins induced by pneumococcal vaccine

研究代表者

須田 隆文(Takafumi, Suda)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：30291397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：23価莢膜抗原の多糖体ワクチン(PPV23)は本来、理論的にはT細胞非依存性にIgM抗体のみを誘導するワクチンであるが、免疫グロブリンのクラススイッチ(CSR)を介してIgG、IgA抗体を誘導することをマウスとヒトで確認した。さらにマウス肺由来の樹状細胞(DC)を用いて、CD11b+ DCが、TLRのリガンドとIL-6などの存在下にT細胞非依存性のCSRを誘導するを示した。以上より、PPV23はその成分として含まれるTLRリガンドの刺激と共に特定のサイトカインを産生するDCフェノタイプを介して、CSRを惹起し感染防御に有効な特異的IgG、IgA抗体の産生を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Theoretically, pneumococcal polysaccharide vaccine with 23 serotypes of capsular polysaccharide (PPV23) can induce only serotype-specific IgM antibody. In the present study, we showed that PPV23 readily induced both IgG- and IgA- serotype-specific antibodies through immunoglobulin class-switch recombination (CSR) in mouse and human. Next, we demonstrated that CD11b+ lung dendritic cells (DC), but not CD103+ lung DC, elicited T-cell independent CSR in the presence of toll-like receptor (TLR) ligands plus certain cytokines, such as IL-6 and IL-10. These results suggest that PPV23 induces protective serotype-specific IgG and IgA antibodies through an interaction of particular phenotypes of DC with IL-6 and IL-10.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺炎球菌 ワクチン 樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌による感染症は、市中感染症として頻度が高く、また重症化することも多く、全世界で年間150万人以上が死亡している。また、最近、抗菌薬に耐性を示す肺炎球菌が増加しつつあり、WHOは肺炎球菌感染症に対する最も効果的かつ経済的な戦略は、「本症に対する有効なワクチンの開発」と「その接種の普及」であると宣言している。現在、肺炎球菌に対するワクチンとしては23種類の肺炎球菌の莢膜抗原(23価)を含んだワクチン(PPV23: ニューモバックス®)が広く用いられているが、後述するようにその構造上、ワクチンとしての基本的な感染防御誘導能が低く、本来、本感染症のハイリスク者である高齢者や、小児、免疫抑制状態の患者においては予防効果が乏しい。そのため、莢膜抗原に異種蛋白を結合させることによってT細胞系の免疫応答も惹起する蛋白結合ワクチン(PCV7: プレベナー®, PCV13など)が開発されているが、これは原理的に多価にすることが難しく、現状では7価、あるいは13価の莢膜抗原しか含んでいない。したがって、PPV23やPCV13などよりも優れた効果を持ち、多種の肺炎球菌に有効なワクチンの開発が切望されている。

PPV23は23価の莢膜抗原の繰り返し構造をもつ多糖体(ポリサッカロイド)ワクチンであり、莢膜抗原に対する感染防御抗体の産生を誘導し予防効果を発揮する。多糖体ワクチンの抗原は、T細胞の助けを借りずに(T細胞非依存性)抗原特異的なB細胞受容体(BCR)をもつB細胞を直接的に刺激し、そのB細胞を増殖させ抗体産生を誘導する。しかし、多糖体ワクチンには決定的な弱点がある。それは、理論的には「IgM抗体しか誘導できない」ことである。IgM抗体は通常感染初期に産生されるが、抗原との親和性が低いため感染防御能が弱く、また抗体産生も長く続かない。本来効果的なワクチンはIgGやIgA抗体を誘導できることが必須条件であるが、T細胞非依存性の莢膜抗原を用いる多糖体ワクチンには理論的にその能力がない。

そこで、本研究では、はじめに、マウスと、ヒト健常者あるいは免疫抑制状態にある患者にPPV23を接種し、莢膜抗原に対するIgA抗体、IgG抗体が誘導されるか否かを検討した。さらに、本来産生されないはずの特異的IgGやIgA抗体が誘導される機序について、一部の樹状細胞(dendritic cells, DC)が誘導されるT細胞非依存性の免疫グロブリンのクラススイッチ機構に着目して検討を行った。

2. 研究の目的

PPV23接種によるマウス、およびヒト健常者、免疫抑制状態の患者における莢膜抗原特異的IgG、IgA抗体誘導能を検討し、DCによるT細胞非依存性クラススイッチ機構を解明する。

3. 研究の方法

1)マウスにおけるPPV23接種による莢膜抗原特異的IgA、IgG抗体の誘導: BALB/cマウスにPPV23を皮下および経鼻接種し、経時的に血中および気管支肺胞洗浄液(BAL)中のIgA、IgG抗体価をELISAを用いて測定した。PPV23の接種に当たっては、LPS、Poly-ICなどの各種アジュバンドも併用した。

2)ヒトにおけるPPV23接種による莢膜抗原特異的IgG抗体の誘導: 健常人(n=22)およびステロイド薬あるいは免疫抑制薬内服中の免疫抑制状態の患者(n=23)にPPV23を接種し、経時的に23種類の莢膜抗原を同時に固相化したELISAプレートを用いて、莢膜抗原特異的IgG抗体を測定した。

3)肺由来DCによるT細胞非依存性のクラススイッチ機構の検討: 肺から各種抗体を用いたCell sortingにてCD103⁺DCとCD11b^{high}DCを単離する。それぞれのDCをnaive B細胞と共培養し、LPSと抗CD40抗体を加え、T細胞非依存性とT細胞非依存性の各クラスの抗体産生を測定する。さらに、クラススイッチに関わるactivation-induced cytidine deaminase(AID)や、a proliferation-inducing ligand(APRIL)、B cell-activating factor of the tumor necrosis factor(BAFF)、各種サイトカイン産生と比較する。

4. 研究成果

1)PPV23単独で皮下注射した場合に、莢膜抗原特異的なIgG抗体、IgA抗体の双方が検出され、免疫グロブリンのクラススイッチが誘導されていることが示された。これらの抗体の誘導は肺内でもおきていることがBALで確かめられた。一方で、経鼻投与では、アジュバンドを用いても、肺局所、全身にクラススイッチした特異抗体を検出することはできなかった。

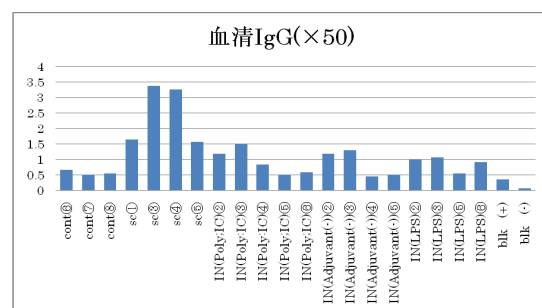


図1. PPV23の投与経路、アジュバンド併用などによる血中の莢膜抗原特異的IgA抗体の誘導

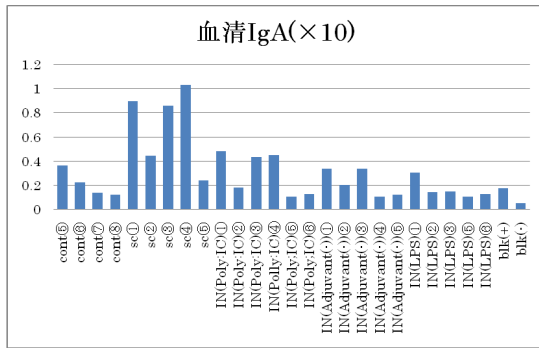


図2 . PPV23 の投与経路 , アジュバンド併用などによる血中の莢膜抗原特異的 IgG 抗体の誘導

2) 図2に示すように、健常人および免疫抑制状態の患者においても同様に、PPV 接種後3年間に渡って血液中に莢膜抗原特異的 IgG 抗体が検出された。したがって、ポリサッカロイド抗原であるにも関わらず、PPV23 はヒトにおいても特異的 IgG 抗体を誘導することが明らかとなった。さらに抗体誘導能は、今回対象とした免疫抑制状態の患者においても、健常人と同等レベルであり、このような患者においても有効な感染防御能を誘導する可能性が示唆された。

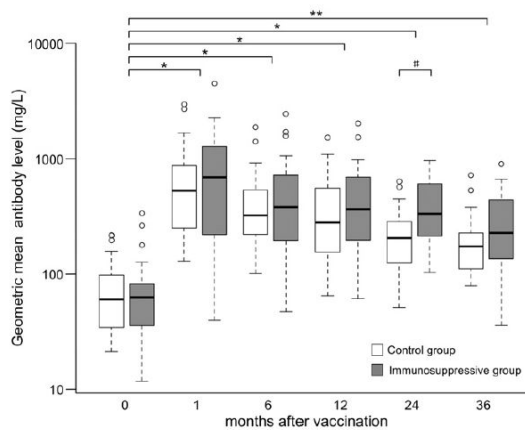


図3 . PPV23 接種後の血清中の莢膜抗原特異的 IgG 抗体価の推移

3) T細胞依存性およびT細胞非依存性条件下のいずれにおいても、CD11b^{high}DC は CD103⁺DC より多くの IgA, IgG1 抗体を産生誘導した。これは、CD11b^{high}DC がより効率よくT細胞非依存性のクラススイッチを誘導することを示している。さらに、クラススイッチの主要な機構である AID の発現も CD11b^{high}DC で有意に高かった。T細胞非依存性のクラススイッチに関わる APRIL, BAFF の発現は両者で差はなかったが、IL-6 と IL-10 の産生は CD11b^{high}DC で多く、これらのサイトカインの中和抗体によって IgA 産生量の両

者の差はなくなった。以上より、CD11b^{high}DC の高いクラススイッチ誘導能はこれらのサイトカイン産生能の違いが一部関係している可能性が示唆された。

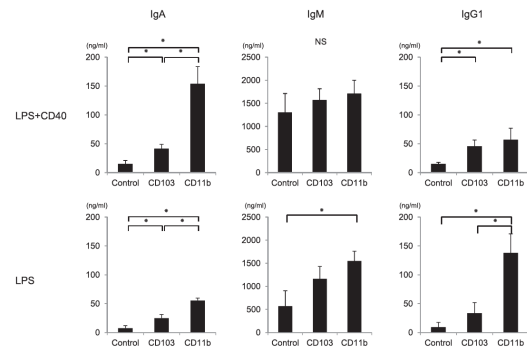


図4 . 肺由来の CD103⁺DC と CD11b^{high}DC の IgA , IgM , IgG1 抗体誘導能の比較

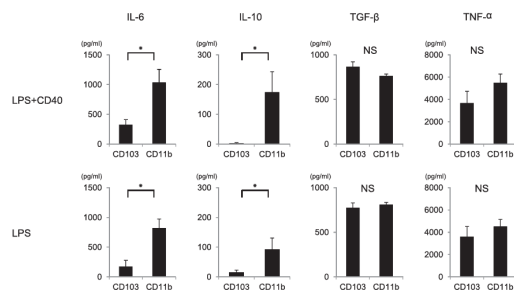


図5 . 肺由来の CD103⁺DC と CD11b^{high}DC のサイトカイン産生能の比較

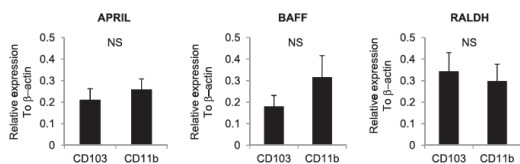


図6 . 肺由来の CD103⁺DC と CD11b^{high}DC における APRIL , BAFF , RALDH の発現の比較

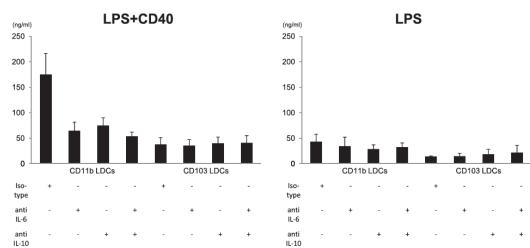


図7 . 抗 IL-6 および抗 IL-10 抗体の IgA 産生に及ぼす影響

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6件)

1. Akamatsu T, Inui N, Kusagaya H, Nakamura Y, Suda T, Chida K: Evaluation of antibody levels over 3 years after 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccination in patients with pulmonary diseases receiving steroids and immunosuppressive agents, Clin Biochem 2015, 48:125-9
2. Suzuki Y, Suda T, Furuhashi K, Shibata K, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Nakamura H, Chida K: Mouse CD11bhigh lung dendritic cells have more potent capability to induce IgA than CD103+ lung dendritic cells in vitro, Am J Respir Cell Mol Biol 2012, 46:773-80
3. Suzuki Y, Suda T, Asada K, Miwa S, Suzuki M, Fujie M, Furuhashi K, Nakamura Y, Inui N, Shirai T, Hayakawa H, Nakamura H, Chida K: Serum indoleamine 2,3-dioxygenase activity predicts prognosis of pulmonary tuberculosis, Clin Vaccine Immunol 2012, 19:436-42
4. Kono M, Nakamura Y, Suda T, Uchijima M, Tsujimura K, Nagata T, Giermasz AS, Kalinski P, Nakamura H, Chida K: Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine, Vaccine 2012, 30:2633-9
5. Inui N, Hasegawa H, Suda T, Nakamura Y, Watanabe H, Chida K: Expression and function of multidrug resistance protein 1 and multidrug resistance-associated protein 1 in lung dendritic cells from aging mice, J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2012, 67:1049-55
6. Furuhashi K, Suda T, Hasegawa H, Suzuki Y, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Shibata K, Nakamura H, Chida K: Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses, Am J Respir Cell Mol Biol 2012, 46:165-72

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)
なし

○取得状況(計 件)

なし

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

研究組織

(1)研究代表者

須田 隆文(SUDA TAKAFUMI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号:30291397

(2)研究分担者

中村 祐太郎(NAKAMURA YUTARO)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号:60436962

永田 年(NAGATA TOSHI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号:90275024

(3)連携研究者

なし