

NKTfh 細胞による IgG 抗体産生誘導機構の解明

国立感染症研究所 真菌部第三室（免疫制御研究室）

金城 雄樹

1. はじめに

肺炎球菌は肺炎、中耳炎、副鼻腔炎、菌血症や髄膜炎などをおこす主な起炎細菌である。肺炎球菌感染症例は、5歳未満の小児と60歳以上に多い二峰性の年齢分布を示す。高齢者では肺炎球菌性肺炎の発症が多く、肺炎が日本人の死因で3番目に多い大きな要因となっている。また、小児では特に髄膜炎が問題となる。肺炎球菌感染による死亡者数は世界中で年間160万人にのぼり、5歳未満小児が半数以上を占めると推計されている。

肺炎球菌は菌表層の莢膜多糖体の構造の違いにより100種類の血清型に分類される。現行肺炎球菌ワクチンは、主な血清型の多糖体を抗原として用いているが、近年、現行の13価多糖体結合型ワクチン（PCV13）に含まれない非ワクチン血清型の増加が懸念されている。そのため、肺炎球菌感染に対する防御免疫機構の解明及びその知見に基づく有効なワクチン開発は重要である。

私達は、血清型に依存しない幅広い感染防御効果をもたらす新規ワクチンの開発を目指し、肺炎球菌表層に存在する蛋白抗原を用いて、免疫応答及び感染防御効果の解析を行ってきた。また、これまでに肺炎球菌感染早期において、リンパ球のnatural killer T (NKT) 細胞が細菌糖脂質の認識を介して感染防御に貢献することを明らかにした。NKT細胞は糖脂質抗原の認識により速やかに大量のサイトカインを産生して自然免疫を活性化する。サイトカイン産生に加えて、補助分子による刺激により樹状細胞の成熟を介して獲得免疫の誘導を増強することから、優れたアジュバント効果が期待される。そこで本研究では、肺炎球菌蛋白・糖脂質経鼻ワクチンによる肺炎球菌感染に対する防御効果を解析すると共に、感染防御に重要なIgG抗体産生誘導機構の解明を目指して、NKT細胞の活性化を介する抗体産生誘導機構に関する免疫学的解析を行った。

2. 方法

a. 肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチンの免疫及び肺炎球菌感染防御効果の解析

C57BL/6マウスに肺炎球菌表層蛋白及び糖脂質を経鼻接種し、その後、肺炎球菌表層蛋白を2回追加接種した。最終免疫の2週間後に、肺炎球菌血清3型を感染させ、生存期間及び肺内菌数を測定した。また、非PCV13ワクチン血清型の肺炎球菌に対する感染防御効果を解析するため、免疫マウスに血清型6Cまたは38の肺炎球菌を感染させ、肺内菌数を測定した。

b. 肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチン免疫血漿移入による感染防御効果の解析

上述のように肺炎球菌表層蛋白及び糖脂質ワクチンを免疫したマウスの免疫血漿または糖脂質のみを投与したマウスの血漿を採取し、ナイーブマウスに腹腔内投与した。血清型3の肺炎球菌を感染させて、生存期間を観察した。

c. 濾胞性ヘルパーNKT細胞及び胚中心B細胞のフローサイトメトリー解析

肺炎球菌表層蛋白・糖脂質ワクチンまたは肺炎球菌表層蛋白のみを経鼻摂取し、3～13日後に頸部リンパ節を採取して、濾胞性ヘルパーNKT細胞（PBS57/CD1dテトラマー陽性、CD19陰性、TCR β 陽性、CXCR5陽性、PD-1陽性）、濾胞性ヘルパーT細胞（CD4陽性、CD44高発現、TCR β 陽性、CXCR5陽性、PD-1陽性）及び胚中心B細胞（蛋白抗原陽性、GL7陽性、CD38陰性、B220陽性、IgG1陽性、IgD/IgM陰性）の発現分子の染色後、フローサイトメトリー解析を行った。濾胞性ヘルパーNKT細胞のIL-4及びIL-21産生の解析では、ヒトCD2-IL-4 BACトランスジェニックマウス及びヒトCD2-IL-21 BACトランスジェニックマウス（理化学研究所・東京理科大学 久保允人先生より分与いただいた）に肺炎球菌表層蛋白・糖脂質ワクチンを免疫し、頸部リンパ節の細胞を採取して、発現分子の染色後、フローサイトメトリー解析を行った。また、多様性に乏しいT細胞受容体を発現するinvariant NKT細胞を欠損したJ α 18遺伝子欠損マウス（理化学研究所 谷口 克先生より分与いただいた）と野生型マウスに肺炎球菌表層蛋白・糖脂質ワクチンを経鼻接種し、胚中心B細胞の誘導についてフローサイトメトリー解析を行った。

3. 結果

a. 肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチン接種マウスでの感染防御効果

肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチン接種マウスに、成人の侵襲性肺炎球菌感染症例から分離される頻度が高い血清型3の菌株を肺に感染させ、生存期間を観察したところ、本ワクチン群では無処置マウスや肺炎球菌蛋白単独接種などの対照群と比較して、有意に生存率が高かった。また、感染3日後の肺内菌数を解析したところ、本ワクチン群では対照群と比較して、顕著に菌数が少なかった。さらに、非PCV13血清型の6Cや38の感染においても、本ワクチン群では対照群と比較して有意な菌体排除効果を認めた。このことから、本肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチンは非PCV13血清型肺炎球菌の感染に対しても感染防御効果をもたらすことが示唆された。

b. 肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチン免疫マウスの血漿移入による感染防御効果

肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチン接種マウスでは、血中に蛋白抗原特異的IgG抗体価の上昇を認め、抗原に対して高親和性の抗体であることが分かった。本ワクチンによる肺炎球菌感染防御における抗体の重要性を確認するため、本ワクチン接種マウスの免疫血漿または糖脂質単独接種マウスの血漿をナイーブマウスに移入し、肺炎球菌感染後の生存を観察したところ、本ワクチン免疫血漿を移入した群では、糖脂質単独接種マウスの血漿を移入した群と比較して、生存率が有意に高かった。この結果より、本肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチンによる肺炎球菌感染防御には、抗体が重要であることが明らかになった。

c. 濾胞性ヘルパーNKT細胞の誘導とサイトカイン産生

本ワクチン経鼻接種マウスの頸部リンパ節を用いた解析にて、PD-1⁺ CXCR5⁺ 濾胞性ヘルパーNKT (NKT_{PH}) 細胞が誘導されることが分かった。興味深いことに、通常、胚中心B細胞の活性化において重要な役割を担うPD-1⁺ CXCR5⁺ 濾胞性ヘルパーT (T_{PH}) 細胞については、本ワクチン免疫マウスの頸部リンパ節では有意な増加を認めなかった。また、本ワクチンによって誘導されたNKT_{PH}細胞はIL-4及びIL-21を産生することを明らかにした。これらのサイトカインは抗原特異的IgG抗体を産生する胚中心B細胞の活性化に重要であることから、本ワクチンによるIgG抗体産生誘導にNKT_{PH}細胞が重要な役割を担う可能性が示唆された。

d. NKT細胞依存性の胚中心B細胞の誘導

本ワクチン免疫マウスの頸部リンパ節にて、蛋白抗原特異的胚中心B細胞の誘導を認めた。胚中心B細胞の誘導におけるNKT細胞の役割を明らかにするため、野生型マウスとJ α 18遺伝子欠損マウス（多様性に乏しいT細胞受容体を発現するinvariant NKT細胞の欠損マウス）に本ワクチンを接種し、胚中心B細胞の誘導を解析したところ、J α 18遺伝子欠損マウスでは蛋白抗原特異的胚中心B細胞の誘導が障害されていた。このことから、本肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチンによる胚中心B細胞の誘導には、NKT細胞が重要であることが明らかになった。

4. 考察・まとめ

本研究にて、肺炎球菌蛋白・糖脂質経鼻ワクチン接種により蛋白抗原特異的IgG抗体が産生され、肺炎球菌感染防御効果をもたらすことが明らかになった。免疫血漿の移入実験にて本ワクチンによる肺炎球菌感染防御にはIgG抗体産生が重要であることが明らかになったため、本ワクチンによるIgG抗体産生機構の解析を行い、NKT_{PH}細胞がIL-4及びIL-21の産生を介して、抗原特異的胚中心B細胞の誘導をもたらす可能性が示唆された。しかし、NKT_{PH}細胞による胚中心B細胞の誘導に関する詳細な機序は明らかになっていないことから、今後さらなる解析が必要である。本肺炎球菌蛋白・糖脂質ワクチンは、現行のPCV13ワクチンに含まれない血清型に対しても感染防御効果を認めたことより、血清型に依存しない幅広い感染防御効果をもたらす可能性が期待される。今後の解析により、NKT_{PH}細胞を介した抗体産生誘導機構を解明することで、優れた感染防御効果をもたらす新規ワクチンの開発に繋げたい。

5. 参考文献

1. Kinjo Y, Illarionov P, Vela JL et al. Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol*, 12(10):966-74, 2011.
2. Iwamura C, Shinoda K, Endo Y et al. Regulation of memory CD4T-cell pool size and function by natural killer T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(42):16992-7, 2012.
3. Kinjo Y, Kitano N, Kronenberg M. The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. *J Infect Chemother*, 19(4):560-70, 2013.
4. Miyasaka T, Akahori Y, Toyama M, et al. Dectin-2-dependent NKT cell activation and serotype-specific antibody production in mice immunized with pneumococcal polysaccharide vaccine. *PLoS One*, 8(10):e78611, 2013.

5. Shimizu K, Sato Y, Shinga J et al. KLRG⁺ invariant natural killer T cells are long-lived effectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(34):12474-9, 2014.