



Development of a novel T cell-oriented vaccine using CTL/Th-hybrid epitope long peptide and biodegradable microparticles, against an intracellular bacterium

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2021-04-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田中, 和樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003816

博士 (医学) 田中 和樹

論文題目

Development of a novel T cell-oriented vaccine using CTL/Th-hybrid epitope long peptide and biodegradable microparticles, against an intracellular bacterium

(細胞内寄生菌に対する細胞傷害性T細胞/ヘルパーT細胞ハイブリッドエピトープ長鎖ペプチドおよび生分解性マイクロ粒子を用いた新規 T 細胞指向型ワクチンの開発)

論文の内容の要旨

[はじめに]

結核菌やリステリアなどの細胞内寄生菌は、宿主の免疫機構や抗菌薬からの回避により時に難治性感染症を引き起こす。細胞内寄生菌を排除するための免疫応答では、ヘルパーT細胞 (Th) の補助下において細胞傷害性T細胞 (CTL) による感染細胞の障害・排除が重要な役割を果たす。CTLおよびThの抗原決定基 (エピトープ) である短鎖ペプチド (CTL-p, Th-p) の投与により抗原特異的T細胞を誘導することが可能であるが、生体内で容易に分解されるため大量のペプチド投与が必要となり、高価かつCTLとThを同時に誘導することも難しい。一方で、これら2つの短鎖ペプチドをグリシンリンカーにより結合した長鎖ペプチド (Long-p) は、安定かつCTLとThを同時に誘導することも可能である。加えて、生分解性マイクロ粒子は抗原を保護し樹状細胞 (DC) による抗原提示期間の延長やCTLへのクロスプレゼンテーションを促進することが可能であり安全性も高い。従って、CTL/ThハイブリッドエピトープのLong-pと生分解性マイクロ粒子であるpoly (lactic-co-glycolic acid) [PLGA]を組み合わせることにより、CTLとThを同時かつ強力・安定的に誘導できる新規ワクチン開発が可能になるという仮説に至った。本研究では上記ワクチンを開発し、細胞内寄生菌感染症に対する有効性を検証した。

[材料ならびに方法]

まず、卵白アルブミン (OVA) を用いた *in vitro* の実験においては C57BL/6 マウスを用いた。短鎖ペプチドは CTL-p として OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) を、Th-p として OVA₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR) を使用した。Long-p は CTL-p 及び Th-p を、グリシンリンカーを用いて結合・合成した。PLGA マイクロ粒子は double emulsion 法により作成し上記抗原と混合した。骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を培養し、上記抗原を添加した後にワクチン効果を検証した。次にリステリア抗原 (LLO) を用いた *in vivo* および *ex vivo* の実験では BALB/c マウスを用いた。短鎖ペプチドは CTL-p として LLO₉₁₋₉₉ (GYKDGNEYI) を、Th-p として LLO₂₁₅₋₂₂₆ (SqliAKFGTAFK) を用い、Long-p も同様に作製した。抗原および PLGA 粒子を添加した BMDC をマウス側腹部に皮下注射した。リンパ球増殖試験では脾細

胞を染色し、フローサイトメトリーにて細胞分裂能を評価した。さらに、培養上清の IFN- γ を ELISA により測定した。リステリアの感染実験には 1×10^5 CFU の菌を腹腔内投与した。

[結果]

作成した PLGA 粒子径の中央値は $1.38 \mu\text{m}$ であった。PLGA 粒子からは 21 日間で OVA ペプチドの 76.5%、LLO ペプチドの 53.0% が放出された。BMDC に蛍光 PLGA 粒子を添加したところ、共培養 2 日間で 48.8% の取り込みを確認した。また、BMDC の早期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームのいずれにも PLGA 粒子を認めた。*In vitro* での免疫応答を見るため、OVA 抗原特異的 T 細胞を有するトランスジェニックマウス (OT-I 及び OT-II) の脾細胞を採取し各種 OVA 抗原を含む BMDC と共培養を行った ($n = 3-6$)。Long-p 単独および CTL-p+Th-p/PLGA 群と比較し、Long-p/PLGA 群において CTL と Th の最も強い増殖が確認された (それぞれ 50.6%、48.1%)。さらに培養上清中の IFN- γ 濃度も Long-p/PLGA 群で最も高値であった ($3.21 \pm 0.29 \text{ ng/mL}$)。次にリステリア抗原 LLO の各種抗原を含む BMDC をマウスの側腹部へ 2 週間毎 2 回皮下注射し、脾細胞の抗原刺激後のリンパ球増殖能を評価した ($n = 5-9$)。その結果、Long-p/PLGA 群において CTL と Th の最も強い増殖が確認された (それぞれ 43.5%、13.7%)。培養上清中の IFN- γ 濃度も Long-p/PLGA 群で最も高値であった。最後に、細胞内寄生菌に対する感染防御能を確認した。LLO の各種抗原を含む BMDC をマウスの側腹部に 3 週間毎 2 回皮下注射し、その 4 週間後にリステリアを腹腔内投与した ($n = 10-12$)。脾臓を採取したところ、Long-p/PLGA 群は Long-p 単独あるいは CTL-p+Th-p/PLGA 群と比較し有意に菌量が減少していた (それぞれ $p < 0.05$)。

[考察]

本研究において開発した Long-p/PLGA を添加した BMDC ワクチンは、抗原特異的 CTL のみだけでなく Th も誘導が可能であり、細胞内寄生菌に対する強力な感染防御効果も認められた。Long-p 単独と比較し、Long-p/PLGA では更に強い CTL の誘導能が確認できたため、PLGA 粒子による DC クロスプレゼンテーションの促進作用が関与しているものと推察された。一方で、CTL-p+Th-p/PLGA と比較すると、Long-p/PLGA では特に強い Th 誘導能が確認された。短鎖の Th-p は後期エンドソームやリソソームに豊富に存在するプロテアーゼに対して脆弱であるが、対照的に Long-p の Th エピトープは、エンドソーム内の MHC class II 分子に早期に結合しエピトープが保護されている可能性がある (“bind first trim later” model)。以上のように、本研究において開発した Long-p/PLGA は、CTL/Th ハイブリッドエピトープ長鎖ペプチドおよび生分解性マイクロ粒子それぞれの長所を活用した理想的な新規ワクチンであることが推察される。

[結論]

CTL/Thハイブリッドエピトープ長鎖ペプチドを生分解性マイクロ粒子と混合し、細胞内寄生菌に対して有効な新規ワクチンの開発に成功した。今後の実臨床において、結核菌を含む細胞内寄生菌感染症に対する有効かつ安全なワクチン開発に寄与する可能性がある。