

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年5月14日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19599006

研究課題名（和文） 糖鎖ワクチン投与によ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 molecular mechanisms of immunological memory responses against polysaccharides vaccines.

研究代表者

築地 信 (TSUIJI MAKOTO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：90302611

研究成果の概要： 莢膜糖鎖を有する感染性細菌は免疫応答から逃れることにより病原性を発揮する特徴を有する。高齢者の死因トップである肺炎の最大原因菌である肺炎球菌は特徴的な莢膜糖鎖を有しており、宿主の加齢とともに弱った免疫応答から逃れ肺炎を引き起こす。そこで本研究はワクチンの改良法として臨床に還元できる知見を得ることを目的として、糖鎖ワクチン投与による免疫応答のマウスにおける詳細な解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野： 免疫学、糖鎖生物学

科研費の分科・細目： 医歯薬学、生物系薬学

キーワード： 免疫学、免疫記憶、糖鎖、感染症、肺炎球菌、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

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。

特に注目すべき肺炎球菌は、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 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「糖鎖ワクチン投与によ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。

2. 研究の目的

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変化する記憶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。さらに、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、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行うことを計画した。ヒトではCD27が記憶B細胞の表面分子マーカーとして使用出来るが、マウスにおいては、使用出来ず、良い分子マーカーは同定されていないのが現状である。そのことも含めてマウスにPneumovaxを投与した時に、どのようなB細胞

が誘導されてくるのかの詳細な解析を行う。既に、マウスへの糖鎖ワクチン投与により、7日後に血清中のIgM抗体価の上昇が報告されている(Wardemann et al., JEM 2002)ことより、免疫応答の誘導は可能であることは分かっているが、以下の2点は検証が必要である。

(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する抗体であるか?

これらの疑問点を詳細に検証することを目的とし、本研究を計画した。大きな柱は以下の通りである。

- 1-1. 肺炎球菌の感染実験
- 1-2. PneumoVax23の投与と抗体価の検出
- 1-3. 特異的抗体を産生するB細胞の検出と特徴解析
- 1-4. 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)

本研究によって解明されることが期待される分子メカニズムについての知見は、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。さらに、免疫学へのインパクトは、現在、大別されて議論されるT細胞非依存性と依存性の免疫応答の両者間の制御メカニズム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もある。

3. 研究の方法

(1) 免疫応答の指標となるB細胞の抗体遺伝子レパトアのマウスにおける評価方法の確立

セルソーティングによってB細胞をシングルセルの状態に分取し、未知である抗体遺伝子の重鎖および軽鎖の可変部領域の遺伝子断片をRT-PCR法によって増幅する為のプライマーを設計し条件を決定し、評価方法を確立した。現在、野生型マウスや単一BCR(B細胞抗原受容体)導入マウスの正常状態におけるB細胞サブpopulationのレパトアのデータを蓄積中である。

(2) 肺炎球菌の莢膜糖鎖ワクチンをモデル

抗原としたマウスにおける免疫応答の解析

C57BL/6 マウスへ肺炎球菌の莢膜糖鎖 (Pneumococcal Polysaccharides; PPS) を投与し、誘導される特異的抗体の血清抗体価を測定した。さらに PPS 投与マウスから B 細胞を調整し標識 PPS 結合性を指標に特異的 BCR を有する B 細胞を同定した。これまでに脾臓細胞について解析したが、その結果、免疫をしていないマウスの脾臓内に結合性を有する B 細胞が一部存在し、時間とともに脾臓内から減少することが明らかになった。糖鎖抗原投与後 1 週間までの血清抗体価の測定と、蛍光標識した糖鎖抗原を用いた特異的 B 細胞の検出条件を検討中である。一方で、糖鎖抗原特異的抗体を取得しており、現在この抗体遺伝子を単一に産生する遺伝子導入マウスを作製中である。

4. 研究成果

莢膜糖鎖を有する感染性細菌は免疫応答から逃れることにより病原性を発揮する特徴を有する。高齢者の死因トップである肺炎の最大原因菌である肺炎球菌は特徴的な莢膜糖鎖を有しており、宿主の加齢ともに弱った免疫応答から逃れ肺炎を引き起こす。莢膜糖鎖をワクチンとして投与した時には初期的に抗体を誘導できるがその後の持続年数を決定する要因については、T細胞非依存性に起こることについては議論されているが、十分な知見が得られていないのが現状である。そこで本研究はワクチンの改良法として臨床に還元できる知見を得ることを目的として、糖鎖ワクチン投与による免疫応答の解析を行った。

平成 20 年度は、C57BL/6 マウスへ肺炎球菌の莢膜糖鎖 (Pneumococcal Polysaccharides type 3; PPS3) を投与し脾臓、骨髄、腹腔浸出細胞から B 細胞を調整し、蛍光標識 PPS 結合性を指標に、特異的 BCR (B 細胞抗原受容体) を有する B 細胞の解析を行った。特異的な抗体を産生している B 細胞数を同定することを目的に ELISPOT 法の確立を行った。血中の抗 PPS3-IgM 抗体の抗体価がピークとなる免疫後 7 日目の B 細胞を調整し検出を試みたところ、一般に良く解析されているモデル抗原 (NP-Ficoll、NP-CGG) への応答と比べて、その上昇率は低いが、抗体産生細胞が検出された。現在、経時変化を解析中である。さらにハイブリドーマ法およびシングルセルクローニング法にて抗 PPS モノクローナル抗体を取得した。現在までに 4 個の抗体を同定しており、その抗体の特異性親和性などの特性

を解析中である。これらの抗体遺伝子の配列決定および解析を行い、更なる解析のためのトランスジェニックマウスの作製を開始した。

特異的 BCR を単一に産生する遺伝子導入マウスは、今後の記憶 B 細胞および抗体産生プラズマ細胞へと分化過程の解析において、有効なツールとして、可能性が期待される。今回の研究において、この様なマウスを作製出来るための、礎になった。

今後もワクチンの改良法として臨床に還元できる知見を得ることを目的として、更なる解析を行っていく予定である。

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 5 件)

(1) Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, and Wardemann H. (2007). Autoreactivity in human IgG(+) memory B cells. *Immunity*. 26, 205-213. (査読有り)

(2) Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, and Wardemann H. (2008), Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods*. 329, 112-124. Erratum: 334, 142 (2008). (査読有り)

(3) Mietzner B, Tsuiji M, Scheid J, Velinzon K, Tiller T, Abraham K, Gonzalez JB, Pascual V, Stichweh D, Wardemann H, and Nussenzweig MC. (2008), Autoreactive IgG(+) memory antibodies in patients with systemic erythematosus arise from nonreactive and polyreactive precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 9727-9732. (査読有り)

(4) Oo-Puthinan S, Maenuma K, Sakakura M, Denda-Nagai K, Tsuiji M, Shimada I, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J, Bovin NV, and Irimura T. (2008), The amino acids involved in the distinct carbohydrate specificities between macrophage galactose-type C-type lectins 1 and 2 (CD301a and b) of mice. *Biochim Biophys Acta*. 1780, 89-100. (査読有り)

(5) Itoh Y, Kamata-Sakurai M, Denda-Nagai K, Nagai S, Tsuiji M, Ishii-Schrade K,

Okada K, Goto A, Fukuyama M, and Irimura T. (2008), Identification and expression of human epiglycanin/MUC21: a novel transmembrane mucin. *Glycobiology*. 18, 74-83. (査読有り)

[学会発表] (計2件)

(1) **Tsuiji M**, Mietzner B, Scheid J, Feraoun N, Yurasov S, Velinzon K, Wardemann H and Nussenzweig MC. IgG plasmablast and memory B cell antibodies in patients with SLE. Keystone symposia, Biology of B cells in Health and Disease 2007, Feb. 9th, ポスター発表

(2) Tiller T, **Tsuiji M**, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC and Wardemann H. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. Keystone symposia, Biology of B cells in Health and Disease 2007, Feb. 10th, ポスター発表

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築地 信 (TSUIJI MAKOTO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任
講師

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