

自然免疫活性化作用を有する新規肺炎球菌ワクチンの創出

代表研究者 湘南医療大学薬学部 教授 木村 聡一郎
共同研究者 国立感染症研究所 主任研究官 中尾 龍馬

【抄録】

肺炎は高齢者の主要な死亡原因であり、特に肺炎球菌性肺炎の頻度が高い。その肺炎の予防には、肺炎球菌ワクチンが利用されているが有効性の向上が喫緊の課題である。これまでに我々は肺炎球菌ワクチンの研究を進める中で、ワクチンのターゲットとは異なる病原体にも作用する、自然免疫記憶の誘導作用を報告してきた。特異抗原と自然免疫記憶誘導因子とを共発現させたワクチン基剤を開発することにより、ターゲットとなる感染症以外の新興感染症などにも機能するワクチンの開発が期待できる。そこで本研究では、申請者らが見出した自然免疫活性化因子のメカニズムを解析し、その自然免疫記憶誘導能の最適化を検討した。さらに肺炎球菌莢膜を安全性の高いプロバイオティック大腸菌に発現させた膜小胞を回収し、既に我々が構築している肺炎球菌保菌モデルマウスで膜小胞ワクチンの評価を行った。

1. 研究の目的

肺炎は高齢者の主要な死亡原因であり、特に肺炎球菌性肺炎の頻度が高い。このため肺炎球菌ワクチンが開発・利用されているが、ワクチンが有効となる肺炎球菌種は全体の2割に留まっており、ワクチンがターゲットとしない肺炎球菌種による感染症の増加が問題となっている。我々は肺炎予防に重要となる肺炎球菌ワクチンの研究を進める中で、既存の肺炎球菌ワクチンによる自然免疫の誘導作用を発見し、ワクチンがターゲットとしない肺炎球菌にも有効であることを報告している。また、我々の研究グループでは新規肺炎球菌ワクチンとして細菌の膜小胞が有力な基剤であることを提案し、既存ワクチンと比較して粘膜免疫を強く誘導することを見出している。

近年、ワクチンの本来のターゲットとは異なる感染症を抑制する「オフターゲット効果」が報告されている。BCG ワクチン接種率と近年パンデミックを起こした新型コ

ロナウイルス感染症での死亡率との相関性が報告されたが (Escobar et al, *PNAS*, 2020)、BCG ワクチンは自然免疫記憶誘導作用を持つことが明らかとなっており

(Arts et al, *Cell Host Microb*, 2018)、この非特異的な自然免疫の働きにより新規病原体であっても初期感染を防御できたものと考えられている。一方、我々が見出した自然免疫記憶の誘導作用は、ワクチンが対象としない菌種に対しても抗体非依存的に除菌に働く (Mimura, Kimura et al. *Microb Infect*, 2020)。また肺炎球菌ワクチンに関する大規模疫学研究から、肺炎球菌以外の呼吸器感染症に対してワクチン接種による防御効果が示されている (Huijts et al, *Clin Microbiol Infect*, 2017)。このことから自然免疫記憶を誘導・強化することにより、新興感染症を含めた様々な感染症の初期感染に機能すると考えられる。そこで、特異抗原と自然免疫記憶誘導因子とを共発現させたワクチン基剤を開発することができれば、ターゲ

ットとなる感染症以外の新興感染症などにも機能するワクチンを提案できるのではないかと考えた。これを検証するために、我々の研究グループが開発を進めているアジュバント機能を内包した膜小胞ワクチンに対して自然免疫記憶因子を導入し、発症頻度や死亡率の高い肺炎球菌性肺炎を対象にワクチンを開発することを目的に、いくつかの検討を行うこととした。

2. 研究方法と経過

2-1 自然免疫活性化メカニズムの解析

新型コロナウイルス感染症の影響から BCG ワクチンの自然免疫記憶誘導に関する研究が先行しており、エピジェネティクスを介した自然免疫記憶の誘導が臨床疫学研究からも明らかにされ、幅広く検討が進められている。そこで本研究では、ヒストンメチル化およびアセチル化を指標にエピジェネティック制御の関連性について検討した。我々が報告済みのマウスモデル（ワクチンで3回免疫後のマウスに対してインフルエンザウイルスを感染）よりセルソーターを用いて各種細胞（好中球、マクロファージ等）を収集した。これらの細胞を用いて自然免疫記憶に関わる因子を調べるために、ChIP 解析を行うこととした。その条件検討として Sonicator（Branson sonicator）を用いて細胞のフラグメンテーションの確認を行った。

2-2 自然免疫活性化作用の最適化

我々は肺炎球菌を含む様々な病原体およびマウス感染モデルを利用して感染症の発症機序に関する研究報告を行ってきた。インフルエンザ後の二次性肺炎球菌性肺炎に対する市販肺炎球菌ワクチンの効果を調べていたところ、ワクチン未接種群と比較して接種群では、ウイルス刺激のみでマクロファージが顕著に増加・活性化していることを見出し、ワクチンによる自然免疫記憶の誘導作用を報告した。自然免疫の活性化には、自然免疫活性化因子と肺炎球菌莢膜のどちらか、もしくは両者が同時に存在することが重要であ

ることが推測される。そこで、マクロファージ数の変化を指標に、自然免疫活性化因子と肺炎球菌莢膜を用いた自然免疫の誘導に関する検討を行った。特に自然免疫能の評価にはターゲット以外の病原体刺激が必要となるため、自然免疫記憶で実績のあるインフルエンザモデル（Mimura, Kimura et al. *Microb Infect*, 2020）を用いて検討を行った。

2-3 膜小胞ワクチンの評価

膜小胞は、安定的に抗原を発現させるための基剤であると同時に良好なアジュバントとしても機能する。また抗原部位を変更することにより他の感染症へ応用でき、汎用性・実用性も高い。その抗原の置換方法も確立されており実施難易度は低い。さらに同一膜小胞に対して複数の抗原等を発現させることも可能であることから、多種類の抗原・免疫誘導因子を用いることにより多価ワクチンや多機能ワクチンなどにも利用でき応用範囲は広い。本研究では、膜小胞を用いた肺炎球菌ワクチンに関して複数のマウス感染モデルで評価を行うこととした。既に構築済みの保菌マウスモデル（Nakakubo, Kimura et al. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020）を用いて、新規ワクチンの肺内・鼻咽腔内菌数（保菌量）の減少効果を評価した。

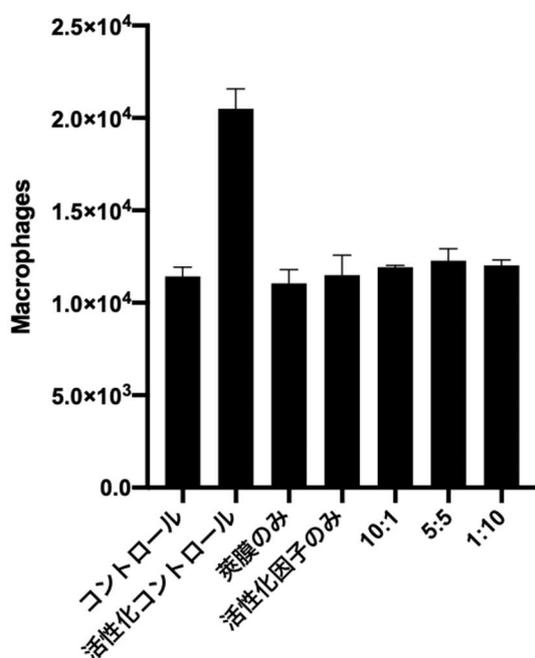
3. 研究の成果

3-1 自然免疫活性化メカニズムの解析

ヒストン修飾に対する ChIP 解析を行う際、各種条件検討（フラグメンテーション、ライブラリ作成、等）が必要となる。まず、Sonication の条件設定を行ったところ、マクロファージに対して適度なフラグメンテーションが確認できた。また限られたターゲットに対して qPCR による Enrichment も確認できた。今後、これらの諸条件を用いて ChIP、ライブラリーの作成を行う予定である。

3-2 自然免疫活性化作用の最適化

自然免疫活性化因子および肺炎球菌莢膜をそれぞれ単独でマウスに作用させたところ、マクロファージに対する自然免疫活性化作用は認められなかった。次に、両者を 10 対 1、同量 (5 対 5)、1 対 10 となるように調整し、それらをマウスに投与して検討したところ自然免疫活性化作用は認められなかった。このことから、自然免疫記憶の誘導には、自然免疫活性化因子と肺炎球菌莢膜が結合もしくは近接していることが必要であることが分かった。



3-3 膜小胞ワクチンの評価

肺炎球菌の莢膜 (14 型) を発現させた膜小胞ワクチンを構築し、マウス保菌モデルで保菌量の変化、莢膜型 14 に対する特異抗体価の推移などを調べた。まず、適切な投与経路を検討したところ、ワクチンの経皮投与と比較して経鼻投与では、鼻咽腔および血中にて IgA が多く産生されていた。この時の鼻咽腔での保菌量の変化を調べたところ、肺炎球菌数が減少し、いくつかのマウスでは検出限界以下となっていた。一方、ワクチンを経皮投

与したマウスの鼻咽腔の保菌数に変化は認められなかった。このことから、膜小胞ワクチンを経鼻投与することにより IgA の産生を促し、局所での保菌量の低下をもたらしていると推察された。

4. 今後の課題

4-1 自然免疫活性化メカニズムの解析

自然免疫記憶の誘導に関して、エピジェネティック制御を解析するためには ChIP 解析が有用であり、その解析のための諸条件を確定することができている。今後はワクチン済みマウスより回収した各種細胞を用いて、エピジェネティック制御機構を解析することが重要である。これまでの検討によりマクロファージが関与していることを見出しているため、特にマクロファージのエピジェネティック制御について注力する必要がある。

4-2 自然免疫活性化作用の最適化

自然免疫記憶の誘導には、自然免疫活性化因子と莢膜が近接していることが必要であることを見出した。今後は両因子が基剤に対して近傍にそれぞれ発現させる共発現型が良いのか、両分子が直接結合した状態で発現させる重合型が良いのかを検討する必要がある。

4-3 膜小胞ワクチンの評価

本研究では莢膜型 14 に対する膜小胞ワクチンを評価することができた。しかし、肺炎球菌の莢膜は多くの種類が存在することから、他の莢膜型を発現した膜小胞ワクチンの開発が必要となる。また、本研究では膜小胞ワクチンに対して自然免疫活性化因子の搭載を試みたが、その構築には至らなかった。本研究の目的を達成するためにも、搭載できなかった原因を追求し、自然免疫活性化能を有する膜小胞ワクチンの開発に尽力する予定である。

5. 研究成果の公表方法

本研究に関連する研究成果は、原著論文として国際雑誌に投稿予定である。

6. 参考文献

Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019. *Proc Natl Sci USA*. 117: 17720-17726, 2020

Arts RJW, Moorlag SJCFM, Novakovic B, Li Y, Wang S-Y, Oosting M, Kumar V, Xavier RJ, Wijmenga C, Joosten LAB, Reusken CBEM, Benn CS, Asby P, Koopmans MP, Stunnenberg HG, Grevel RV, Netea MG. BCG vaccination protects against experimental viral infection in humans through the induction. Of cytokines associated with trained immunity. *Cell Host Microbe*. 23: 89-100.e5, 2018

Nakakubo S, Kimura S, Mimura K, Kajiwara C, Ishii Y, Konno S, Tateda K. Traditional Japanese herbal medicine Hochu-ekki-to promotes pneumococcal colonization clearance via macrophage activation and interleukin 17A production in mice. *Front Cell Infect Microbiol*. 10: 569158, 2020

Mimura K, Kimura S, Kajiwara C, Nakakubo S, Schaller MA, Ishii Y, Standiford TJ, Kunkel SL, Tateda K: Pneumococcal conjugate vaccine modulates macrophage-mediated innate immunity in pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* following influenza. *Microb Infect*. 22: 312-321, 2020

Sawa T, Kimura S, Honda HN, Fujita K, Yoshizawa S, Harada Y, Sugiyama Y, Matsuyama K, Sohka T, Saji T, Yamaguchi K, Tateda K.: Diagnostic usefulness of ribosomal protein L7/L12 for pneumococcal pneumonia in

a mouse model. *J Clin Microbiol*. 51: 70-76, 2013

Hirayama S, Nakao R: Glycine significantly enhances bacterial membrane vesicle production: a powerful approach for isolation of LPS-reduced membrane vesicles of probiotic *Escherichia coli*. *Microb Biotechnol*. 13: 1162-1178, 2020

以上

Research of a novel pneumococcal vaccine with innate immune activation

Primary Researcher: Soichiro Kimura, Professor,
Shonan University of Medical Sciences

Co-researchers: Ryoma Nakao, Senior Research Scientist
National Institute of Infectious Diseases

Pneumonia is one of the major causes of death among the elderly, with pneumococcal pneumonia being particularly frequent. The pneumococcal vaccine is used to prevent this pneumonia, but improving its efficacy is an urgent issue. We have previously reported the induction of innate immune memory, which can act on pathogens different from the target of pneumococcal vaccine. By developing vaccine substrates co-expressing specific antigens and innate immune memory inducers, we can expect to develop vaccines that work against emerging infectious diseases other than the target infectious diseases. In this study, we analyzed the mechanism of the innate immune activation factors and investigated the optimization of their ability to induce innate immune memory. Furthermore, membrane vesicles expressing capsules of *Streptococcus pneumoniae* in probiotic *E. coli* were recovered and the membrane vesicle vaccine was evaluated in a mouse colonized by *Streptococcus pneumoniae* that we have already constructed.