



# 革新的 T 細胞製剤によるユニバーサル肺炎球菌ワクチンの開発 —新機軸の抗体誘導法による肺炎球菌肺炎のパンデミック対策—

## 1. 研究の目的

肺炎球菌は現行ワクチンでは排除できない血清型置換菌の市中増加が問題となっており、次世代ワクチンの開発が急務である。本研究はこれまでの研究成果を踏まえ、異系 T 細胞をドラッグデリバリーシステムに用いて、誘導が困難な肺炎球菌タンパク質に対する免疫応答を全身性に引き起こし、感染を予防する抗体の産生法を開発する。具体的には、マウス異系 T 細胞を介して肺炎球菌タンパク質を免疫し、抗体産生機構と免疫記憶の微小環境解析を行い、感染予防効果と治療効果を明らかにする。その上で成果を臨床応用に向けた研究につなげる。

## 2. 研究の計画

ユニバーサル肺炎球菌ワクチンを開発するにあたり、まず以下の研究を計画した。

- (1) 抗肺炎球菌抗体の誘導と性状解析：T 細胞を伝達体として PspA を免疫し、抗 PspA 抗体産生能を抗原単体投与群と比較する。
  - ① 肺炎球菌株に共通発現する PspA の核酸を人工遺伝子合成により作製し、PspA 発現プラスミドを構築する。
  - ② T 細胞を単離し、プラスミドを遺伝子導入する。
  - ③ PspA 発現 T 細胞に免疫抑制を施し、マウスに静注する。
  - ④ 血清中の抗 PspA 抗体の力価、サブタイプや活性の変化を経時的に測定する。抗原単体投与群と比較して免疫増強強化を定量的に示す。肺炎球菌株に共通発現する PspA 核酸を人工遺伝子合成で作製し、PspA 発現プラスミドを構築する。
- (2) 抗体産生細胞の組織内挙動とフェノタイプ解析：
  - ① 免疫後に経時的にリンパ臓器の組織標本作製する。
  - ② タグで標識した PspA をプローブに抗 PspA 抗体産生細胞を切片上で検出する。多重免疫染色により抗体産生に関わる細胞群、サイトカインや活性化分子、組織構築も染色する。組織 multi spectral imaging system で撮影、組織 cytometry を SpotFire で行い抗体産生に至るまでの免疫応答の推移を切片定量解析し、鍵となる免疫微小環境を見出す。

## 3. 研究の成果

抗肺炎球菌抗体の誘導と性状解析

- (1) R6株由来のPspA配列を合成し、pUC57プラスミドに挿入して発現プラスミドを作製した。マウスリンパ器官よりT細胞を精製し、ナイーブT細胞のhoming propertyを保持させたまま活性化培養した後、エレクトロポレーション法によりPspA発現プラスミドを導入した。これをレシピエントマウスに免疫後、まず体内動態を免疫組織学的に解析した。ドナーT細胞は活性化や遺伝子導入後もナイーブT細胞の遊走能を保持しており、脾臓PALSやリンパ節のHEV周囲といった抗原提示の場へ深達できることが分かった。次に同遺伝子導入ドナーT細胞を移入7日後の血清を得て抗PspA抗体の誘導を解析した。抗体の検出法として、固層化PspAを標的としたELISA法ならびにPspA発現CHO細胞を標的としたフローサイトメトリーの2つを試みたが産生される抗体量が先行研究で実施したモデルに比べて下回っていた。抗体産生細胞のin situ 解析も並行して行っているが、血清抗体価と同様、十分量の抗体産生を示唆する所見は得られていない。
- (2) (1)の結果の検証と、抗体産生細胞のin situ 解析系を先行して確立すべく、肺炎球菌とは独立したモデル系を並行して解析することにした。本プロジェクトの事前研究としてラットで実施した抗フィコエリスリン (PE) 抗体産生誘導を、(1)と同じマウス組み合わせで試みた。免疫7日目のレシピエント脾臓、リンパ節の凍結切片上にて抗PE抗体産生細胞の検出を認めたものの僅かであった。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 抗肺炎球菌抗体の誘導効率について：

マウスにおける抗肺炎球菌抗体の産生効率は予想を大きく下回っていた。これまでの研究実績により、抗原伝達体であるT細胞の免疫微小環境への遊走能は免疫応答を誘導する上で極めて大きな要因である。T細胞の遊走性は培養条件や遺伝子導入で容易に変動するため、それらを経ても遊走性を保つ条件の確立を本プロジェクトの萌芽期に見出し克服した。実際、PsPAを搭載したT細胞が適切な微小環境に至ることも確認している。それにも関わらず抗体誘導が低い理由としては、PspA発現量の問題や異物への応答性が系統によって異なることが考えられる。後者に関して、我々のラット先行研究である抗ドナーMHC抗体産生機構の解析では、抗体産生応答が起こるための1つの重要な条件として、ナチュラルキラー(NK)細胞媒介性のドナーT細胞傷害があるが、マウスではこの過程にNK細胞の関与が必ずしも必要ではないとする報告もある。実際、今回我々が解析を行った系ではNKの関与が小さいと報告されていた。ドナー、レシピエントを入れ替えた系はNK依存性であるとのことで現在、逆の系を構築して解析中である。

### (2) 抗PE抗体誘導モデル系を用いた抗体産生細胞のin situ解析について：

(1)の要因として考えられた抗原発現量の問題を克服するため、ラットで成功した異系T細胞に、表面抗原に対する抗体に蛍光タンパク質(PE)を共役させる系で検討した。本系は遺伝子導入に伴う事前の活性化や導入ストレスを与えることなく、十分量の抗原伝達が達成できるにも関わらず、こちらの系でも切片上に認められる抗PE抗体は予想していたよりも低調だった。この要因としても系統間の反応性の差が結果に大きな影響を与えていると考えられるため、マウス系統を変更した上で解析中である。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

なし

### (3) 出版物

なし