

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791639

研究課題名(和文)肺炎球菌表面抗原の解析と肺炎球菌の上気道粘膜定着阻止ワクチンの開発

研究課題名(英文) Analysis of pneumococcal surface protein and development of pneumococcal vaccine inhibiting colonization in the upper respiratory tract

研究代表者

酒井 章博 (SAKAI AKIHIRO)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：50423950

研究成果の概要(和文)：PCR法により、急性中耳炎患児より分離された肺炎球菌の肺炎球菌表面蛋白抗原の解析を行った。TAクローニング法により遺伝子組み換え肺炎球菌表面蛋白抗原を作製した。マウスモデルにおいて作成した肺炎球菌表面蛋白抗原を用いて経鼻免疫を行うことで、鼻咽腔における肺炎球菌定着が予防された。肺炎球菌表面蛋白抗原はfamilyが異なる菌株にも交差反応性を認め、多くの肺炎球菌株に対する効果があることが示された。肺炎球菌表面蛋白抗原を用いた経鼻免疫は次世代のワクチン開発において重要なものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the pneumococcal surface proteins of pneumococcal strains from children with otitis media by PCR assay. Recombinant pneumococcal surface proteins were made by TA cloning method. Pneumococcal colonization in the nasopharynx was prevented by intranasal immunization with recombinant pneumococcal surface protein in the mouse model. Cross-protective-reactivity between pneumococcal surface protein families were shown in the systemic infection model. Intranasal immunization with pneumococcal surface protein is important about the development of novel vaccines in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
2010年度	1,400,000円	420,000円	1,820,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000円	930,000円	4,030,000円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学

1. 研究開始当初の背景

近年肺炎球菌の薬剤耐性化が進行し、臨床で大きな問題となっている。現在臨床導入されている7価または13価の肺炎球菌多糖体ワクチンはおもに侵襲性の肺炎球菌感染症に対して一定の効果を示しているが、血清型特異的であり、依然として乳幼児期における免疫応答の賦活化の面でも限定的である。現在欧米では肺炎球菌多糖体ワクチンでカバー

されていない肺炎球菌による感染症が増加傾向にあり、その対策に迫られている。今後本邦でも同様の傾向となることが予想される。そのため、肺炎球菌全株をカバーし、侵襲性肺炎球菌感染症の原因の一つとなっている肺炎球菌の鼻咽腔の保菌を抑制するワクチン開発と乳幼児にも十分な免疫応答を誘導できるワクチンの投与方法の確立が期待されている。

2. 研究の目的

肺炎球菌全株に存在し、免疫原性を有する肺炎球菌蛋白抗原の解析と、遺伝子組み換え蛋白の作成を行う。その抗原を免疫することで、効率的な肺炎球菌特異的免疫応答が誘導できるかについて検討する。さらに肺炎球菌の鼻咽腔におけるコロナイゼーションの抑制効果について検討する。その際、これまでの臨床・基礎研究結果から、乳幼児期における免疫応答の誘導が困難であることが予想されるため、マウスの母体免疫モデルを用いて行う。

3. 研究の方法

(1)

肺炎球菌表面蛋白抗原である Pneumococcal surface protein A (PspA) は肺炎球菌全株に存在し、免疫原性を有しており、次世代のワクチン標的抗原として有望である。PspA は抗原多様性を決定する Clade determined 領域を含む α -Helical 領域とそれに引き続く Proline-rich 領域、Cholin-binding repeat 領域の3領域よりなる。このうち可変領域である α -Helical 領域に対する PCR プライマーを決定し、PCR 法による PspA の family 分類を行う。今までの研究で PspA には family1、2、3 が存在することが知られている。まず急性中耳炎患児より分離された肺炎球菌の PspA family の割合を PCR 法にて解析する。

(2)

次に TA クローニング、pET システムを用いて PspA の遺伝子組み換え蛋白を作成する。すなわち遺伝子部分を PCR 法により増幅した後に、TOPO TA クローニングキット (Invitrogen) にてサブクローニングを行う。さらに、pET vector をを用い蛋白発現系大腸菌へトランスフォームし、遺伝子組換え大腸菌を作成する。大腸菌を大量培養した後に蛋白発現をさせ、発現された蛋白を His-tag を認識するイオン交換クロマトグラフィーにて回収精製する。精製された蛋白は SDS-PAGE にて確認した後に、LPS 濃度を測定し、(3)および(4)の免疫に用いる。

(3)

PspA2 を用いた経鼻免疫により肺炎球菌特異的免疫が誘導されるかについて検討する。PspA には免疫原性があり、経鼻免疫により有効な免疫応答が期待できる。一方で、今までのワクチンの研究、臨床成果より乳幼児期における十分な免疫応答の誘導が困難であったため、新たな免疫応答の経路として妊娠前の成熟メスマウスを免疫することとした。メスマウスの免疫が終了した後にオスマウスと交配して得られた仔マウスと母マウスの血清中に誘導された肺炎球菌特異的抗体価についての検討を行う。

(4)

マウス免疫モデルで肺炎球菌の鼻咽腔における保菌の抑制効果を検討する。(3)にて得られた仔マウスの鼻咽腔に肺炎球菌を接種し、鼻咽腔のコロナイゼーションモデルを作成し、保菌状態について検討を行う。

(5)

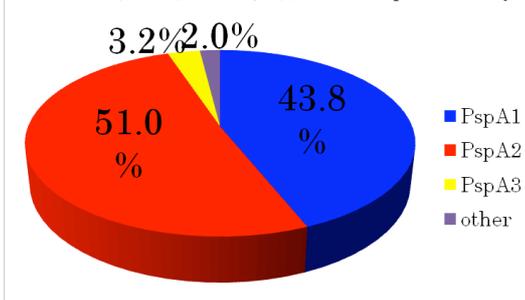
多くの臨床分離株が属すると考えられる PspA family1 と family2 間における交差反応性を同様の母体免疫モデルにおいて、仔マウスに肺炎球菌を腹腔内接種することで全身感染モデルを作成し、生存期間を検討する。

4. 研究成果

(1)

肺炎球菌臨床分離株のほとんどが PspA family1 または family2 であった。和歌山県立医科大学附属病院耳鼻咽喉科外来を受診した急性中耳炎患児より分離された肺炎球菌 251 株のうち、43.8%が family1、51.0%が family2 であった。family3 は 3.2%にとどまり、肺炎球菌臨床分離株の約 95%が family1、family2 に属することが明らかになった。

図1. 肺炎球菌臨床分離株の PspA family



(2)

肺炎球菌株より、PspA2 遺伝子をクローニングし、遺伝子組み換え蛋白を作製した。

(3)

PspA2 の経鼻免疫により母マウス、仔マウス血清中に肺炎球菌特異的抗体が誘導された。成熟した6週齢のメスマウスに PspA2 を用いて経鼻免疫を行った後、同週齢のオスマウスと交配し仔マウスを作成した。生後0、7、14日目の母マウス血清、および仔マウス血清中の抗 PspA 特異的抗体価を ELISA 法を用いて測定した。母マウスの血清中には抗 PspA2 特異的抗体が誘導され、IgG 抗体が優位であった。また、仔マウスの血清中にも出生直後より抗 PspA2 特異的 IgG 抗体を認め、その後も高い値で維持された。

PspA2 による母体免疫により、仔マウスに肺炎球菌特異的抗体を誘導することが可能であった。

図2. 母マウス血清中抗 PspA 特異的抗体価

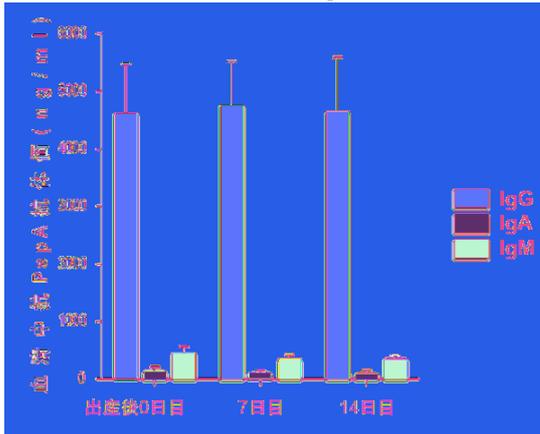
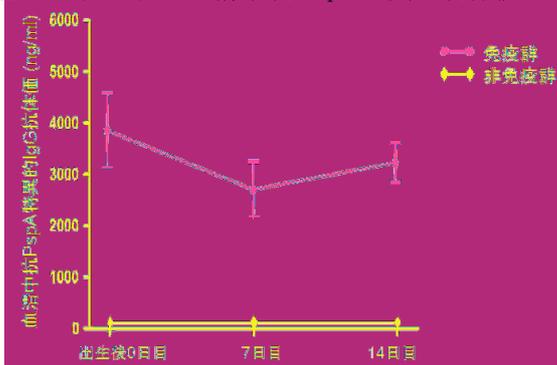
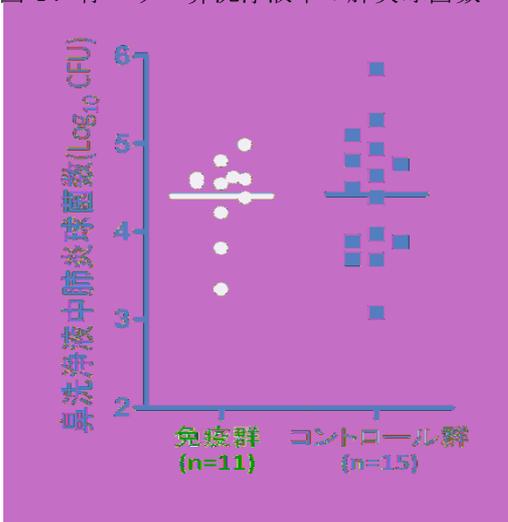


図3. 仔マウス血清中抗 PspA 特異的抗体価



(4)
PspA2 の経鼻免疫による肺炎球菌の鼻咽腔定着の予防効果を検討した。成熟した6週齢のメスマウスにPspA2を用いて経鼻免疫を行った後、同週齢のオスマウスと交配し仔マウスを作成した。仔マウスに肺炎球菌(TIGR4, 血清型4, PspA family2)を経鼻接種し、鼻咽腔コロニーモデルを作成した。免疫群より生まれた仔マウスの鼻腔洗浄液中の肺炎球菌数はコントロール群と比較して有意な変化を認めなかった。

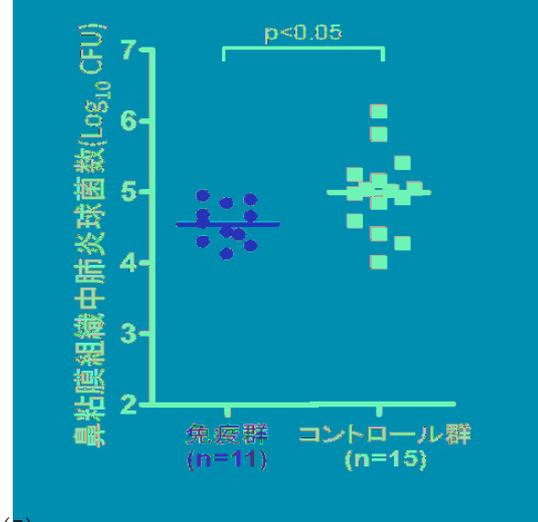
図4. 仔マウス鼻洗浄液中の肺炎球菌数



一方で鼻粘膜組織中の肺炎球菌数は免疫群より生まれた仔マウスの方がコントロールと比較して有意な減少を認めた。

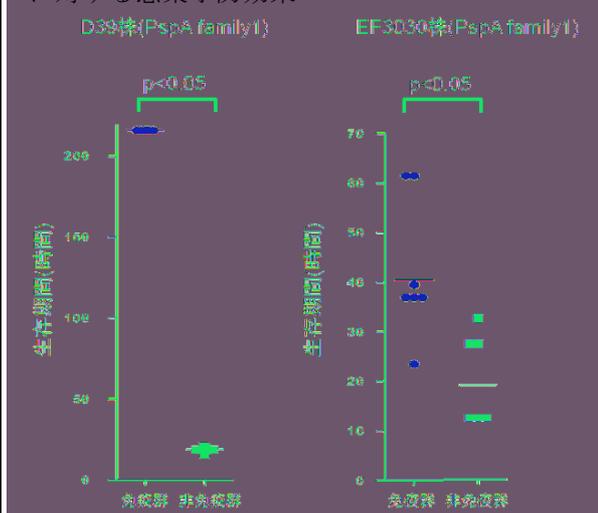
この結果は母マウスの肺炎球菌に対する免疫応答を誘導することで、仔マウスの鼻咽腔において肺炎球菌の定着を抑制することが可能であり、上気道における肺炎球菌の保菌を減少させることができることを示唆している。

図5. 仔マウス鼻粘膜組織中の肺炎球菌数



(5)
PspA1 family と PspA2 family の間には交差反応性が認められた。PspA2 を用いて6週齢のメスマウスに経鼻免疫を行った。(3)と同様の方法で作成した仔マウスにPspA family1であるD39株(血清型2)、EF3030株(血清型19F)をそれぞれ腹腔内投与し、生存期間を検討した。その結果、両菌株ともに免疫群の方が有意に生存期間の延長を認め、PspA family1 と family2 の間に交差反応性が確認された。

図6. 仔マウスの PspA family1 の肺炎球菌に対する感染予防効果



この結果は上気道炎の起炎菌となる肺炎球菌の約95%を占める family1 と family2 には交差反応性があり、PspA2 による免疫により大部分の肺炎球菌に対する鼻咽腔のコロナイゼーションの抑制効果が期待できることが証明された。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 章博 (SAKAI AKIHIRO)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：50423950

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：