

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713038

研究課題名(和文) NKT細胞による肺炎球菌感染防御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of NKT cell mediated host defense against Streptococcus pneumoniae infection

研究代表者

金城 雄樹 (Kinjo, Yuki)

国立感染症研究所・その他部局等・室長

研究者番号：20570831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の死因第3位は肺炎である。肺炎球菌は、市中肺炎及びインフルエンザ続発性細菌性肺炎の原因菌として頻度が高い。本研究では、肺炎球菌感染早期の防御機構の解明を目指し、NKT細胞というリンパ球に着目して解析を行った。複数存在するNKT細胞亜集団の一つを欠損したマウスでは、肺炎球菌感染後の菌体排除が促進することが分かった。さらに、その欠損マウスではインフルエンザ続発性肺炎球菌感染後の経過の改善を認めた。そのことより、そのNKT細胞亜集団は肺炎球菌を排除する免疫応答に制御的な作用をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pneumonia is the third leading cause of death in Japan and Streptococcus pneumoniae (Pneumococcus) is the leading causative bacterium of pneumonia. To elucidate the mechanisms of host defense against Streptococcus pneumoniae in the early phase of infection, we studied a function of a lymphocyte called NKT cell. Mouse deficient for a subpopulation of NKT cell exhibited enhanced clearance of bacteria from lungs after Streptococcus pneumoniae infection. These mice also showed the improved outcome of post-influenza pneumococcal infection. These results suggest that this subpopulation of NKT cell may play a regulatory role on the host defense against Streptococcus pneumoniae infection.

研究分野：感染症内科学

キーワード：肺炎球菌 NKT細胞 感染症 免疫学 内科

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因第3位は肺炎である。肺炎球菌は、市中肺炎及びインフルエンザ続発性の細菌性肺炎の原因菌として最も頻度が高い細菌の1つである。また、インフルエンザ続発性肺炎球菌感染は重症化することが知られている。肺炎球菌は肺炎のみならず、髄膜炎や敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症をおこす。しかし、侵襲性肺炎球菌感染の発症機構については明らかになっていない点が多い。そのため、肺炎球菌感染に対する防御機構の解明は重要である。

我々はこれまでに、肺炎球菌が単糖型及び二糖型のグリセロ糖脂質を有しており、NKT細胞というリンパ球がこれらの糖脂質を認識すること、単糖型の方が強くNKT細胞を刺激することを見出した。また、肺炎球菌感染早期にNKT細胞が肺炎球菌糖脂質抗原を認識して、インターフェロン・ガンマ(interferon- γ : IFN- γ)やインターロイキン17A(interleukin-17A: IL-17A)などのサイトカインを産生すること、NKT細胞による糖脂質抗原の認識は菌体排除に重要な役割を担うことを明らかにした。一方、NKT細胞は2型ヘルパーT細胞(Th2)による免疫応答で誘導されるTh2サイトカインの産生能も有することが知られている。

近年、NKT細胞は、主にIFN- γ を産生する亜集団や、主にIL-17やTh2サイトカインを産生する亜集団が存在することが明らかになった。NKT細胞のIFN- γ 産生は肺炎球菌感染防御に貢献することが示唆されている。しかし、IL-17やTh2サイトカインを産生するNKT細胞亜集団が肺炎球菌感染に対する防御免疫応答に関与するのかが明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、NKT細胞を介する肺炎球菌感

染早期の防御免疫機構の解明を目指し、IL-17A及びTh2サイトカインを産生するNKT細胞を欠損したマウスを用いて、肺炎球菌感染防御における、そのNKT細胞亜集団の役割を明らかにする。また、侵襲性肺炎球菌感染症発症機序の一端の解明を目指し、侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した肺炎球菌株の脂質を抽出し、NKT細胞の認識抗原である糖脂質の組成について解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 肺炎球菌感染防御におけるIL-17A/Th2サイトカイン産生性NKT細胞の役割の解析

肺炎球菌感染早期の防御免疫応答におけるIL-17A/Th2サイトカイン産生性NKT細胞の関与について調べるために、IL-17A/Th2サイトカイン産生性NKT細胞欠損マウス及び野生型マウス(BALB/c系統)に、肺炎球菌臨床分離株(血清3型)を気管内に接種し、感染3日後の肺内菌数を測定した。

(2) 侵襲性肺炎球菌感染症例由来の肺炎球菌株の糖脂質解析

侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した数種類の肺炎球菌株及び非病原性肺炎球菌株から、クロロホルム・メタノールにて脂質を抽出した。その脂質を薄層クロマトグラフィーに展開し、ナフトール硫酸法にて糖脂質を検出した。また、抽出した脂質からDEAEカラムクロマトグラフィー及びシリカカラムクロマトグラフィーを用いて、単糖型グリセロ糖脂質及び二糖型グリセロ糖脂質を精製した。

(3) 肺炎球菌感染防御におけるIL-17Aの役割の解析

NKT細胞や他の免疫細胞が産生するIL-17Aの肺炎球菌感染早期の防御免疫応答における関与について調べるために、IL-17A欠損マ

ウス及び野生型マウス (BALB/c 系統) に、肺炎球菌臨床分離株 (血清 3 型) を気管内に接種し、感染 3 日後の肺内菌数を測定した。

(4) インフルエンザ続発性肺炎球菌感染防御における IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞の役割の解析

インフルエンザ続発性肺炎球菌感染に対する防御免疫応答における、IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞の関与の有無を明らかにするために解析を行った。IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞欠損マウス及び野生型マウス (BALB/c 系統) に、インフルエンザウイルス (H1N1) を鼻腔内に接種し (上気道のみ感染)、1 週間後に肺炎球菌 (血清 3 型) を気管内に接種し、感染後の経過を観察した。

4. 研究成果

(1) 肺炎球菌感染防御における IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞の役割の解析

IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞を欠損したマウスでは、野生型マウスと比較して、肺内菌数が減少するという結果を得た。これまでに、肺炎球菌感染早期に NKT 細胞が産生する IFN γ が好中球の肺への集積を増加させ、菌体排除促進に寄与することが示唆されている。今回の解析から、IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞は、IFN γ 産生性 NKT 細胞とは異なり、菌体排除をもたらす免疫応答に制御的に作用する可能性が示唆された。

(2) 侵襲性肺炎球菌感染症例由来の肺炎球菌株の糖脂質解析

侵襲性肺炎球菌感染症例由来の肺炎球菌株及び非病原性菌株から抽出した脂質の薄層クロマトグラフィーでの解析から、どの菌株も単糖型及び二糖型の糖脂質を有することが分かった。そのことから、侵襲性肺炎球

菌感染をおこした菌株では、NKT 刺激活性の強い単糖型を欠損する可能性は否定された。肺炎球菌糖脂質抗原による NKT 細胞刺激には、脂肪酸の炭素鎖の長さ、不飽和結合の数や位置などの構造の違いが影響を及ぼすことから、各糖脂質を精製し、詳細な構造解析を行うことが必要である。本研究にて、単糖型グリセロ糖脂質及び二糖型グリセロ糖脂質を精製する方法を確立することができた。今後、病原性の異なる菌株から精製したグリセロ糖脂質の詳細な構造解析と NKT 細胞の反応性の解析を行うことで、糖脂質構造の違いによる NKT 細胞刺激活性の違いと病原性の関係について解析することができると考えられる。

(3) 肺炎球菌感染防御における IL-17A の役割の解析

IL-17A 欠損マウス及び野生型マウスにおいて、肺炎球菌感染後の肺内菌数を比較解析したところ、有意な菌数の違いを認めなかった。このことから、NKT 細胞などが肺炎球菌感染早期に産生する IL-17A の菌体排除に及ぼす影響は限定的であると考えられた。この結果より、IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞欠損マウスで認められた、肺炎球菌排除の促進作用は、IL-17A によるものではなく、Th2 サイトカインによってもたらされる可能性が推察された。

(4) インフルエンザ続発性肺炎球菌感染防御における IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞の役割の解析

インフルエンザ続発性肺炎球菌感染は、通常の肺炎球菌感染 (インフルエンザ先行感染なし) と比べて、重症化することが知られている。野生型マウスでは、インフルエンザ続発性肺炎球菌感染後に明らかな体重減少を認めた。一方で、IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞欠損マウスでは、野生型マウスで認められた体重減少を認めず、両群間で体

重の減少率に有意な違いを認めた。そのことから、IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞がインフルエンザ続発性肺炎球菌感染の病態に關与する可能性が推察された。予備的解析にて、IL-17A 欠損マウスでは、野生型マウスと同様に体重減少を認めたことから、Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞が、インフルエンザ続発性肺炎球菌感染の病態に關与する可能性が示唆された。

以上の結果より、Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞は、肺炎球菌感染早期の菌体排除をもたらす免疫応答に制御的な作用をもたらす可能性が示唆された。本研究にて用いたマウスでは、IL-17A/Th2 サイトカイン産生性 NKT 細胞以外の免疫細胞も欠損する可能性があるため、引き続き詳細な解析が必要である。

本研究で得られた知見を基に、更なる解析を行うことで、肺炎球菌感染早期の防御免疫機構及び、インフルエンザ続発性肺炎球菌感染重症化機構の一端の解明に繋がることが期待される。

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 7 件)

Miyasaka T, Watanabe Y, Akahori Y, Miyamura N, Ishii K, Kinjo Y, Miyazaki Y, Liu T-Y, Uemura Y, Kawakami K. Human CD4⁺CD8⁻ invariant natural killer T cells promote IgG secretion from B cells stimulated by cross-linking of their antigen receptors. *World J Vaccines*. 査読有, Vol.6, 2016, 34-41.
DOI: 10.4236/wjv.2016.62005

Akahori Y, Miyasaka T, Toyama M, Matsumoto I, Miyahara A, Zong T, Ishii K, Kinjo Y, Miyazaki Y, Saijo S, Iwakura

Y, Kawakami K. Dectin-2-dependent host defense in mice infected with serotype 3 *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Immunol*. 査読有, Vol.17(1), 2016, 1.

DOI: 10.1186/s12865-015-0139-3.

金城 雄樹, 水口 裕紀: 感染症と NKT 細胞. *医学のあゆみ*. 査読無, Vol.254 (13), 2015, 1175-1178.

金城 雄樹. インバリアント NKT 細胞による糖脂質抗原認識と細菌感染防御の関連. *Surgery Frontier*. 査読無, Vol.21(3), 2014, 46-51.

金城 雄樹. 自然リンパ球 iNKT 細胞. *医学のあゆみ*. 査読無, Vol.251(6), 2014, 486-489.

Kinjo Y, Kitano N, Kronenberg M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. *J. Infect. Chemother*. 査読有, Vol.19, 2013, 560-570.
DOI: 10.1007/s10156-013-0638-1.

金城 雄樹. 特集 注目される Natural killer T (NKT)細胞 2. 感染防御に重要な NKT 細胞 血液フロンティア 査読無, Vol.23, 2013, 33-39.

〔学会発表〕(計 4 件)

Yuki Kinjo, Makiko Nakahara, Yuki Mizuguchi, Yuina Izawa, Naoki Kitano, Kayo Ohkouchi, Keigo Ueno, Zhenyu Piao, Yukihiro Akeda, Yoshitsugu Miyazaki, Kazunori Oishi. NKT cell mediated protection against pneumococcal infection CD1-MR1 2015, Nov 15-19, 2015, Lorne, Australia.

Yuki Kinjo. International symposium 3
「 Bacterial cell component and host
defense ». NKT cell mediated defense
against *Streptococcus pneumoniae*
infection. 第 87 回日本細菌学会総会 . 2014
年 3 月 26-28 日 , タワーホール船堀(東京) .

金城 雄樹 . iNKT 細胞を介した肺炎球菌
感染防御 . 糖鎖免疫 2014 . 2014 年 2 月 17-18
日 , 東京医科歯科大学 (東京) .

金城 雄樹 . 特別講演 1 感染免疫におけ
る iNKT 細胞の役割 . 感染症研究グローバル
ネットワークフォーラム 2013 . 2013 年 11 月
30 日 , 千葉大学 (千葉) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.niid.go.jp/niid/ja/bioact-3rdlab.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

金城 雄樹 (KINJO YUKI)
国立感染症研究所・室長
研究者番号 : 20570831

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :