HamaMed-Repository

浜松医科大学学術機関リポジトリ

浜松医科大学
Hamamatsu University School of Medicine

Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-09-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 河野, 雅人 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003405

博士(医学)　　河野 雅人

論文題目

Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine

(タイプ 1 免疫誘導型樹状細胞ワクチンによる細胞内寄生菌に対する感染防御免疫の増強)

論文の内容の要旨

[はじめに]

リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)などの細胞内寄生菌に対する感染防御には抗原特異的な$CD8^+$細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導が重要である。強力な抗原提示能を持つ樹状細胞(DC)をワクチンとして用い、免疫優性抗原を提示させることで抗原特異的なCTLを誘導し、細胞内寄生菌に対する感染防御免疫を高めることができる。この際、DC が産生する IL-12p70 は細胞性免疫誘導に最も重要なサイトカインであり、CTL の活性化や$CD4^+$ヘルパーT 細胞を 1 型ヘルパーT 細胞(Th1)へ誘導する。しかしながら、DC の IL-12p70 産生能は一過性であり、DC ワクチンの細胞性免疫誘導における限界と考えられてきた。そこで近年、細胞性免疫誘導型 DC ワクチンとして、IFN-γ や 1 型 IFN、各種 Toll-like receptor ligand などを用いた培養方法が研究されている。これら培養方法で成熟した DC は IL-12p70 産生能が高く、細胞性免疫誘導に優れていることが示されている。このような細胞性免疫誘導型 DC ワクチンは癌免疫領域を中心に研究が進んでいるが、これまで細胞内寄生菌に対する報告はない。本研究では IL-4、IFN-γ を用いた細胞性免疫誘導型 DC ワクチンモデルを採用し、細胞内寄生菌感染に対する有効性を検討した。

[材料ならびに方法]

BALB/c マウスの骨髄細胞を GM-CSF を用いて誘導し、IL-4、IFN-γ、lipopolysaccharide(LPS)存在下で成熟させた DC(type-1 polarized DC)と、LPS のみで成熟させた DC(non-polarized DC)を作製した。(1)IL-12p70 産生能を ELISA にて評価、(2)表面マーカーの変化をフローサイトメトリーにて解析した。

次に、リステリア菌の CTL 抗原であるリステリオリジン O (LLO91-99)を添加し作製した DC ワクチンを 1 週間間隔で 2 回 BALB/c マウスへ経静脈的に免疫した。6 週間後に免疫マウスの脾臓を採取し、(3)抗原特異的$CD8^+$T 細胞数を LLO-tetramer を用いて測定、(4)IFN-γ 産生能を ELISA にて測定、(5)CTL 活性を LDH releasing assay にて測定した。

さらに、同様にして作製した免疫マウスにリステリア菌を経静脈的に感染させ、(6)非致死量(LD_{50})投与されたマウスの脾臓・肝臓の菌量を 3 日後に測定、(7)致死量($5LD_{50}$)投与されたマウスの 14 日間の生存を評価した。

最後に、IL-12p40 ノックアウトマウス由来の DC ワクチンを作製し、(8)CTL 活性の測定、(9)非致死量のリステリア菌感染マウスの脾臓・肝臓の菌量を測定した。

[結果]

(1)IL-4、IFN-γ、LPS 存在下で誘導した type-1 polarized DC は LPS のみで誘導した non-polarized DC よりも高い IL-12p70 産生能を示した。
(2)成熟 DC は CD40、CD80、CD86 など共刺激分子の高発現を認めたが、type-1 polarized DC と non-polarized DC では明らかな差は認めなかった。
(3)(4)(5)抗原(LLO)を添加/非添加した type-1 polarized DC(LLO^{+}DC1、LLO^{-}DC1)と non-polarized DC(LLO^{+}DC、LLO^{-}DC)、PBS コントロールの 5 群を比較した。LLO^{+}DC1 投与マウスは他群と比較して有意に多くの LLO 特異的 CD8^{+}T 細胞を誘導し、また有意に高い抗原特異的 IFN-γ 産生能や CTL 活性を示した。
(6)(7)リステリア菌感染に対して、LLO^{+}DC1 投与マウスは脾臓、肝臓ともに他群と比較して有意に菌量が抑制され、さらに有意に生存期間の延長を認めた。
(8)(9)Wild-type マウス由来 type-1 polarized DC(WT-DC1)と non-polarized DC(WT-DC)、IL-12 ノックアウトマウス由来 type-1 polarized DC(IL-12KO-DC1)と non-polarized DC(IL-12KO-DC)、PBS コントロールの 5 群を比較した。IL-12KO-DC1、IL-12KO-DC 投与マウスは WT-DC1、WT-DC 投与マウスと比較して CTL 活性が低く、感染防御能も低かった。また、IL-12KO-DC1 と IL-12KO-DC 投与マウス間での CTL 活性、感染防御能に差は認めなかった。

［考察］

IL-4、IFN-γ を用いて成熟させた DC は in vitro で IL-12p70 高産生能を示し、細胞性免疫誘導型 DC ワクチンとして、リステリア菌を使用した細胞内寄生菌モデルにおいても抗原特異的 CTL の高い誘導能を認め、感染防御能を増強した。IL-12p40 ノックアウトマウス由来の細胞性免疫誘導型 DC ワクチンでは、細胞性免疫反応の増強効果は消失しており、IL-12p70 高産生能の獲得が細胞性免疫誘導能に重要であることを示した。

［結論］

細胞性免疫誘導型 DC ワクチンは細胞内寄生菌感染モデルにおいて高い抗原特異的 CTL 活性を誘導し、感染防御能を増強した。細胞内寄生菌に対するワクチン療法の新たな手法の一つとなる可能性が示唆された。