

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20976

研究課題名（和文）母体免疫による新生児免疫機構構築と免疫担当細胞の単一細胞解析

研究課題名（英文）Single-cell analysis of immune cells during the construction of the neonatal immune system by maternal immunization

研究代表者

伊豫 巧朗（IYO, TAKURO）

和歌山県立医科大学・医学部・准客員研究員

研究者番号：70895820

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：Pneumococcal surface protein A (PspA) を用いて母体経鼻免疫を行った。免疫母マウス由来の子マウスの脾臓では、抗PspA特異的抗体産生細胞が有意に増加していた。離乳後3週間経過した6週齢にPspAを単回皮下投与した後に仔マウス血清中抗体価を測定したところ、非免疫母マウス由来仔マウスと比較して抗PspA特異的抗体価が高値を示した。また、肺炎球菌の全身感染モデルでは非免疫群と比較し生存率の上昇を認めた。母仔の脾臓細胞をPspAで刺激すると、両者ともIFN-g、IL-17Aの産生量が増加した。母体免疫においては仔への移行抗体だけではなく、免疫機構構築にも関与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は母体からの免疫移行による乳幼児の免疫賦活に着目した。先行研究において、母乳および経胎盤より移行した抗肺炎球菌特異的抗体が仔マウスにおいて肺炎球菌の鼻腔保菌、肺感染、全身感染を抑制することが知られているが、移行抗体以外の因子については十分な検討がなされていない。本研究は、母体免疫が児の免疫機構構築に及ぼす影響を明らかにするとともに、肺炎球菌感染症を抑制する機序を解明し、新規ワクチン戦略に貢献することを目的とする。すなわち、肺炎球菌共通抗原による経鼻免疫を受けた母マウス由来の仔マウスにおける免疫機構の賦活と免疫学的記憶の獲得について、調査する。

研究成果の概要（英文）：Although the current pneumococcal vaccines have various benefits, the inability to vaccinate infants demands the development of new strategies. Maternal immunization enables to protect infants, although its mechanism is still not fully understood. The current study aimed to elucidate the mechanism of maternal immunization with pneumococcal common antigen PspA. 4w-old female mice were immunized with recombinant PspA intranasally, then mated with males after immunization. 1w-old offspring derived from and fostered by immunized mothers had more anti-PspA-specific antibody producing cells in the spleen than those derived from sham-immunized mothers. The 6w-old offspring were subcutaneously stimulated with rPspA. The levels of anti-PspA antibodies in sera after stimulation were significantly higher in the offspring derived from the immunized mothers and showed protective efficacy against systemic infection. Maternal immunization would be able to provide a sustained immunity to offspring.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：母体免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2歳未満の乳幼児期は未成熟な免疫能を背景に急性中耳炎の反復化をきたす。現行のタンパク結合型莢膜多糖体ワクチンの問題点として、血清型特異的であることと、免疫原性を高めているものの、一部の乳幼児には十分な免疫賦活効果が得られないことが挙げられる。言語獲得期における感覚器感染症の反復は聴覚障害の原因となることから、急性中耳炎の反復・遷延予防は現在においても臨床上の重要な課題であり、より多くの肺炎球菌をカバーし、乳幼児に免疫を誘導できる戦略の開発が急務である。

2. 研究の目的

申請者は母体からの免疫移行による乳幼児の免疫賦活法に着目した。先行研究において、母乳および経胎盤より移行した抗肺炎球菌特異的抗体が仔マウスにおいて肺炎球菌の鼻腔保菌、肺感染、全身感染を抑制することが知られているが、移行抗体以外の因子については十分な検討がなされていない。本研究は、母体免疫が児の免疫機構構築に及ぼす影響を明らかにするとともに、肺炎球菌感染症を抑制する機序を解明し、新規ワクチン戦略に貢献することを目的とする。すなわち、肺炎球菌共通抗原による経鼻免疫を受けた母マウス由来の仔マウスにおける免疫機構の賦活と免疫学的記憶の獲得について、調査する。

3. 研究の方法

肺炎球菌の共通抗原である肺炎球菌表面蛋白抗原 A (PspA) の遺伝子組換えタンパク (rPspA) を作成し、妊娠前の4週齢雌マウス (C57BL/6) に粘膜アジュバントであるコレラトキシン B サブユニットとともに週2回・2週間、rPspA 単独を週2回・1週間の計6回経鼻免疫した後に、同週齢の雄と交配した。

・まず免疫後の雌マウスの脾臓を採取し、rPspA 刺激に対するサイトカイン産生量を ELISA にて評価した。

・次に、1週齢の仔マウスの脾臓を採取し、抗 PspA 特異的抗体産生細胞数を ELISpot で、rPspA 刺激に対するサイトカイン産生量を ELISA にて評価した。

・その後、仔マウスは3週齢で離乳し、6週齢で rPspA 10 µg を皮下に単回投与した。rPspA 刺激後3日後、7日後、14日後、21日後に抗 PspA 特異的抗体を ELISA 法にて評価した。

・最後に、rPspA 刺激から2週間後に、 1×10^2 CFU の肺炎球菌 (TIGR4 株) を腹腔内投与による全身感染モデルを作成し、生存率を評価した。

仔マウスは、経胎盤免疫および母乳栄養の2つの因子が主に関与している可能性を考慮し、出産直後に仔マウスを交換することで、

A 群：免疫母マウス由来で免疫母マウスに哺乳された群

B 群：非免疫母マウス由来で免疫母マウスに哺乳された群

C 群：免疫母マウス由来で非免疫母マウスに哺乳された群

D 群：非免疫母マウス由来で非免疫母マウスに哺乳された群

の4群を作成し、それぞれの PspA に対する免疫応答を評価した。

4. 研究成果

1 週齢の時点で、A 群の脾臓における抗 PspA 特異的 IgG 産生細胞数は D 群のそれと比較して、有意な上昇を認めた(図 1)。一方で、B 群、C 群の脾臓中の抗 PspA 特異的 IgG 産生細胞数の増加はみられなかった。

また、1 週齢の時点で、脾臓細胞を rPspA にて刺激すると、A 群では D 群と比較して IFN- γ 、IL-17A の産生量が有意に増加した(図 2)。rPspA の経鼻免疫が完了した成熟雌マウスの脾臓細胞を rPspA にて刺激すると、A 群と同様に IFN- γ 、IL-17A の産生量が有意に増加した(図 3)。

図 1. 仔マウス脾臓における抗PspA特異的IgG抗体産生細胞数

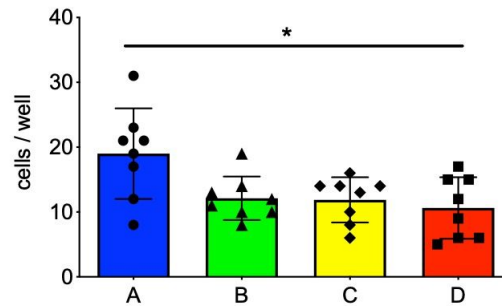


図 2. PspA刺激による成熟雌マウス脾臓細胞のサイトカイン産生量

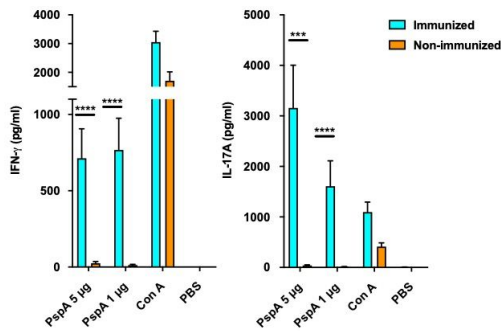
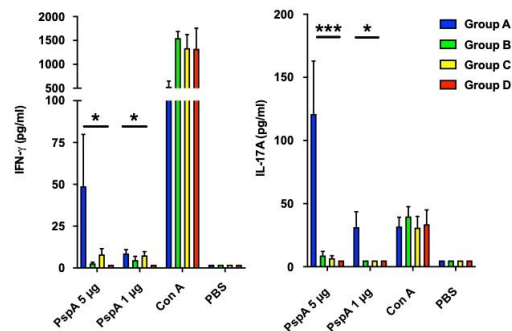


図 3. PspA刺激による仔マウス脾臓細胞のサイトカイン産生量



次に、仔マウスを 3 週齢の時点で離乳し、母乳由来の移行抗体が消失する 6 週齢の時点で rPspA を皮下投与し、血清中抗肺炎球菌特異的抗体価の経時的な変化を調査した。A 群では抗 PspA 特異的 IgM 抗体および IgG サブクラスの IgG1、IgG2a、IgG2b いずれの特異的抗体価も、D 群と比較して、有意に上昇した(図 4)。

最後に、rPspA 皮下投与から 2 週間後に肺炎球菌による全身感染モデルを作成した。調査対象は抗体価に有意差がみられた A 群と D 群とした。D 群は感染から 36 時間以内にすべてのマウスが致死性感染症に至ったのに対し、A 群は 40%のマウスが生存し、有意に生存率の上昇を認めた(図 5)。

図 4. PspA皮下投与後の仔マウス血清中抗PspA特異的抗体価

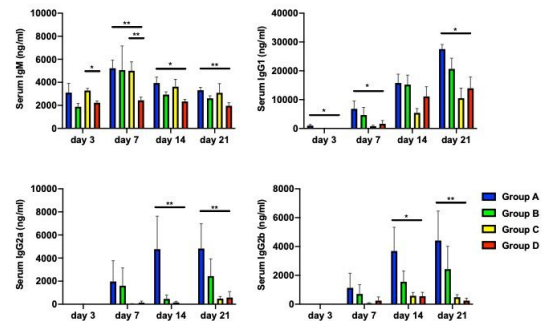
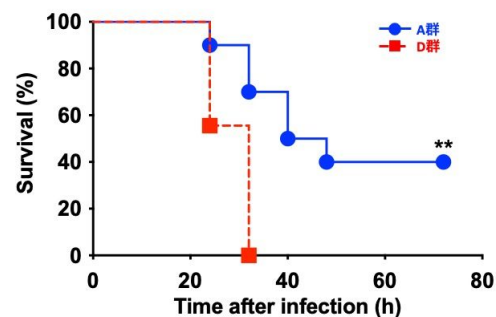


図 5. PspA刺激後の肺炎球菌全身感染症における生存率



母体免疫は、一時的に効果を有する移行抗体のみではなく、児の免疫機構の構築自体にも大きく関与し、児の持続的な免疫賦活に寄与していることが示唆された。PspA による母体免疫は、免疫学的に未成熟な乳幼児において遺伝的に多様である肺炎球菌に広く効果を示す免疫賦活法として有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kono Masamitsu, Iyo Takuro, Murakami Daichi, Sakatani Hideki, Nanushaj Denisa, Hotomi Muneki	4. 巻 13
2. 論文標題 Maternal immunization with pneumococcal surface protein A provides the immune memories of offspring against pneumococcal infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1059603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2023.1059603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊豫巧朗、河野正充、保富宗城
2. 発表標題 母体免疫が乳幼児免疫機構構築におよぼす影響の検討
3. 学会等名 第71回日本化学療法学会学術集会 第97回日本感染症学会総会・学術講演会 合同学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊豫巧朗、村上大地、河野正充、保富宗城
2. 発表標題 母体免疫による母乳を介した免疫移行が乳幼児期の免疫応答におよぼす影響
3. 学会等名 第124回日本耳鼻咽喉科頭頸部外科学会総会ならびに学術講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------