

Immunization with dendritic cells loaded with α -galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T-lymphocyte activity against infection by intracellular bacteria.

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: 榎本, 紀之 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/387

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	医博論第 448号	学位授与年月日	平成19年10月19日
氏名	榎本紀之		
論文題目	<p>Immunization with dendritic cells loaded with α-galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T-lymphocyte activity against infection by intracellular bacteria. (αガラクトシルセラミド添加樹状細胞による初回免疫は、細胞内寄生菌感染症に対する細胞障害性 T リンパ球活性を増強する)</p>		

博士(医学) 榎本紀之

論文題目

Immunization with dendritic cells loaded with α -galactosylceramide at priming phase, but not at boosting phase, enhances cytotoxic T-lymphocyte activity against infection by intracellular bacteria.

(α ガラクトシルセラミド添加樹状細胞による初回免疫は、細胞内寄生菌感染症に対する細胞障害性Tリンパ球活性を増強する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

樹状細胞 (DC) は生体における最も強力な抗原提示細胞であり、DCに抗原を添加したワクチンはその効果が強力であることが知られている。近年、特に細胞内寄生病原体感染症や癌免疫療法におけるDCワクチンの研究が進められている。一方、海綿由来の α ガラクトシルセラミド (α GalCer) はNatural killer T (NKT) 細胞を特異的に活性化し、引き続き誘導されるDCの成熟効果が知られており、癌免疫療法での有用性が示唆されている。しかし、細胞内寄生病原体感染症に対するワクチン開発において α GalCerを用いた報告はわずかである。そこで我々は、リステリアの抗原決定基と共に α GalCerをDCに添加することにより、さらに強力なDCワクチンの開発を試みた。

[材料ならびに方法]

*Listeria monocytogenes*の細胞障害性T細胞 (CTL) エピトープであるリステリオリジンO (LLO) 91-99を添加したBALB/cマウス骨髄由来DCを α GalCerで処理し、BALB/cマウスへ経静脈的に免疫した。2週間をあけて2回の免疫 (初回免疫, 追加免疫) を行い、 α GalCerおよびLLO添加群と非添加群 (計5群) において以下の項目を検討した。(1) MHCクラスIテトラマーによるCTLの定量、(2) 脾細胞におけるLLO特異的インターフェロン- γ (IFN- γ) 産生、(3) CTLアッセイによる細胞障害機能の評価、(4) 感染防御能、(5) メモリーCTLマーカー分子の発現率、(6) 血清サイトカインの定量。

[結果]

初回免疫時のみに α GalCerを添加した群において、高いCTL誘導能、CTL活性、感染防御能が認められた。また同群において、メモリーT細胞マーカーの高い発現率が確認された。一方、初回免疫および追加免疫ともに α GalCerを添加した群では高いIFN- γ 産生がみられたが、感染防御能とセントラルメモリーT細胞のマーカーであるCD62Lの発現の低下が確認された。この低下は追加免疫時におけるIFN- γ 中和抗体の前投与により改善した。

[考察]

初回免疫における α GalCerの添加は、NKT細胞を活性化し、さらに生体において抗原提示したDCを成熟化することによって抗原特異的CTLを強く誘導しワクチン効果を増強したと考えられる。一方、初回免疫および追加免疫ともに α GalCerを添加した群では、追加免疫時の大量のIFN- γ 産生がセントラルメモリーCTLを減少させ、ワクチン効果を減弱させたと考えられる。 α GalCerは特に癌免疫療法において生体に繰り返し投与されているが、このような α GalCer連続投与および大量のIFN- γ 産生による免疫抑制効果

は報告されていない。そのため、本研究は適切な α GalCer投与方法を示唆する有用な結果であると思われる。

[結論]

初回免疫時のみ α GalCer処理したCTLエピトープ添加樹状細胞ワクチンの投与により、強力な特異的CTLの誘導が可能である。

論文審査の結果の要旨

さまざまな感染症が世界的な広がりをみせているなか、感染症予防における有効なワクチン開発には多くの関心がよせられている。微生物の細胞内寄生菌感染症には細胞質内寄生、食胞内寄生、リゾソーム内寄生などの形態があり、それに対応して、感染防御機構においてもさまざまな細胞が関与している。*Listeria monocytogenes*(リステリア)は代表的な細胞内寄生菌であり、人畜共通の感染源となる。健常人に対する病原性は弱い、免疫力の低下した個体、老人、乳児などではときに髄膜炎、敗血症など重篤な症状を引き起こす。また、妊婦では流産の原因となることもある。マウスではリステリア感染モデルが確立されており、細胞障害性T細胞(CTL)を誘導するクラスIエピトープ、ヘルパーT細胞(Th)を誘導するクラスIIエピトープが十分に解析されている。CTL誘導エピトープであるLysteriolysin O (LLO) 91-99には強い感染防御効果がある。一方、natural killer T (NKT) 細胞を特異的に活性化する α ガラクトシルセラミド(α GalCer)は樹状細胞(DC)も成熟させる。申請者は、新たなワクチン開発のためのコンセプトをうち立てるべく、リステリア感染症のマウスモデルを用いて、新しいコンセプトに基づく感染防御DCワクチンの開発を試みた。

用いられた動物、材料ならびに方法は適切であった。特記すべき点は、ワクチン素材としてリステリア抗原ペプチドLLO 91-99およびアジュバントとしての α GalCerでパルスしたDCを用いたこと、感染防御能を脾臓中の細菌コロニー形成で判定したこと、CTL機能を*in vivo*アッセイで検討したこと、ワクチン効果の重要な指標となるCD62L陽性メモリーCTLを定量したことである。

得られた結果は以下の通りである。

- (1) 初回LLO91-99ワクチン時のみに α GalCerを添加した群では、CTL誘導が強くみられ、CTL活性も高く、結果として強力な感染防御能がみられた。また、メモリーT細胞が強く誘導されていた。
- (2) 初回、追加LLO 91-99ワクチンともに α GalCerを添加した群では上記1群と比べ、脾細胞がより大量のインターフェロン(IFN)- γ を産生し、かつセントラルメモリー細胞の誘導が低かった。この低下はIFN- γ 中和抗体の前投与により改善した。

これらの結果から、ワクチン素材に α GalCerを添加することにより、DCワクチンの効果を増強できる可能性が示唆された。またCTLを誘導するIFN- γ 量をコントロールすることがワクチン効果の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。従来の研究で感染症予防はCTL機能に左右されることが明らかになっていたが、本研究は α GalCerによりその機能が増強されることを示し、新しい感染症ワクチン開発の可能性を示唆した。

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) リステリア感染様式と感染防御について

- 2) ワクチン素材の多様性について
- 3) トレランスと免疫について
- 4) レトロウイルスベクターによるDCワクチンの安全性について
- 5) α GalCerの精製法について
- 6) NKT細胞のサブセットと機能、特にヒトとマウスでの違いについて
- 7) 活性化NKT細胞がTh1,Th2を誘導するメカニズムについて
- 8) Colony forming unitを用いた感染防御能測定について
- 9) *In vivo* CTLアッセイを行った理由について
- 10) ペプチド特異的メモリーT細胞の誘導と検知法について

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 大 西 一 功 副査 小 川 法 良