

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08836

研究課題名(和文) 酸化鉄ナノ粒子をアジュバントとする新規肺炎球菌ワクチンの免疫応答活性化機序の解析

研究課題名(英文) Mechanism of immune response by a novel pneumococcal vaccine with iron oxide nanoparticles as adjuvant

研究代表者

石井 恵子 (Ishii, Keiko)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：00291253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：すべての肺炎球菌に共通する pneumococcal surface protein A (PspA) を酸化鉄ナノ粒子(iron oxide magnetic nanoparticle: IONP)に結合させた新規肺炎球菌ワクチンPspA-IONPを作成した。PspA-IONPは経気道投与マウスにおいてPspA単独では誘導できない粘膜IgA抗体を産生させ、菌の増殖を抑制し、マウス生存期間を延長させるワクチン効果を示した。気管支分岐部には誘導気管支関連リンパ組織(iBALT)が形成され、IgAへのクラススイッチにインバリアントナチュラルキラーT(iNKT)細胞が関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の肺炎球菌ワクチンは、ワクチンに含まれない血清型が流行する「血清型置換」という課題をかかえている。本研究では、全ての血清型の菌で共通のタンパク質PspAと担体としての酸化鉄ナノ粒子(IONP)を結合させ、新規のユニバーサルワクチンであるPspA-IONPを開発した。PspA-IONPの顕著なワクチン効果がIONPのアジュバント機能によるものであることが明らかになったことから、IONPワクチンは他の感染症ワクチンのプラットフォームとして発展が見込める。さらに、IONPは乾燥や高温に強いいため、IONPワクチンをドライパウダー吸入型ワクチンとすることで、保存や輸送、投与法の改善に寄与しうる。

研究成果の概要(英文)：We newly constructed a pneumococcal vaccine PspA-IONP by combining pneumococcal surface protein A (PspA) and iron oxide magnetic nanoparticles (IONP). Introduction into mouse tracheal of PspA-IONP but not PspA alone induced mucosal IgA antibody. PspA-IONP in mice infected with pneumococcus revealed vaccine effects, including reduced bacterial proliferation and longer survival time. We found the formation of inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in the PspA-IONP-treated mouse lungs and the involvement of invariant natural killer T (NKT) cells in IgA class switching.

研究分野：感染免疫学

キーワード：肺炎球菌ワクチン 酸化鉄ナノ粒子 粘膜免疫 気管支関連リンパ節 IgA

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の2016年人口動態統計(厚生労働省)によると、肺炎は我が国の死亡原因の3位であり、肺炎で死亡する人の97%以上が65歳以上の高齢者であった。肺炎の原因となる微生物で最も多いのは肺炎球菌である。子どもの鼻咽頭粘膜に定着した菌が乳幼児や高齢者、基礎疾患をもつ患者に伝播すると髄膜炎などの重篤な症状を起こしやすいため、ワクチンによる予防が重要である。肺炎球菌は多糖でできた厚い莢膜をもつ。菌が侵入した宿主体内では莢膜をはじめとする菌体成分に対する抗体が誘導され、抗体が結合した菌は好中球により効果的に排除される。現行の肺炎球菌ワクチンは莢膜を抗原とするワクチンで、莢膜に対する抗体を誘導する生体の免疫システムを利用している。肺炎球菌の莢膜には約100種の型(血清型)があり、流行株に限っても約30種の血清型が認められる。そのため、ワクチンはより多くの血清型の莢膜を含む多価ワクチンであることが望まれるが、現行のワクチンで莢膜のみからなるものは23価、抗体産生を効率化するためのタンパク質結合莢膜ワクチンは最大13価である。小児に対する13価ワクチンは有効で、ワクチンに含まれる血清型の菌は減少した。しかし、ワクチンに含まれない菌の増加が認められるようになり、より多価の莢膜ワクチンの開発が進められている。

一方で、全ての血清型の肺炎球菌が共通にもつタンパク質を抗原にすることにより、血清型に左右されないユニバーサルワクチンの開発が模索されている。数多くのタンパク質が抗原候補として検討され、臨床試験に入っているものもある。中でも pneumococcal surface protein A (PspA) は抗原性が高いことから有望視されている。本研究に先立って、我々は2017-2019年度の科研費基盤(C)「酸化鉄ナノ粒子を用いた粘膜免疫を標的とする新規肺炎球菌ワクチンの開発」において、PspAを貪食細胞に取り込まれやすい酸化鉄ナノ粒子(iron oxide magnetic nanoparticle: IONP)と結合させることにより、新規肺炎球菌ワクチン PspA-IONP を作製した。PspA-IONP を気道経路でマウスに投与すると、PspA 単独では誘導されなかった分泌型 IgA 抗体が誘導された。この結果は、IONP がアジュバントとして機能することにより粘膜免疫が誘導されたことを示唆する。

## 2. 研究の目的

PspA-IONP をマウスに経気道的に投与すると肺胞洗浄液(BALF)中にIgAが出現するが、IgAがどこでどのように産生され、分泌されるかは不明であった。感染に際して出現する誘導気管支関連リンパ組織(iBALT)が肺内に形成されるか、その中にIgA形質細胞が存在するか、さらに分泌の際の細胞内輸送に関わる polymeric Ig receptor (pIgR) 発現細胞の誘導について明らかにする。IgAへのクラススイッチにはサイトカインが関与することが知られるが、感染初期からサイトカインの産生源として機能するナチュラルキラーT(NKT)細胞が関与する可能性があるため、NKT細胞欠損マウスを用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) PspA-IONP の作製: His-tag と IONP 結合用のペプチドを付加した PspA を大腸菌で発現させ、His-tag-アフィニティカラムで精製した。大腸菌由来 LPS を除去後、IONP と結合させ PspA-IONP とした。

(2) PspA-IONP のマウスへの投与: PspA-IONP をマウスに経気道的に週1回の頻度で3回投与し、最終投与から1週間後に肺組織あるいは肺胞洗浄液(BALF)を採取した。対照マウスには、PBS または PspA のみ、IONP のみを投与した。

(3) PspA 特異的抗体価測定: 上記 BALF について、PspA を抗原とする ELISA で、IgA および IgG 抗体を測定した。

(4) 肺の病理学的解析: PspA-IONP を投与した C57BL/6 マウスから肺を摘出し、HE 染色および免疫染色により iBALT の形成および IgA 産生細胞を対照マウスと比較した。

(5) NKT 細胞の関与の検討: J $\alpha$ 18 遺伝子をノックアウト(KO)することで NKT 細胞を欠損させたマウスおよび対照の C57BL/6 野生型マウスに PspA-IONP を投与し、粘膜 IgA の産生、iBALT の形成、IgA の分泌に関与する pIgR 産生細胞、肺胞洗浄液(BALF)中のサイトカイン量を比較した。

## 4. 研究成果

### (1) iBALT の形成と iBALT 内の IgA 産生細胞

粘膜 IgA 産生のある場である iBALT の形成を調べるため、PspA-IONP を経気道的に投与したマウスの肺について、病理学的解析を行なった。PspA-IONP 投与マウスの肺の HE 染色では気管支近傍に iBALT と思われる細胞の集簇が見られた。また、抗 IgA 抗体を用いた免疫染色で、iBALT 内に IgA 産生細胞の存在を確認した。PBS や PspA のみの投与マウスでは細胞集簇も IgA 産生細胞も観察されなかった。一方、IONP のみを投与したマウスでは細胞集簇が観察されたが、その数は PspA-IONP 投与マウスに比べ少なく、IgA 陽性細胞も確認されなかった(Fig. 1A)。総気管支数に対する細胞集簇域(iBALTと表示)の割合からも、IONP 単独と PspA-IONP

の作用の違いは明らかである (Fig. 1B)。これらの結果は、機能的 iBALT の形成に抗原としての PspA が必要であることを示す。

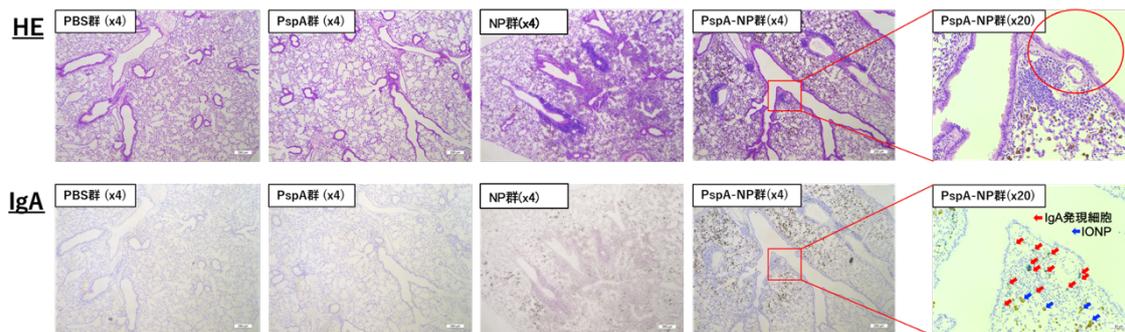
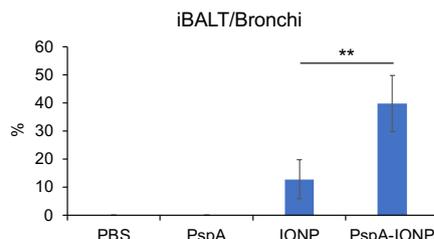


Fig.1A iBALT の形成と IgA 抗体産生細胞 ← IgA 発現細胞 (緑) ← IONP (茶)

Fig. 1B 気管支に対する iBALT 形成率 (\*\*  $p < 0.01$ )



## (2) NKT 細胞の IgA 産生への関与

粘膜 IgA の分泌に NKT 細胞が産生するサイトカインが関与するかを調べる目的で、 $J\alpha 18KO$  マウスに PspA-IONP を投与し、BALF 中に分泌された IgA 量、iBALT 数、気管支上皮細胞中の pIgR 発現細胞数、BALF 中各種サイトカイン量を測定した。

### ① $J\alpha 18KO$ マウスの BALF 中の IgA 抗体

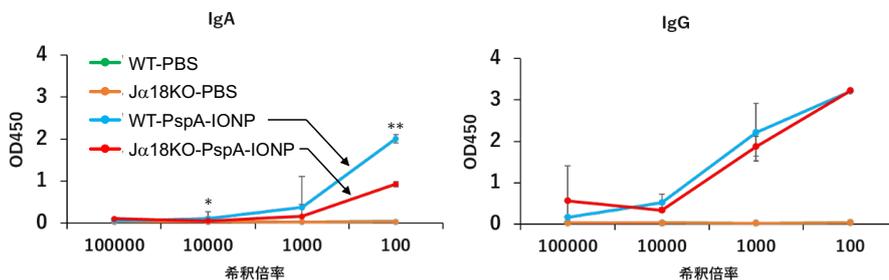
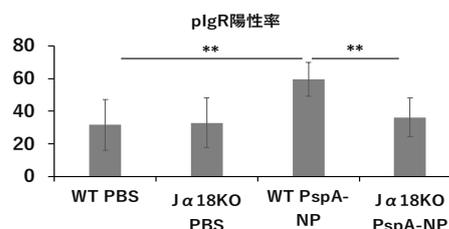


Fig. 2A PspA-IONP を投与した  $J\alpha 18KO$  マウスにおける BALF 中抗体分泌量 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; WT PspA-NP 群と  $J\alpha 18KO$  PspA-NP 群の比較)

PspA-IONP を投与した  $J\alpha 18KO$  マウスでは、BALF 中の IgA の産生が WT マウスに比べ低かったが、完全に抑制されてはいなかった。一方、NKT 細胞欠損は IgG の産生に影響しなかった (Fig. 2A)。

### ② $J\alpha 18KO$ マウスにおける iBALT 形成と pIgR 産生

Fig. 2B pIgR 発現細胞への NKT 細胞の影響 (\*\*  $p < 0.01$ )



PspA-IONP による iBALT の形成率は  $J\alpha 18KO$  マウスと WT マウスの間で差がなかったが、IgA の分泌に関与する pIgR 発現細胞の気管支上皮細胞数に対する割合は WT マウスに比べ  $J\alpha 18KO$  マウスで低かった (Fig. 2B)。

### ③ $J\alpha 18KO$ マウスの BALF 中のサイトカイン

PspA-IONP 投与マウスの BALF 中で検出されるサイトカインのうち、炎症性サイトカイン IL-6 および TNF- $\alpha$  が WT マウスに比べ  $J\alpha 18KO$  マウスで低かった。IgA 産生に関与するサイ

トカインでは IL-4 および IL-5 が  $J\alpha 18KO$  マウスで低い傾向を示した (Fig. 2C)。一方、TGF- $\beta$  は WT マウスと  $J\alpha 18KO$  マウスで差がなかった。

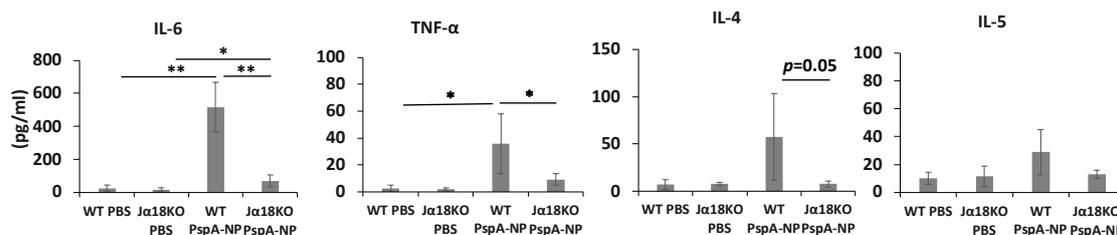


Fig. 2C BALF 中サイトカイン濃度への NKT 細胞の影響 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

以上の結果から、NKT 細胞はサイトカインの分泌によって気管支上皮細胞における pIgR の発現を活性化することで、粘膜 IgA の分泌に部分的に関与することが示唆された。

### (3) まとめと考察

優れた抗原性を持つ PspA とこれまでワクチンの担体としてほとんど用いられてこなかった IONP を結合させて、新規肺炎球菌ワクチン PspA-IONP を作製した。PspA-IONP のマウス気道への投与によって、気管支に沿った位置に IgA 産生細胞を含有する iBALT が形成された。IONP は単独でも細胞の集簇を形成したことから、何らかの免疫応答を起こすと考えられるが、この集簇は粘膜 IgA 産生に関与しなかった。NKT 細胞が産生するサイトカインは IgA へのクラススイッチおよび pIgR を介した粘膜 IgA 分泌に関与することが示唆された。NKT 細胞欠損による粘膜 IgA の産生低下は部分的であったため、他の要因を考慮に入れる必要があり、どのサイトカインが直接的にクラススイッチに影響するかについても、詳細な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩岡大貴、高倉直幸、佐藤 光、笠松 純、石井恵子、川上和義
2. 発表標題 肺炎球菌酸化鉄ナノ粒子ワクチンによる抗体産生：Poly（I:C）のアジュバント効果の解析
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩岡大貴、中平絢子、佐藤光、笠松純、石井恵子、川上和義
2. 発表標題 酸化鉄ナノ粒子を用いた新規肺炎球菌ワクチンの作製とその感染防御効果
3. 学会等名 第94回日本感染症学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井恵子、中平絢子、岩岡大貴、富樫貴成、川上和義
2. 発表標題 酸化鉄ナノ粒子をアジュバントとして用いた新規肺炎球菌ワクチン
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科保健学専攻基礎検査医学領域感染分子病態解析学分野  
<http://www.infect-immun.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------