

Induction of specific immunity against mycobacteria by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 family molecules

著者	三鬼 慶太
雑誌名	浜松医科大学学報. 学位授与記録
巻	19
ページ	119-121
発行年	2002-03-26
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1237">http://hdl.handle.net/10271/1237</a>

doi: 10.1128/IAI.72.4.2014-2021.2004

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 384号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	三鬼慶太		
論文題目	<p>Induction of specific immunity against mycobacteria by recombinant attenuated self-destructing <i>Listeria monocytogenes</i> strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 family molecules          (Ag85 ファミリー分子発現プラスミドを保持する弱毒化自殺 <i>Listeria monocytogenes</i> 免疫による抗マイコバクテリア特異的免疫の誘導)</p>		

博士(医学) 三 鬼 慶 太

## 論文題目

Induction of specific immunity against mycobacteria by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for Ag85 family molecules

(Ag85ファミリー分子発現プラスミドを保持する弱毒化自殺 *Listeria monocytogenes* 免疫による抗マイコバクテリア特異的免疫の誘導)

## 論文の内容の要旨

### 〔目的〕

近年結核は再興感染症として注目を浴びているがその背景には、1)集団発生事例の増加、2)結核患者の高齢化、3)多剤耐性菌の出現、4)AIDSの合併症としての問題などがある。また発展途上国のみならず、本邦においても増加の傾向を示している。結核菌に対するワクチンとしてはBCGワクチンが広く用いられているがその有効性には疑問の余地があり、より有効なワクチンの確立が急務とされている。次期ワクチンとして現在盛んにDNAワクチンの研究が行われているがプラスミドDNAそのものを生体に免疫する従来の方法、1)筋注法では苦痛をとまなう上、感作の再現性に問題がある、2)遺伝子銃法では特別な装置が必要である、等の問題点がある。本研究では細胞内寄生菌である弱毒リステリアをキャリアとしたより簡便で有効なDNAワクチンの開発を試みた。

### 〔材料ならびに方法〕

1. プラスミド p3L118 を一部組換え修正した p3L118R のサイトメガロウイルスプロモーター下流に結核菌と BCG に共通する主要分泌タンパクである Ag85ファミリー分子、Ag85A、Ag85B、及び MPB51 分子をコードする遺伝子を組み込み、DNA ワクチン用プラスミド p3L118R-Ag85A、p3L118R-Ag85B、及び p3LL118R-MPB51 を作製し実験に供した。
2. 上記プラスミドを弱毒リステリア株 Δ2 にエレクトロポレーション法にて導入した。
3. これら組換えリステリアを、マクロファージ細胞株である J774 細胞に感染させ、Ag85A、Ag85B、及び MPB51 遺伝子の発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検討した。
4. これら組換えリステリア  $1 \times 10^7$  CFU を、2ヶ月齢の雌マウスに2週間隔で2回腹腔免疫した。
5. 抗結核菌細胞性免疫の誘導を、以下の方法で評価した。
  - 1) 抗原特異的遅延型過敏反応：免疫マウスの右足蹠に  $5 \mu\text{g}$  の精製ツベルクリン (PPD) 及び、対照として左足蹠に PBS を注射し48時間後の腫脹を計測した。
  - 2) 抗原特異的リンパ球増殖反応：免疫マウス脾細胞を  $5 \mu\text{g/ml}$  の PPD を用いて2日間 in vitro 刺激後、 $^3\text{H}$ チミジンの取り込みを計測することにより抗原特異的リンパ球増殖反応を検討した。
  - 3) 抗原特異的サイトカイン産生：免疫マウス脾細胞を  $5 \mu\text{g/ml}$  の PPD を用いて4日間 in vitro 刺激後、サンドウィッチ ELISA 法により、免疫マウス脾細胞培養上清中の  $\text{IFN}\gamma$ 、IL-2、IL-4、IL-5 の産生を検討した。

## 〔結果〕

1. RT-PCR により、p3L118R-Ag85A、p3L118R-Ag85B、及び p3L118R-MPB51 プラスミドを保持する組換えリステリア ( $\Delta 2/Ag85A$ 、 $\Delta 2/Ag85B$ 、 $\Delta 2/MPB51$ ) 感染 J774 細胞においてそれぞれ Ag85A、Ag85B、MPB51 遺伝子転写産物が確認された。
2.  $\Delta 2/Ag85A$ 、 $\Delta 2/Ag85B$ 、 $\Delta 2/MPB51$  感染マウスにおいて
  - 1) 抗原特異的遅延型過敏反応で、有意な PPD 特異的足蹠反応が観察された。
  - 2) 有意な PPD 特異的リンパ球の試験管内増殖反応が観察された。
  - 3) 脾細胞培養上清に、PPD 特異的な IFN $\gamma$  の産生を認めた。

## 〔考察〕

本研究では弱毒リステリアをキャリアーとした DNA ワクチン法の検討をおこなった。今回の結果では、 $\Delta 2/Ag85A$ 、 $\Delta 2/Ag85B$ 、 $\Delta 2/MPB51$  をマウスマクロファージ細胞株 J774 細胞に感染させると各々 mRNA を発現し、これをマウスに腹腔感染させることにより、PPD 特異的細胞性免疫の誘導が観察された。本研究に用いた系の特徴には、(1) リステリオリジン O の作用によりリステリアは速やかに宿主細胞の細胞質へ移行でき、そこでリシン 118 の作用により菌体が破壊されプラスミドが放出されることが期待できること、(2) リステリアはマクロファージや樹状細胞などの抗原提示担当細胞に選択的に感染することが知られており、効率よい抗原提示ができること、(3) リステリアは Th1 優位な細胞性免疫を誘導しやすい性質があるため、結核菌等の細胞内寄生細菌の感染防御には適していること、(4) ウイルスベクター法などと違い、抗生物質による制御も可能である、等がある。今後、この系の有効性をさらに明らかにするためには、結核菌に対する感染防御能の検討、従来のプラスミド DNA を直接生体に免疫する DNA ワクチン法との比較検討の解析が必要である。

## 〔結論〕

弱毒リステリアをキャリアーとした Ag85 ファミリー DNA ワクチンは、マウスにおいて結核菌抗原特異的細胞性免疫を誘導できた。

## 論文審査の結果の要旨

1999年の結核緊急事態宣言にみられるように、我が国では結核感染患者が徐々に増加している。この背景には高齢者の増加という社会的問題に加えて、多剤耐性菌の出現など複雑な要素がある。さらに、各国での BCG ワクチンの効果の検討では、80%から0%と有効性にばらつきが見られており、BCG ワクチン自体の信頼性は必ずしも高くはない。このような状況の中で、BCG にかかわる有効なワクチンの開発が強く望まれている。DNA ワクチンでは、様々な手技を用いて目的とする抗原をコードする DNA を生体に投与し、抗原特異的細胞性および液性免疫を誘導し、生体防御を行う。結核感染予防には T 細胞が中心となる防御免疫が重要な役割を果たしている。とくに、CD8陽性 T 細胞は抗原提示細胞上のクラス 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。結核菌は細胞内寄生細菌で、防御免疫はおもに CTL に依存することから、DNA ワクチンの有効性が期待されている。

申請者らは結核菌由来抗原 Ag85A、Ag85B、MPB51 遺伝子を導入した弱毒リステリア株でマウスを免疫することにより、感染防御能に重要な T 細胞機能の誘導を試みた。遺伝子導入されたリステリア

抗原提示細胞内に取り込まれると、自己融解して菌体由来抗原を細胞内で放出する。その後、これら分子は細菌表面に提示されて、抗原特異的 CD4陽性および CD8陽性 T 細胞が誘導されることが考えられる。

用いられた材料と方法は適切であった。リステリアへの遺伝子導入は *in vitro* の実験において確認した。発現プラスミドをもつリステリアをマウス腹腔内に注入して、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菌でワクチンを行った。特異抗原的 T 細胞機能の誘導は、ワクチン後に得た脾細胞の PPD に対する増殖反応と、ELISA および RT-PCR 法を用いたインターフェロン- $\gamma$  産生でみた。さらに、ワクチン後マウス足底に PPD を注射して、その腫脹の程度で免疫能の強さを検討した。

得られた結果は以下のごとくであった。

遺伝子導入リステリア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、*in vitro* PPD 刺激後のインターフェロン- $\gamma$  産生細胞が脾で増加していた。また、強力な遅延型皮膚反応が誘導された。これらの実験結果により、結核菌由来抗原エピトープ DNA を導入されたリステリアを用いたワクチンは、感染防御免疫の成立に有効であることが示された。

本研究のユニークな点はリステリアという細胞内寄生菌を弱毒化し、さらに抗原提示細胞内で自己融解、すなわち自殺するように機能変換したことにある。さらに、この菌を用いることによって、感染防御に必要な T 細胞機能が誘導できたという結果が、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があった。

- 1) プラスミド DNA の導入効率
- 2) リステリア殺菌に用いた抗生剤の濃度
- 3) マウスの年齢による感染防御免疫能の違い
- 4) リンパ節での抗結核菌免疫反応
- 5) BCG と DNA ワクチンとによる感染防御免疫成立のプロファイルの違い
- 6) 脾細胞分画後のインターフェロン  $\gamma$  産生の違い
- 7) ELISPOT によるサイトカイン産生の検討

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 山下 昭  
副査 瀧川 雅浩 副査 千田 金吾