Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中野, 秀樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/278

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　４４８号	学位授与年月日	平成１８年　２月１５日
氏　　名	中　野　秀　樹		
論文題目	Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A (抗酸菌の antigen 85A 遺伝子をレトロウイルスで導入した樹状細胞による免疫は antigen 85A のエピトープへの特異的細胞傷害性 T 細胞活性を含む特異的細胞性免疫を誘導する)		

博士(医学)　中　野　秀　樹

論 文 題 目

Immunization with dendritic cells retrovirally transduced with mycobacterial antigen 85A gene elicits the specific cellular immunity including cytotoxic T-lymphocyte activity specific to an epitope on antigen 85A
(抗酸菌のantigen 85A遺伝子をレトロウイルスで導入した樹状細胞による免疫はantigen 85Aのエピトープへの特異的細胞傷害性T細胞活性を含む特異的細胞性免疫を誘導する)

論　文　の　内　容　の　要　旨

〔はじめに〕

結核は、世界で毎年800万人の新規患者が発生し、200万人の死者がでる深刻な問題である。しかし、現在、結核に対するワクチンはbacillus Calmette-Guérin(BCG)しかなく、効果も限定的である。結核菌のような細胞内寄生菌の感染防御には細胞性免疫が重要である。この点で樹状細胞による免疫は、効果的に細胞性免疫を誘導することができるので感染防御に重要であると考えられる。我々は既に、リステリアのCD8陽性T細胞エピトープを用いた樹状細胞ワクチンによる特異的細胞性免疫の誘導に成功した。そこで今回、結核菌の分泌蛋白であるantigen 85A(Ag85A)の遺伝子をレトロウイルスで導入した樹状細胞でマウスを免疫し、その免疫能を検討した。

〔材料ならびに方法〕

BALB/cマウスの骨髄より採取した樹状細胞にレトロウイルスを用いて抗酸菌のAg85A遺伝子を導入した。その樹状細胞を静脈注射し、BALB/cマウスを免疫した。免疫８週間後、血清を採取し、血清中のツベルクリン精製液(PPD)に対する抗体をELISA法にて検討した。また、脾臓細胞を取り出し、PPDに対するリンパ球増殖反応試験やIFN-γ産生能の検討及び細胞傷害性T細胞試験を行った。同時にCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞に分離してIFN-γ産生能も検討した。また、免疫マウスに結核菌を経静脈的に感染させ、４週間後の肺、肝臓における結核菌数と体重を測定し、防御免疫も検討した。

〔結果〕

Ag85A遺伝子導入樹状細胞をRT-PCRにかけ、遺伝子が樹状細胞に導入されていることを確認した。Ag85A遺伝子導入樹状細胞免疫マウス血清中のPPD特異抗体をELISA法にて検出できた。また、リンパ球増殖反応試験ではコントロールマウスに比べ、Ag85A遺伝子導入樹状細胞免疫マウスとBCG免疫マウスの両方でPPD添加にて有意にリンパ球の増殖が認められた。IFN-γ産生能もAg85A遺伝子導入樹状細胞免疫マウスとBCG免疫マウスより採取したリンパ球の方がPPD添加にて有意にIFN-γを多く産生した。一方、コントロールマウスではPPD添加にてIFN-γの産生増加は見られなかった。CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞に分離しておこなったIFN-γ産生能の検討では、Ag85A遺伝子導入樹状細胞免疫マウスでは、いずれのサブセットのリンパ球もPPD添加にてIFN-γの産生が増加した。細胞傷害性T細胞試験でAg85A遺伝子導入樹状細胞免疫マウスのリンパ球は、Ag85A抗原のCD8陽性T細胞エピトープを添加した標的細胞に対し、特異的殺細胞効果が認められた。結核菌感染に対する防御免疫の検討では、コントロールマウスに比べ、Ag85A遺伝子導入樹状細胞免疫マウスでは、肺、肝臓のいずれにおいても、結核菌量は有意に減少しており、結核による体重の減少も防ぐことができた。

〔考察〕

樹状細胞は、最も強力な抗原提示細胞であり、樹状細胞ワクチンは癌のみならず感染に対しても有効である。樹状細胞ワクチンの方法としては、蛋白抗原やペプチドを取込ませたり、抗原をコードする遺伝子を導入する等いくつかの方法がある。レトロウイルスを用いて樹状細胞に遺伝子導入する方法は、生体内で長期に抗原提示できる優位性がある。以前の我々の実験では、リステリアの細胞傷害性T細胞エピトープをレトロウイルスで導入した樹状細胞ワクチンはリステリアに対する感染防御免疫を効率よく誘導した。本実験では、Ag85A遺伝子を導入した樹状細胞ワクチンが結核特異的液性免疫および細胞性免疫を誘導することを証明した。Ag85A遺伝子を導入した樹状細胞は直接特異的細胞傷害性T細胞に抗原提示を行い感作するのみならず、分泌されたAg85A蛋白を樹状細胞が取込み、ヘルパーT細胞にも抗原提示を行い、抗体産生が誘導されたと考えられる。また、我々は細胞傷害性T細胞の実験の過程でAg85A抗原のH2-K^{d}に拘束性の免疫優位性エピトープを同定することができた。結核菌の感染防御実験では、結核菌数に関しては中等度の減少を示すのみであったが、結核菌による消耗性疾患（体重減少）は完全に阻止できた。このことは、このワクチンにより肉芽腫が誘導され結核菌を封じ込めた可能性を示唆するかも知れない。今後、樹状細胞の試験管内成熟化、投与細胞数、投与法等、より有効な条件設定を行うことにより結核菌数をも顕著に減少させるワクチンを開発する必要がある。

〔結論〕

レトロウイルス遺伝子導入による樹状細胞ワクチンは結核菌抗原に特異的な細胞傷害性T細胞と抗体を誘導できた。また、結核菌感染防御では菌数においては中等度の、体重においては完全な防御が誘導された。

論文審査の結果の要旨

結核は、エイズ、マラリアなどとともに今でも世界的に感染者、死亡者の多い深刻な感染症である。結核に対するワクチンとしてbacillus Calmette-Guerin（BCG）しかなく、その効果は充分ではない。結核菌のように細胞内寄生菌は細胞性免疫の誘導が重要である。樹状細胞は最も効果的な抗原提示細胞であることが知られている。今回、申請者は結核菌の主要な分泌蛋白であるAg85Aをコードする遺伝子をレトロウイルスベクターで樹状細胞に導入し、マウスに免疫して結核菌に対する免疫能を検討した。

BALB/cマウスの骨髄より採取した樹状細胞にレトロウイルスベクターでAg85A遺伝子を導入し、その樹状細胞を静注してBALB/cマウスを免疫した。免疫後 8 週目に、ツベルクリン精製液（PPD）に対する抗体価をELISA法で、脾細胞のPPDに対するリンパ球増殖反応試験、インターフェロンγ（IFNγ）産生能、細胞傷害性T細胞試験を行った。さらに免疫マウスに結核菌を経静脈的に感染させ、 4 週後の肺、肝臓に於ける結核菌数および体重に与える影響を検討した。

申請者は、はじめに導入した樹状細胞がAg85A遺伝子を発現しているかRT-PCRで確認した。Ag85A遺伝子導入樹状細胞免疫マウス（Ag85A導入マウス）はPPDに対する抗体産生およびPPDに対するリンパ球増殖が対照群と比較して有意に増加することを認めた。リンパ球のIFNγ産生能もAg85A導入マウスおよびBCG免疫マウスにおいて有意に高く、PPD添加刺激すると、Ag85A導入マウスではCD4およびCD8陽性Tリンパ球ともにIFNγを産生した。細胞傷害性T細胞試験でAg85A導入マウスではAg85A抗原のCD8陽性T細胞エピトープ添加標的細胞に対して特異的殺細胞効果を認めた。特にVYAGAMSGLペプチドが脾細胞

におけるIFNγ産生に効果的であることを認めた。

結核菌の感染実験においては、感染後4週間で肺および脾臓において、Ag85A導入マウスで結核菌量が対照マウスと比較して有意に低下したが、BCG免疫マウスの結核菌増殖抑制効果には及ばなかった。しかし、感染による体重減少については、Ag85A導入マウスにおいてBCG免疫マウスと同様に抑制することが出来た。

これらの結果から、Ag85A遺伝子導入樹状細胞で免疫したマウスは結核菌抗原特異的な細胞傷害性T細胞と抗体を誘導できることが明らかとなった。結核菌の感染においては、菌量の抑制効果は充分ではないが、体重減少を防ぐことが出来ることが分かった。

審査委員会では、申請者が結核菌遺伝子導入樹状細胞によるワクチンによって結核菌に対する液性および細胞性免疫が誘導し得ることを、精緻な免疫学的方法で示し、感染に対しても効果的であることを示した点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

1）結核菌のAg85A遺伝子を選んだ理由
2）樹状細胞の特徴と分離の方法について
3）他のウイルスベクターと比較してレトロウイルスベクターの特徴
4）免疫用樹状細胞の投与方法の検討について
5）樹状細胞の分化とワクチンとしての有効性について
6）投与した樹状細胞の分布と寿命について
7）Ag85AとBCGは抗体が交叉しないのはなぜか
8）CTL assayの原理について
9）Ag85A樹状細胞で免疫したマウスは結核菌の増殖抑制は弱いのに体重減少が起こらないのはなぜか
10）樹状細胞を用いたワクチンの人への実際の応用方法

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、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　筒　井　祥　博
副査　宮　本　　愛　副査　大　西　一　功