

Endosomal/lysosomal targeting of a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium by DNA immunisation induces a specific T-cell subset and partial protective immunity in vivo

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 内山, 啓 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/273">http://hdl.handle.net/10271/273</a>

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 398号	学位授与年月日	平成16年 3月10日
氏名	内山 啓		
論文題目	<p>Endosomal/lysosomal targeting of a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium by DNA immunisation induces a specific T-cell subset and partial protective immunity in vivo                      (エンドゾーム/リソゾーム局在型の細胞内寄生細菌由来単一ヘルパーT細胞エピトープDNA免疫による単一特異性T細胞サブセットと部分的感染防御免疫の誘導)</p>		

博士(医学) 内山 啓

論文題目

Endosomal / lysosomal targeting of a single helper T-cell epitope of an intracellular bacterium by DNA immunization induces a specific T-cell subset and partial protective immunity in vivo

(エンドゾーム/リソゾーム局在型の細胞内寄生菌由来単一ヘルパーT細胞エピトープDNA免疫による単一特異性T細胞サブセットと部分的感染防御免疫の誘導)

論文の内容の要旨

[はじめに]

特異的なT細胞サブセットのみを誘導することは、感染症や自己免疫疾患、そして悪性腫瘍に対する効果的なワクチンの開発とそれらのT細胞サブセットの免疫応答における役割の解明に有効である。本研究では、DNAワクチンの手法を用いて *Listeria monocytogenes* (以下リステリアとする) の単一ヘルパーT細胞(Th)エピトープ特異的CD4陽性T細胞サブセットの誘導を試みた。一般にDNAワクチンでは、抗原分子が細胞質内に存在するためMHCクラスI依存抗原提示経路を介したCD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)の誘導に適しているが、本研究では抗原分子をエンドゾーム/リソゾームに局在化させることにより、MHCクラスII依存抗原提示経路を介したCD4陽性ヘルパーT細胞(Th)の誘導を図った。リステリアの溶血毒素である lysteriolysin 0 (LL0) 由来の優位(ドミナント)なCD4陽性Thエピトープである LL0 215-226 を標的ペプチドとし、それとリソゾーム関連膜タンパク (lysosome-associated membrane protein : LAMP-1) 分子のエンドゾーム/リソゾーム局在シグナルとの融合分子をコードするDNAをマウスに直接免疫することにより、LL0 215-226ペプチドをエンドゾーム/リソゾームに局在化させ、特異的なCD4陽性Thの生体内における誘導を試みた。

[材料ならびに方法]

6~18週齢のC3H/Heマウスを免疫に使用した。単一エピトープ特異的Th誘導型DNAワクチンとして以下の3種類の真核生物発現プラスミドを構築した。作製したプラスミドは、

- (1) p215 : LL0 215-226ペプチドのみを発現するプラスミド
- (2) pE215 : LL0 215-226ペプチドのN末端にアデノウイルスのE3リーダー配列を融合させLL0 215-226ペプチドを小胞体(ER)内に局在させるようにしたプラスミド
- (3) pE215LAMP : LL0 215-226ペプチドのN末端にアデノウイルスのE3リーダー配列を付加し、更にC末端にリソゾーム関連膜タンパク(LAMP-1)分子由来エンドゾーム/リソゾーム局在シグナルを付加したタンパクの発現プラスミドで、LL0 215-226ペプチドをエンドゾーム/リソゾーム内に局在化させるためのプラスミドである。これらのプラスミドDNA1 $\mu$ gを金粒子にコートし、マウス腹部の皮膚に遺伝子銃(Bio-Rad社製)を用いて1週間隔で計4回接種した。免疫マウスから脾細胞を調製し、LL0 215-226ペプチド存在下でトリチウムチミジンの放射活性を測定することにより抗原ペプチド特異的リンパ球増殖反応を検討した。また抗CD4及びCD8モノクローナル抗体を用いた増殖阻止実験も行った。

また、免疫マウス脾細胞のインターフェロン(IFN)- $\gamma$ の産生能をELISA法を用いて測定した。さらにDNA免疫による感染防御免疫誘導能を調べるため、致死量のリステリアを用いた感染実験を行った。マウス腹腔内に $1 \times 10^5$ CFUのリステリアを注射し感染させ、その72時間後の脾臓内のリステリア菌数を算定した。

## 〔結果〕

- (1) 抗原ペプチド特異的リンパ球増殖：p215、pE215プラスミド免疫マウス脾細胞では、LL0 215-226特異的増殖反応を認めなかったのに対し、pE215 LAMPプラスミド免疫マウス脾細胞は、LL0 215-226特異的増殖反応を示した。またその増殖は抗CD4モノクローナル抗体を加えることにより抑制された。
- (2) 抗原ペプチド特異的IFN- $\gamma$ の産生：pE215 LAMPプラスミド免疫でのみ、脾細胞培養上清中にLL0 215-225特異的IFN- $\gamma$ 産生を認めた。しかし、その量はリステリア生菌免疫群に比較すると少なかった。
- また、
- (3) 致死量のリステリア感染実験では、pE215 LAMP免疫マウスで未免疫マウスに比し、1 log弱の脾臓中のリステリア菌数の減少を認めた。p215及びpE215免疫マウスでは、未免疫マウスと比べ脾臓中リステリア菌数の減少を認めなかった。

## 〔考察〕

遺伝子銃を用いたDNA免疫は、抗原分子を直接、導入細胞の細胞質で発現させることができるため、MHCクラス I を介した抗原処理経路が働き、CD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)を誘導するのに適しているが、CD4陽性Thは誘導しにくいと考えられている。実際、本研究でもp215プラスミドやpE215プラスミドによる免疫では、LL0 215-225特異的CD4陽性Thを誘導することはできなかった。本研究では、後期のエンドゾームに主に存在している膜貫通タンパクであるLAMP-1を用いてThエピトープをエンドゾーム/リソゾーム系の小胞に局在させたpE215 LAMPプラスミドによる免疫にて抗原ペプチド特異的CD4陽性Thを誘導すること、さらに部分的とはいえリステリアに対する感染防御能を示すことができた。本研究は、抗原分子をエンドゾーム/リソゾーム系の小胞に局在させるように工夫したプラスミドをDNAワクチンとして用いれば、遺伝子銃を用いたDNA免疫で、特定の抗原ペプチド特異的CD4陽性Thサブセットを誘導できることを示すもので、特定のCD4陽性Thサブセットの機能の解析に有用であると同時に、細胞性免疫誘導型DNAワクチン用プラスミドの設計に重要な示唆を与えるものである。

## 論文審査の結果の要旨

感染症予防におけるワクチンの重要性は広く認められている。有効なワクチン開発にはさまざまなストラテジーが報告されており、関心の深さがうかがわれる。微生物の体内感染症には細胞内寄生、食胞内寄生、リソゾ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。人に対する病原性は弱いのが、免疫力の低下した患者、妊婦、乳児などではときに重篤な症状を引き起こす。マウス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誘導エピトープにはヒエラルキーがあり、Listeriolysin O(LL0)91-99にはp60由来ペプチドとくらべより強い感染防御効果がある。一方、Th誘導エピトープも明らかにされており、LL0 215-226がドミナントエピトープとして知られている。

本研究では、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、遺伝子銃によるDNAワクチンの有効性を検証した。申請者が用いた、材料、方法は適切であった。とくに、注目すべき点として、DNAワクチンとして作製した真核生物発現プラスミドpE215

LAMPプラスミドはLL0 215-226ペプチドのN末端にアデノウイルスのE3リーダー配列を付加し、さらにC末端にリソゾーム関連膜蛋白(LAMP-1)分子由来エンドゾーム/リソゾーム局在シグナルを付加した蛋白を発現する。

遺伝子銃によるDNAワクチンは、径  $1\mu\text{m}$  金粒子にプラスミドDNAを吸着させ皮膚内に打ち込む方法で、少ないDNA量で高いワクチン効果を生み、また対象者に前処置が不要な簡便な方法である。CTL誘導にはむいているが、Th誘導にはむいていないとされてきたが、本申請者はpE215 LAMPプラスミドを用いることにより、LL0 215-226ペプチドをエンドゾーム/リソゾームに局在させ、ペプチド特異的Thを誘導することに成功した。

pE215 LAMPプラスミド免疫マウスにのみ見られ、コントロールプラスミド免疫マウスでは見られなかった結果は以下の通りである。

- 1) LL0 215-226刺激による脾リンパ球のin vitro特異的増殖
- 2) 抗原ペプチド特異的インターフェロン $\gamma$ 産生
- 3) 致死量のリステリア菌接種後、脾臓中の菌数の減少

本研究では、抗原分子をTh誘導経路にのせる工夫をしたDNAワクチンをもちい、遺伝子銃により極めて抗原提示能の強いランゲルハンス細胞を利用して強力な感染防御免疫を誘導する試みをした点を高く評価した。また、将来的には、CTL免疫にTh免疫を付加することにより、より強力な感染防御免疫を誘導できる可能性を示した。

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) 菌免疫と死菌免疫
- 2) Thを誘導する理由—とくに、感染防御におけるCTL誘導との比較
- 3) 免疫機構の攻撃をうけた感染細胞内の菌の動態
- 4) コレステロールへのLL0結合の分子的機構
- 5) Th誘導経路に関連したLAMP以外の分子をもちいてのプラスミド構築
- 6) LL0 215-226以外のThエピトープを用いての防御
- 7) BALB/c x C3H・F1を用いてのThおよびCTLによる感染防御
- 8) 遺伝子銃免疫における抗原提示細胞、とくに、ランゲルハンス細胞にとり込まれるエピトープと免疫力の程度
- 9) ヒトHLAに対するリステリアエピトープ

これらの質問に対する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	大西一功