

Identification of murine H2-D d - and H2-A b -restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*

| | |
|-----|---|
| 著者 | 鈴木 美奈 |
| 発行年 | 2004-09-17 |
| URL | http://hdl.handle.net/10271/245 |

doi: 10.1128/IAI.72.7.3829-3837.2004

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 425号 | 学位授与年月日 | 平成16年 9月17日 |
| 氏名 | 鈴木美奈 | | |
| 論文題目 | Identification of murine H2-D ^d - and H2-A ^b -restricted T-cell epitopes on a novel protective antigen, MPT51, of Myco-bacterium tuberculosis (結核菌の新規感染防御抗原である MPT51 のマウス H2-D ^d 及び H2-A ^b 拘束性 T 細胞エピトープの同定) | | |

博士(医学) 鈴木美奈

論文題目

Identification of murine H2-D^d-and H2-A^b -restricted T-cell epitopes on a Novel protective antigen, MPT51, of *Mycobacterium tuberculosis*

(結核菌の新規感染防御抗原であるMPT51のマウスH2-D^d及びH2-A^b拘束性T細胞エピトープの同定)

論文の内容の要旨

[はじめに]

結核に対するワクチンとしては現在、弱毒生菌であるBCGが用いられている。しかしながら、近年、このBCGの効果は特に成人において疑問視されている。そこでBCGに代わるより有効なワクチンの開発が急務である。このためには、結核菌の主要な防御抗原の同定、免疫防御機構の解析など様々な基礎的研究が必要である。

Ag85A, Ag85BなどのAg85複合体は*Mycobacterium*属に共通する主要な分泌タンパクであり、有効な感染防御抗原として機能することが知られている。申請者はこれらに加えて、新たにMPT51分子が結核菌の防御抗原として機能する結果を得た。そこで今回、DNAワクチンを用いてMPT51分子のT細胞エピトープの同定を試みた。

[材料ならびに方法]

- 1) マウス：BALB/cマウス(H2^d)およびC57BL/6マウス(H2^b)を使用した。
- 2) DNAワクチンの作製と免疫：発現ベクターであるpCIのCMVプロモーターの下流にMPT51遺伝子を挿入しpCI-MPT51を作製した。これを遺伝子銃にて、1週おきに4回免疫した。
- 3) T細胞エピトープの同定：免疫マウス脾細胞を、MPT51を網羅するオーバーラッピング・ペプチドライブラリーで刺激した。その後、培養上清中のインターフェロン(IFN)- γ をサイトカインELISA法にて測定し、エピトープを含むペプチドを同定した。更に、フローサイトメトリーを用いた細胞内サイトカイン染色法(ICS法)にて、ペプチドに対して反応するT細胞のサブセットを決定した。CD8陽性T細胞エピトープの決定は、エピトープを含むことが判明した領域からコンピューター・アルゴリズムにて検索し、候補となるペプチドを合成し、免疫脾細胞に反応させることで行った。
- 4) H2拘束性分子の決定：RMA-S細胞株にH2-K^d, H2-D^d, またはH2-L^dを遺伝子導入した細胞株にエピトープ・ペプチドを反応させることでH2クラスI分子の発現をフローサイトメトリーで解析するH2安定化試験を行い、拘束性分子を決定した。

[結果]

BALB/cマウス(H2^d)においては、pCI-MPT51免疫マウス脾細胞でp21(21-40)ペプチドにのみ、IFN- γ の産生誘導がみられた。これをICS法によって調べた結果、CD8陽性T細胞がIFN- γ を産生しており、p21にはCD8陽性T細胞エピトープが含まれることがわかった。CD8陽性T細胞エピトープは通常8から10アミノ酸からなり、多くは9アミノ酸である。そこでコンピューター・アルゴリズムにより、p21中のエピトープ候補を検索した。これら候補となるペプチドを合成し、MPT51免疫マウスの脾細胞を刺激して、

IFN- γ 産生量をサイトカインELISA法にて調べた。また、ICS法でも確認した。その結果、p24-32がエピトープであることが判明した。また、p24-32の拘束性分子を決定するために、各種H2遺伝子を導入したTAP2欠損RMA-S細胞を用いたH2クラスI安定化試験を行った。

その結果、H2-Dd拘束性のエピトープであることが判明した。

C57BL/6マウスにおいては、pCI-MPT51免疫マウス脾細胞でp171(171-190)とp191(191-210)ペプチドにIFN- γ の産生誘導がみられた。これら二つのエピトープは、CD4陽性T細胞エピトープであった。また、IFN- γ の産生誘導能は常に、p171がp191に比べて強く、p171はドミナント、p191はサブドミナントエピトープであることが判明した。

[考察]

結核に対する新たなワクチン開発のためには、主要防御抗原および免疫防御機構の解析が必須である。この点に関し、Ag85A、Ag85Bなどが結核の防御抗原であること、およびこれらのT細胞エピトープが報告されている。我々は新たにMPT51分子が主要防御抗原であることを見出した。そこで、これらのT細胞エピトープをBALB/cマウス、およびC57BL/6マウスを用いて行った。その結果、BALB/cマウスにおいては、H2-D^d拘束性CD8陽性T細胞エピトープとしてp24-32の9-merを同定した。また、C57BL/6マウスではCD4陽性T細胞エピトープとして、p171およびp191を各々ドミナントおよびサブドミナントエピトープとして同定した。CD4陽性T細胞エピトープは通常12-24アミノ酸からなり、H2クラスII分子のペプチド結合溝からはみ出して結合する。このため、CD8陽性T細胞エピトープと異なり、最小単位を決定することは困難である。このため、これら20アミノ酸をCD4陽性T細胞エピトープとした。また、C57BL/6マウスのH2クラスII分子はH2-A^bのみであるので、この分子がこれらエピトープの拘束性分子と考えられる。

これらT細胞エピトープの同定により、MPT51分子に特異的なT細胞の同定が、テトラマー法およびICS法により可能となった。これは、結核菌に対する免疫防御機構の解析に資するものである。

[結論]

申請者は、MPT51分子のT細胞エピトープの検索をBALB/cおよびC57BL/6マウスにおいて行った。その結果、前者に対してはH2-D^d拘束性CD8陽性T細胞エピトープとしてp24-32を、後者に対しては、p171とp191という二つのH2-A^b拘束性CD4陽性T細胞エピトープを同定した。

論文審査の結果の要旨

近年、結核の再興が大きな社会的問題となっている。とくに、集団発生、人口の高齢化、剤耐性菌の出現、AIDS患者での合併といった面で優れた予防および治療手段の開発が望まれている。結核感染に対する防御機構がうまく作動するためには、防御に関係の深い結核菌由来抗原ペプチドを細胞障害性T細胞やTh1細胞が認識することが重要である。したがって、このような抗原ペプチドを同定することは結核の予防および治療法の開発にとって中心的な要素である。

論文申請者はマウスにおいてDNAワクチン法により、新たな結核菌由来MPT51分子のT細胞エピトープの同定を行った。この分子は、従来から知られている抗原であるAg85複合体と40%の相同性を持ち、新たな感染防御抗原として注目されている。エピトープ反応性T細胞をin vivoで誘導するために、BALB/cおよびC57BL/6マウスに、MPT5遺伝子を挿入したpCI-MPT51をDNAワクチンとして、遺伝子銃で、1週

おきに4回免疫した。

その後、MPT51を網羅するオーバーラッピング・ペプチドライブラリーで免疫マウスの脾細胞を刺激し、インターフェロン(IFN)- γ 産生およびMHCテトラマー結合細胞をフローサイトメトリーで測定し、T細胞エピトープを同定した。さらに、遺伝子導入RMA-S細胞株を用いたH2安定化試験でH2拘束性分子を決定した。材料、方法ともに、本実験の目的を達成するための条件を十分に満たしていると考えられた。

得られた主要な結果は以下の通りである。

1. BALB/c : p21 (21-40) ペプチド刺激により、CD8+T細胞がIFN- γ を産生した。このペプチドのうちの24-32がT細胞エピトープであった。p21ペプチドはH2-D^b拘束性であった。
2. C57BL/6 : p171 (171-190) および p191 (191-210) ペプチド刺激により、CD4+T細胞がIFN- γ を産生した。P171がドミナント、P191がサブドミナントエピトープであった。

C57BL/6においては、最小単位エピトープを決定できなかった。その理由としてCD4+T細胞エピトープは通常12~24のアミノ酸からなり、H2クラスII分子のペプチド結合溝からはみ出して結合するため、最小単位の決定は困難とされている。

これら結果は、結核菌感染の防御機構の解明にとって極めて重要な示唆を与えるとともに、結核感染予防の一つの手段であるDNAワクチンの作製におけるパラダイムを提供するものである。

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) マウスの選択基準
- 2) 遺伝子銃によるワクチン分子のターゲット
- 3) 遺伝子銃と筋肉内注射でのDNAワクチン効果と抗原提示細胞の違い
- 4) 遺伝子銃により誘導されたT細胞のIFN- γ 産生機構
- 5) 誘導されたCTLあるいは遅延型T細胞の機能
- 6) CD4-CD8-細胞および $\gamma\delta$ T細胞の関与

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点もよく把握しており、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 宮本 愛 副査 千田 金 吾