

194. NKT 細胞による肺炎球菌上気道定着の制御

中村 茂樹

Key words : 肺炎球菌, 鼻咽頭定着, NKT 細胞, 予防

*長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科
感染免疫学講座 (第二内科)

緒 言

肺炎球菌感染症の病態は、市中肺炎や細菌性髄膜炎など様々であるが、その発症には鼻咽頭への定着が必須であり、この制御こそ肺炎球菌感染症の克服の鍵となる。これまで我々は、肺炎球菌の鼻腔内クリアランスに関与する宿主因子として自然免疫、特にマクロファージの重要性について報告しているが、依然として不明な点が多い。ナチュラルキラー T 細胞 (NKT) 細胞は MHC クラス I 様タンパク質である CD1d に提示された糖脂質抗原を認識し、ウイルスや原虫、細菌に至るまで、様々な外来病原体の防御機構に関与していることが報告されている。しかし NKT 細胞が肺炎球菌の鼻咽頭クリアランスに果たす役割は不明である。今回我々は NKT KO マウスおよび肺炎球菌鼻咽頭定着マウスモデルを用いて、肺炎球菌の鼻咽頭クリアランスと NKT 細胞の関連について検討した。

方 法

使用菌株として、肺炎球菌 P1121 株 (血清型 23F ; 組織侵襲性なし), P1547 株 (血清型 6A ; 組織侵襲型) (これらの菌株はペンシルバニア大学 Prof. Weiser より提供を受けた), 使用動物として C57BL/6 マウス (雌, 6 ~ 8 週齢) および遺伝子改変マウス $J\alpha 281^{-/-}$, $NOD1^{-/-}$, $NOD2^{-/-}$, $TLR2^{-/-}$, $TLR4^{-/-}$ (いずれも C57BL/6 背景) を用いた。

1. 肺炎球菌鼻咽頭定着マウスモデル^{1,2)}

P1121 株 10^7 CFU/ 10μ l を非麻酔下に経鼻接種する。マウスを安楽死後、経時的 (菌接種 3 日後, 7 日後, 21 日後) に PBS 200 μ l で鼻腔洗浄を行い、鼻腔内定着菌数定量を行った。

2. α -GalCer による肺炎球菌鼻咽頭定着および侵襲性感染症の抑制実験

P1121 株を用いた鼻咽頭定着モデルでは、 α -GalCer (2 μ g/ 10μ l/回) を肺炎球菌接種前日より定期的 (Day-1, 3, 7, 10, 14, 17) に経鼻投与した。P1547 株を用いた侵襲性感染モデルでは、 α -GalCer (2 μ g/ 10μ l/回) を肺炎球菌接種前日より定期的 (Day-1, 2) に経鼻投与した。

3. Flow cytometry による炎症細胞数解析

マウス鼻咽頭洗浄液を FITC-Ly6G 抗体, APC-F4/80 抗体, PE-CD45 抗体, APC-CD1d 抗体で染色し BD FACS Calibur で解析した。

*現所属 : 国立感染症研究所 真菌部

結 果

NKT KO マウスは野生型マウスと比較し、肺炎球菌 P1121 株を接種 21 日後の鼻咽頭定着菌数が有意に増加した (図 1a).

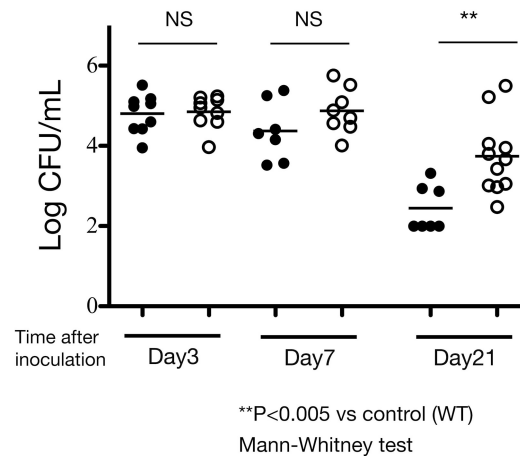


図 1a. NKT ノックアウトマウスにおける鼻咽頭定着菌数の経時的推移.

肺炎球菌の鼻咽頭定着 3 日後, 7 日後, 21 日後の鼻咽頭定着菌数. NKT KO ($J\alpha 281^{-/-}$) において 21 日後の定着菌数が有意に減少した. 黒丸: 野生型マウス, 白丸: $J\alpha 281^{-/-}$ マウス.

鼻腔洗浄液中の好中球やマクロファージ数は野生型および NKT KO マウスで観察期間中の有意差は認められなかった (図 1b).

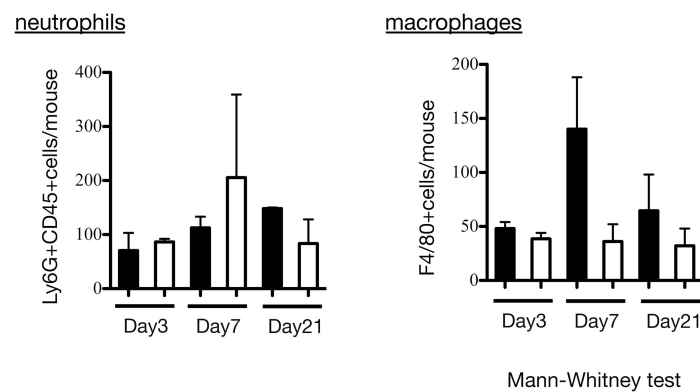


図 1b. NKT ノックアウトマウスにおける鼻咽頭定着菌数の経時的推移.
鼻腔洗浄液中の炎症細胞数.

また野生型マウスの鼻腔内に NKT 細胞の特異的リガンドである α -Galactosylceramide (α -GalCer) を投与した結果, α -GalCer 投与群において, P1121 株接種 21 日後の鼻咽頭定着菌数が有意に減少した (図 2).

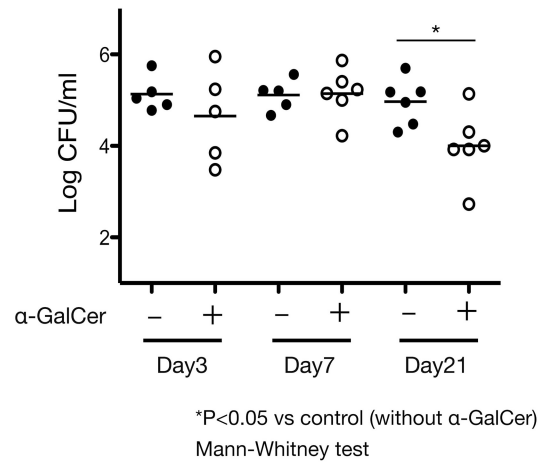


図 2. α -GalCer 投与による鼻咽頭定着菌数の変化.

肺炎球菌接種前日より定期的 (Day-1, 3, 7, 10, 14, 17) に経鼻投与し, 定着 3 日後, 7 日後, 21 日後の鼻咽頭定着菌数を測定. α -GalCer 投与群において 21 日後の定着菌数が有意に減少した. 黒丸: コントロール群 (α -GalCer 非投与群), 白丸: α -GalCer 投与群.

さらに侵襲性感染症を引き起こす P1547 株を用いて, 同様に α -GalCer を投与すると野生型マウスで認められた生存率改善効果が NKT KO マウスでは消失した (図 3a).

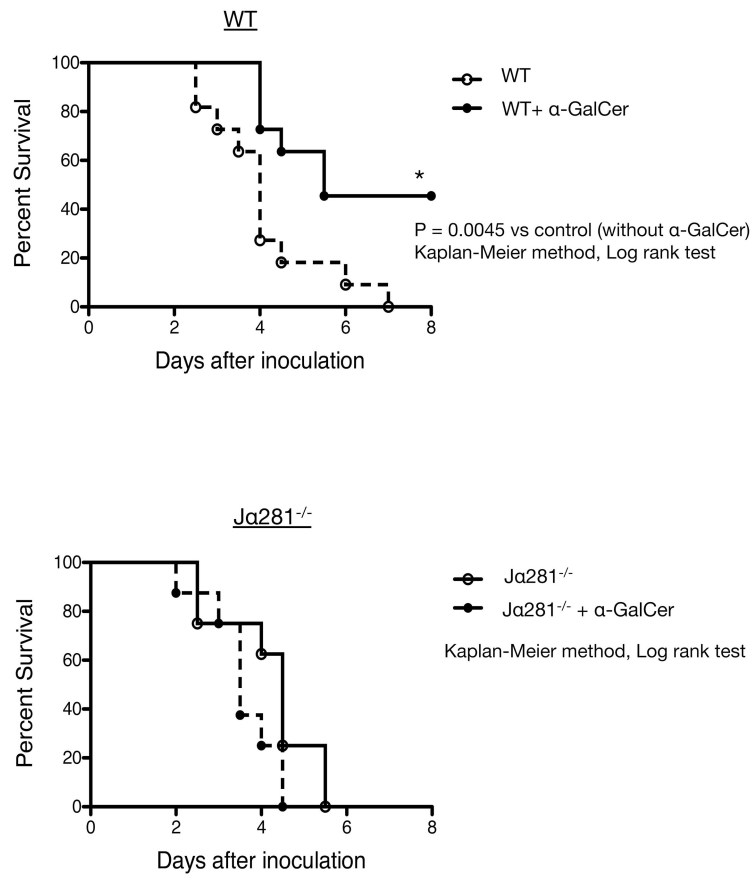


図 3a. α -GalCer 投与による感染症予防効果.

α -GalCer を肺炎球菌接種前日より定期的 (Day-1, 2) に経鼻投与. 肺炎球菌は侵襲性感染症を引き起こす P1547 株を使用. 野生型マウスでは α -GalCer 投与によってマウスの生存率が向上したが, NKT KO (J α 281^{-/-}) ではその効果は消失した.

血中生菌数は α -GalCer 投与群において有意な減少効果が認められたが, NKT KO マウスでは消失した (図 3b).

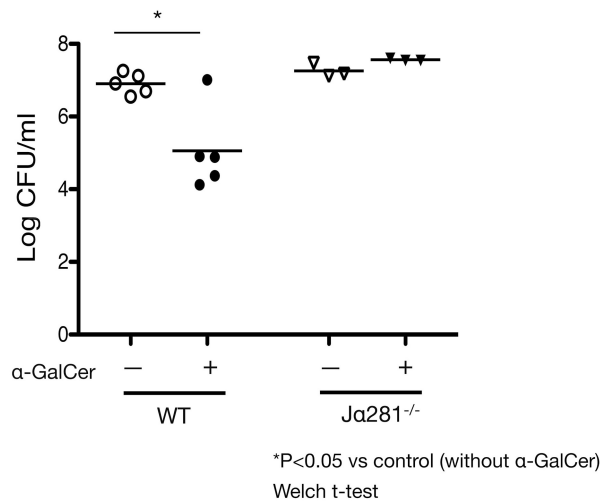


図 3b. α -GalCer 投与による感染症予防効果.

野生型マウスでは α -GalCer 投与によって血中生菌数が減少したが, NKT KO (J α 281^{-/-}) ではその効果は消失した. 黒丸: コントロール群 (α -GalCer 非投与群), 白丸: α -GalCer 投与群.

α -GalCer 投与群では非投与群より鼻咽頭への NKT 細胞の増加傾向が認められ (図 4), NOD2^{-/-}および TLR2^{-/-}マウスでは NKT 細胞の鼻咽頭への集積が抑制される傾向であった (data not shown).

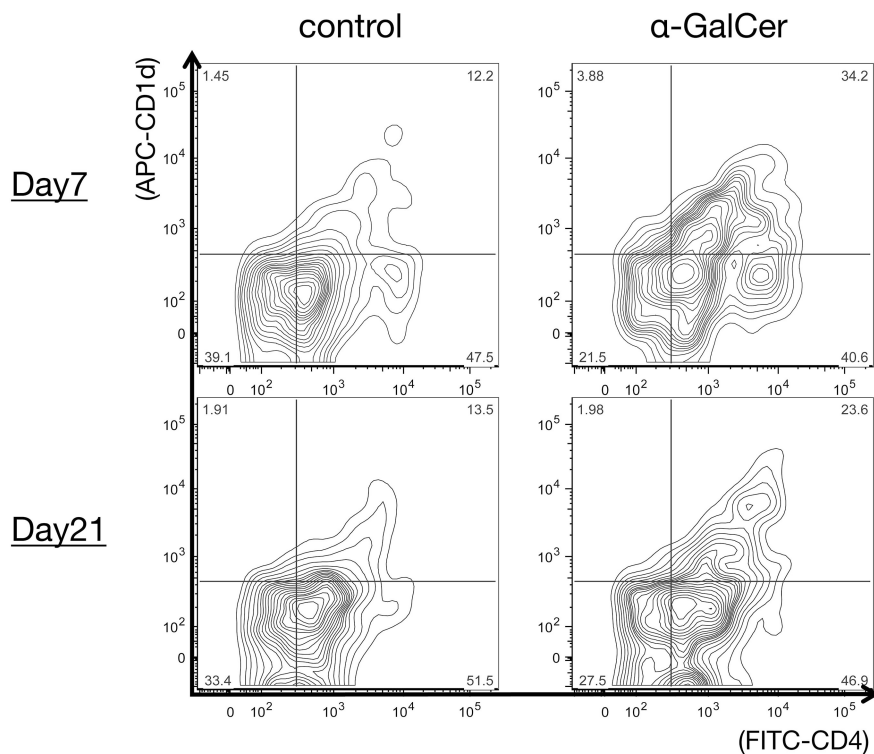


図 4. α -GalCer 投与と鼻腔内 NKT 細胞数の推移.

肺炎球菌接種前日より定期的 (Day-1, 3, 7, 10, 14, 17) に経鼻投与し, 定着 3 日後, 7 日後, 21 日後の鼻咽頭内 NKT 細胞数を Flow cytometry で測定.

考 察

本研究は肺炎球菌の鼻咽頭定着のメカニズムを明らかにするために、鼻咽頭定着モデルと肺炎球菌のパターン認識受容体を欠損させた種々の遺伝子改変マウスを用いて検討した。現在までの研究成果として、主に以下の点が挙げられる。(1) NKT KO マウスでは肺炎球菌の晩期鼻咽頭クリアランスが低下した。(2) α -GalCer による NKT 細胞の活性化によって鼻咽頭クリアランスの向上および侵襲性感染症マウスの予後改善効果が認められた。(3) α -GalCer によって鼻咽頭への NKT 細胞の集積が亢進した。(4) NKT 細胞の鼻咽頭集積には、TLR2 や NOD2 など α -GalCer を介さない別の pathway が存在する可能性がある。

今後の研究によって、鼻咽頭に集積する NKT 細胞の肺炎球菌クリアランスにおける役割について明確に証明し、NKT 細胞活性化ワクチンの開発など新しい感染症予防法の確立を目指す。

共同研究者

本研究の共同研究者は、国立感染症研究所真菌部の金城雄樹先生、長崎大学病院第二内科の岩永直樹先生である。

文 献

- 1) Davis, K. M., Nakamura, S. & Weiser, J. N. : Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.*, **121** : 3666-3676, 2011.
- 2) Nakamura, S., Davis, K. M. & Weiser, J. N. : Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.*, **121** : 3657-3665, 2011.