

Induction of protective immunity against an intracellular bacterium using dendritic cells retrovirally transduced with a minigene encoding a CTL epitope

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中村, 祐太郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1230

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 377号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏 名	中 村 祐太郎		
論文題目	Induction of protective immunity against an intracellular bacterium using dendritic cells retrovirally transduced with a minigene encoding a CTL epitope (CTL エピトープ遺伝子導入樹状細胞を用いた細胞内寄生菌に対する感染防御能の誘導に関する研究)		

博士(医学) 中 村 祐太郎

論文題目

Induction of protective immunity against an intracellular bacterium using dendritic cells retrovirally transduced with a minigene encoding a CTL epitope

(CTL エピトープ遺伝子導入樹状細胞を用いた細胞内寄生菌に対する感染防御能の誘導に関する研究)

論文の内容の要旨

〔目的〕

結核菌を含む細胞内寄生菌による感染症は増加しており、感染症対策においてその重要性が再認識されつつある。これらの感染症の防御には細胞性免疫が必須であるが、現在までのところ細胞性免疫を誘導するワクチンは、BCG などの生菌ワクチンに限られている。しかし生菌ワクチンは安全性の面から多くの問題点が指摘されており、細胞内寄生菌感染症に対するより安全で優れたワクチンの開発が切望されている。一方、樹状細胞(dendritic cells, DC)は生体で最も強い抗原提示細胞であり、in vivo および in vitro において抗原特異的な細胞性免疫を強力に誘導することが知られている。したがって DC を利用した細胞ワクチンは、細胞内寄生菌に対する次世代のワクチンとして有望と考えられる。今回我々は、組み換えレトロウイルスを用いて遺伝子導入した DC を用いて、細胞内寄生菌であるリステリア(*Listeria monocytogenes*: Lm)に対する感染防御能の誘導を試み、ワクチンとしての有用性を検討した。さらに現在同様に細胞内寄生菌に対し開発の進んでいる DNA ワクチンとの比較検討も行った。

〔方法〕

- 1) DC の培養: BALB/c マウス(H-2^d)の骨髄細胞を、B 細胞、CD4、CD8、MHC class II に対するモノクローナル抗体で処理した後、補体を添加しこれらの抗原を発現する細胞を除去し、その後 GM-CSF と IL-4 を添加した培地で培養した。
- 2) 組み換えレトロウイルスの作製: Lm の主要なエピトープである listeriolysin O (LLO) 91-99 の遺伝子とレポーター遺伝子である green fluorescent protein (GFP) 遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクター(pMX-LLO91-IRES2-EGFP)を作成し、packaging cell である Phoenix cell に transfection してウイルス上清を回収した。
- 3) レトロウイルスの感染、遺伝子導入: DC には、培養 3 日目より 3 日間連続でウイルス上清を spin infection によって感染させ、遺伝子導入を行った。7 日目に浮遊細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて表面抗原の解析および遺伝子の導入効率を確認した。
- 4) cytotoxic T cell (CTL) の誘導および感染防御能の検討: 遺伝子導入した DC をマウスに尾静脈から接種し、4 週後に脾細胞を採取して、LLO91-99 に対する特異的 CTL の誘導を ⁵¹Cr 遊離試験法を用いた CTL assay で検討した。さらに、Lm に対する感染防御能を、生菌接種 3 日後の脾内の菌量で評価した。
- 5) DNA ワクチンとの比較: 上記と同様の LLO91-99 の遺伝子を組み込んだベクター(pCI-LLO91)を作製し、金粒子でコートし遺伝子銃(Helios gene gun system)を用いてマウス腹部に皮下注射し、同様に CTL の誘導及び感染防御能の検討を行った。

〔結果〕

- 1) DC への遺伝子の導入を GFP の発現率を用いて検討したところ、導入効率は30%前後と高率であった。また、遺伝子導入に用いた DC は、MHC class II、B7-1、B7-2、CD40などを強く発現しており、遺伝子導入によってもこれらの表面抗原の発現は影響を受けなかった。
- 2) LLO91-99の遺伝子を導入した DC で免疫したマウスの脾細胞は、CTL assay において80%程度の specific cell lysis (Effector/Target 細胞比100:1)を示し、強力なペプチド特異的な CTL 活性が認められた。
- 3) 生菌感染後の免疫マウスの脾内菌数は、非免疫マウスに比し著明に減少していた(免疫マウス vs. 非免疫マウス = 3.6×10^6 CFU vs. 4.0×10^3 CFU; $p=0.0013$)。
- 4) 遺伝子導入した DC で免疫したマウスの脾細胞は、遺伝子銃による DNA ワクチンで免疫したマウスの脾細胞に比し強力なペプチド特異的な CTL を誘導した。生菌感染後の脾内菌数においても、遺伝子導入 DC 免疫群で有意に減少していた(DNA ワクチン vs. DC ワクチン = 1.2×10^5 CFU vs. 7.0×10^3 CFU; $p=0.019$)。

〔結論〕

組み換えレトロウイルスを用いて、リステリア由来の単一エピトープ LLO91-99を遺伝子導入したマウス骨髄由来 DC の接種は、効率よく LLO91-99特異的 CTL を誘導した。更にリステリア感染症に対し DNA ワクチンに比しても強力な感染防御能を賦与することが明らかとなり、細胞ワクチンとして有用である可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

樹状細胞(DC)は強力な抗原提示細胞で、感染免疫、癌免疫などにおいて細胞傷害性 T 細胞(cytotoxic T lymphocyte; CTL)を誘導し、生体を防御する。CD8陽性 T 細胞は DC 上のクラス I 抗原に結合した抗原エピトープを認識し、機能的 CTL に分化する。*Listeria monocytogenes* は細胞内寄生グラム陽性細菌で、防御免疫はおもに CTL に依存する。ヒトに対する病原性は低い、免疫不全患者、妊産婦、乳児ではときに肝炎、肺炎、髄膜炎などの重篤な感染症をひきおこす。*L.monocytogenes* は人畜共通の細菌であることからマウス感染モデルが確立しており、感染免疫における CTL 機能の研究に広く用いられている。CTL を誘導する本菌由来抗原にもいくつかの抗原エピトープが存在し、免疫原性の強いエピトープから弱いものまである。

DC は感染免疫、癌免疫におけるワクチン効果発現細胞として治療目的に使用される可能性が指摘されている。しかし、どのような方法で DC に抗原ペプチドを発現させれば効率よく CTL を誘導できるかについては、未解決な部分が多い。

申請者らは *L.monocytogenes* 感染マウスモデルにおいて、菌体由来抗原エピトープであるリステリオリシン O(LLO)91-99遺伝子を導入した DC による感染防御能の誘導を試みた。遺伝子導入された DC は細胞表面にクラス I 結合 LLO91-99由来ペプチドを発現し、CTL を誘導することが予想される。また、DC ワクチンと LLO91-99遺伝子を用いた DNA ワクチンとの感染防御誘導能を比較した。DNA ワクチンは皮膚内に発現プラスミドを導入する方法で、皮膚の抗原提示細胞を利用して CTL を誘導した。

用いられた材料と方法は適切であった。DC はマウス骨髄細胞を GM-CSF、IL-4とともに培養することによって得た。この方法は in vitro で DC を誘導する標準的かつ確立された方法である。DC への遺伝子

導入は組み換えレトロウイルスを用いた。導入効率は極めて高く、導入 DC は T 細胞共刺激分子を強く発現していた。DC をマウス尾静脈より注入してワクチンとした。コントロールマウスでは遺伝子導入されていない DC でワクチンを行った。DNA ワクチンは LLO91-99 を組み込んだ発現プラスミドを gene gun で皮膚に打ち込んだ。CTL 活性は細胞傷害試験と ELISA 法を用いたインターフェロン- γ 産生でみた。ワクチン後マウスを *L.monocytogenes* で感染させ、脾臓の菌数を算定することにより感染防御能を求めた。

得られた結果は以下のごとくであった。LLO91-99 遺伝子導入 DC でワクチンされたマウスではコントロールマウスと比較して、(1) *in vitro* ペプチド刺激後のインターフェロン- γ 産生細胞が脾で増加して高かった。さらに、本実験でもちいた DC ワクチン法は DNA ワクチンと比べても遜色のないワクチン効果を発揮した。

これらの実験結果により、*L.monocytogenes* 由来抗原エпитープを導入された DC を用いたワクチンは感染防御免疫の成立に有効で、さらに単一のエпитープによるワクチンで十分に感染を予防できることが示された。

本研究の優れた点は *L.monocytogenes* 感染マウスモデルをもちいて、CTL を中心とする感染防御のメカニズム、とくにどのようなワクチン方法が効率良く防御能を誘導できるのかという点を明らかにしたことにある。とくに、単一エピトープ DNA を誘導された DC でワクチンを行うというユニークな着眼点が高く評価された。

以上の申請者の研究内容について、審査委員会では以下のような質問、および議論をおこなった。

- 1) DC サブセットと抗原提示能の違い
- 2) 骨髄由来 DC を用いた理由の DC の運命
- 3) DC ワクチンにより誘導される CTL の V β 発現
- 4) サイトカインを併用する DC ワクチン法
- 5) 異なる系統のマウス間でのワクチン効率
- 6) 非特異的免疫の DC ワクチンにおける特異的免疫の果たす役割
- 7) DC ワクチンの主な副作用

これらの質問に対し、申請者の解答は適切であり、問題点も十分に理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	瀧	川	雅	浩
	副査	山	下	昭	副査 大 西 一 功