



Protective CTL response is induced in the absence of CD4+T cells and IFN- γ by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes*

メタデータ	言語: Japanese 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: 吉田, 篤司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1634

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 357号	学位授与年月日	平成14年 2月22日
氏名	吉田篤司		
論文題目	<p>Protective CTL response is induced in the absence of CD4+ T cells and IFN-γ by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Listeria monocytogenes</i> の細胞傷害性 T細胞エピトープを発現する DNA ワクチンは CD4 陽性 T細胞及びインターフェロン-γ 非依存的に防御免疫を誘導する)</p>		

博士(医学) 吉田 篤 司

論文題目

Protective CTL response is induced in the absence of CD4+ T cells and IFN- γ by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes*

(*Listeria monocytogenes*の細胞傷害性T細胞エピトープを発現するDNAワクチンはCD4陽性T細胞及びインターフェロン- γ 非依存的に防御免疫を誘導する)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

細胞内寄生体に対する感染防御には細胞性免疫が重要な役割を果たす。さらに、その細胞内局在によって感染防御に必要な細胞性免疫の種類が異なることが知られている。宿主細胞の細胞質内で増殖するウイルスやリケッチアなどに対しては、主として細胞傷害性T細胞(CTL)が感染防御に働き、食胞内で増殖する結核菌などには1型ヘルパーT(Th1)細胞が働く。食胞内に取り込まれ、その後細胞質に移行するリステリアに対しては双方が感染防御に働く。これら細胞性免疫を誘導できるワクチンは現在のところBCGなどの弱毒生ワクチンに限られている。ところが、生ワクチンは強い局所反応や発熱および毒力復帰などの副反応の危険性を排除できない。最近、DNAワクチンが細胞性免疫を強力に誘導できることから注目を集めている。そこで、我々は細胞内寄生菌のモデルとしてリステリアを用い、この感染防御に有効なCTLまたはTh1細胞を任意に誘導できる指向性DNAワクチンの開発に着手した。本研究では、CTL誘導型DNAワクチンを作製し、これによって誘導される感染防御のメカニズムについて解析を行った。

〔材料と方法〕

1) CTL誘導型DNAワクチンの作製：リステリア感染の主たる防御抗原の1つであるリステリオリジンO(LLO)の優勢CTLエピトープ(H-2K^d拘束性LLO 91-99)をコードするDNAを合成し、発現プラスミドpCIに挿入した(p91m)。この場合、DNAのコドンにマウスに最適化して合成した。2) 免疫とその効果の判定：2 μ gのDNAワクチンp91mを遺伝子銃で1週間おきに3回BALB/cマウスに免疫した。最終免疫の1週間後に脾細胞を回収し、細胞傷害試験を行った。また、リステリアを感染させて感染抵抗性を検討した。3) T細胞亜集団の除去：抗CD4または抗CD8抗体を投与し、T細胞亜集団を生体内で除去した。4) IFN- γ の検討：免疫脾細胞をLLO 91-99ペプチドで5日間刺激し、上清中のIFN- γ 量をELISAで測定した。また、IFN- γ の機能を中和抗体およびIFN- γ レセプターノックアウト(IFN- γ RKO)マウスで検討した。

〔結果〕

1) p91m免疫マウスの脾細胞をエフェクター細胞として、細胞傷害試験を行ったところ、LLO 91-99ペプチドに特異的なCTLが認められた。2) 誘導されたCTLはIFN- γ を産生するCD8陽性のT細胞で、その誘導にはCD4陽性細胞のヘルプを必要としなかった。3) プラスミドDNAワクチンが持つCpGモチーフはこのCTLの誘導に関与しなかった。4) リステリア感染実験により、p91m免疫はマウスに感染防御免疫を誘導することが判明した。5) IFN- γ RKOマウスとIFN- γ 中和抗体を用いた実験より、p91m免疫マウスのリステリア感染防御にIFN- γ は必須ではないことが明らかとなった。

〔考察〕

p91mによって誘導されるCTLが産生するIFN- γ はリステリア感染防御に必要ではなかった。これに対し、Th1細胞による感染防御にはIFN- γ が必須であることが知られている。このことより、CTLによる感染防御ではその細胞傷害活性が菌の排除に有効に働くことが示唆された。また、一般的にCTLの誘導にはCD4陽性T細胞のヘルプが必要であるが、p91mによるCTLの誘導にはこれを必要としなかった。p91mプラスミド自身が持つCpGモチーフのアジュバント効果がヘルパーの代行をすることが疑われたが、実験結果はこれを否定するものであった。遺伝子銃による接種に用いられた金粒子のアジュバント効果、またはCTL自身による活性増強効果などがこのヘルパー非依存性のCTL誘導に関与する可能性がある。

〔結論〕

- 1) 単一のCTLエピトープを発現するp91mの免疫により、マウスにIFN- γ を産生するCD8陽性のCTLを誘導できた。
- 2) p91mによるCTLの誘導はCD4陽性細胞非依存的であった。
- 3) p91mはリステリア感染抵抗性を誘導した。
- 4) p91m免疫マウス誘導された感染抵抗性にIFN- γ は必須ではなかった。

論文審査の結果の要旨

*Listeria monocytogenes*は人畜共通感染症であるリステリア症の原因菌であり、典型的な細胞内寄生菌である。その防御反応は主に細胞傷害性T細胞(CTL)と1型ヘルパーT細胞(Th1)による。申請者は細胞性免疫を誘導できるワクチンに注目しその開発を進めているが、生ワクチンは強い局所反応や発熱などの副反応をおこしたり、毒力が復帰する危険性がある。そこで、その対策としてDNAワクチンの使用に着目し、マウスを用い*L. monocytogenes*の抗原エピトープを発現するCTL誘導型DNAワクチンを作製し、それによって誘導される感染防御反応の機序を解明しようとした。

用いられた材料と方法は本研究の目的に適切であると評価された。すなわち、CTL誘導型DNAワクチンとしてリステリオリジンO(LLO)の優勢エピトープ(H-2K^d拘束性LLO 91-99)をコードするDNAを合成し、これを発現プラスミドpCIに挿入しプラスミドDNAワクチンを作製した(p91m)。効果の判定は、p91mをGene Gunで1週間おきに3回BALB/cマウスに免疫し、最終免疫の1週間後に脾細胞の細胞傷害試験を行った。また、リステリアを感染させて感染抵抗性を検討した。さらに、抗CD4または抗CD8抗体投与により、エフェクター細胞の同定を行った。また感染防御におけるIFN- γ の関与を中和抗体およびIFN- γ レセプターノックアウト(IFN- γ RKO)マウスで検討した。

得られた結果で評価された点は次のとおりである。

1. 細胞傷害試験の結果より、LLO 91-99ペプチドに特異的なCTLがマウスの脾細胞に誘導された。
2. そのCTLはCD8陽性のT細胞で、その誘導にはCD4陽性T細胞のヘルプを必要としなかった。
3. そのCTLの誘導にはプラスミドDNAワクチンが持つCpGモチーフのアジュバント効果は関与しなかった。
4. p91mの免疫はマウスにリステリアに対する感染防御免疫を惹起した。また、その際、IFN- γ は必須ではなかった。

以上の結果をもとに申請者は*L. monocytogenes*に対するp91mによるCTLの誘導にはCD4陽性T細胞のヘルプは必要なく、CD8陽性T細胞の反応によることを証明した。またその感染防御にはIFN- γ は関与せず、CTLの細胞傷害活性が重要であることを明らかにした。

この研究で特に評価された点は、*L. monocytogenes*の防御抗原LLOの1つの抗原エピトープを発現するp91mをGene Gunで接種するという効率良い感染防御免疫の誘導法を確立した点である。またその機序として、CD4陽性T細胞非依存性であり、IFN- γ やCpGモチーフのヘルプも非依存性に免疫誘導が起こるとした点である。今後、この反応のヘルパーの解明が期待された。

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疑を行った。

- 1) Gene Gunで接種したDNAワクチンp91mの量を2 μ gとした理由と、接種方法及び接種回数をどのように決定したか
- 2) 抗体産生を検討したか
- 3) 局所リンパ節での反応と脾臓での反応では差が見られるか
- 4) IFN- γ ノックアウトマウスでの反応は検討したか
- 5) DNA中に混在するリボポリサッカライドが樹状細胞の活性化を惹起しないか
- 6) ランゲルハンス細胞の関与は検索したか
- 7) DNAワクチンと生菌ワクチンの感染防御機構の違い

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いるとして、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 山下 昭
副査 瀧川 雅浩 副査 千田 金吾