Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from Mycobacterium tuberculosis induces specific CD8+ T-cell responses in the lung

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2017-01-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 橋本, 大 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/778

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　５１６号	学位授与年月日	平成２０年　６月２０日
氏　　名	橋　本　　大		
論文題目	Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8+ T-cell responses in the lung （結核菌由来の MPT51 をコードした第三世代レンチウイルスベクターの気管内投与は肺内に特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を誘導する）		

博士（医学） 橋 本 大

論文題目

Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from *Mycobacterium tuberculosis* induces specific CD8+ T-cell responses in the lung

（結核菌由来の MPT51 をコードした第三世代レンチウイルスベクターの気管内投与は肺内に特異的 CD8 陽性 T 細胞反応を誘導する）

論文内容の要旨

［はじめに］

結核は未だ新規発症数が年間 880 万人、死亡数が 170 万人と推定される世界最大の感染症である。結核に対するワクチンとして使用されている BCG ワクチンは小児期には有効であるが、10 代を過ぎるとその有効性が失われるとされている。このため、BCG に代わるより有効なワクチンの開発が求められている。結核菌に対する生体の免疫応答では、CD8 陽性 T 細胞を中心とした細胞性免疫が重要な役割を演じる。T 細胞は樹状細胞（DC）によって最も効率良く感作されることが知られており、所属リンパ節においてナイーブ T 細胞に抗原提示を行う。レンチウイルスベクターは、このような DC を含む様々な非分裂細胞に効率良く遺伝子導入を行うことができる。そこで、結核菌由来主要分泌タンパク MPT51 を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道的に投与することによって、肺へホーミングする MPT51 特異的細胞傷害性 T 細胞の誘導を検討した。

［材料ならびに方法］

MPT51-EGFP（オワンクラゲ緑色発光タンパク）融合遺伝子を自己不活性ベクタープラスミドに挿入し、293T 細胞にて第三世代レンチレンチウイルスベクター（1～2x10^8 IU/ml）を作製した。BALB/c マウスに、5x10^6 IU のこのレンチウイルスベクターを気管内投与し免疫を行った。免疫マウスの気管支肺胞洗浄液（BALF）や肺組織、縦隔リンパ節、脾臓から細胞を回収した。MPT51 特異的 CD8 陽性 T 細胞の解析には、細胞を MPT51 24-32 ペプチド/H2-D^d テトラマーで標識しフローサイトメトリーを使用した。

［結果］

1. BALF 中の細胞の EGFP 発現

   MPT51 レンチウイルスを経気管投与されたマウスの BALF 中の細胞では、EGFP の発現が投与 1 週後から認められ 2 週間後にピークを迎えた。BALF 中の細胞の大部分は肺胞マクロファージであり、レンチウイルスベクターによる肺胞マクロファージ内のタンパク発現には最低 1 週間を必要とすることが示された。

2. 縦隔リンパ節における MPT51 特異的 CD8 陽性T細胞の誘導

   MPT51 24-32/H2-D^dテトラマー陽性CD8 陽性T細胞は，肺の所属リンパ節である縦隔リンパ節に免疫 2 週後に認められ、3 週後で 0.58％（CD8 陽性細胞中の比率）とピークに達した。投与 6 週間までの観察では、肺と脾臓は MPT51 特異的 T 細胞は認められなかった。

3. 肺における MPT51 特異的記憶 CD8 陽性 T 細胞の検出

   免疫 10 週後のマウスの肺と縦隔リンパ節から単核球を分離し MPT51 p24-32 ペプチドで 5 日間刺激したのち、MPT51 特異的 CD8 陽性 T 細胞を計測した。その結果、免疫マウスの肺において 2.2%と増加していたが、免疫マウスの縦隔リンパ節とナイーブマウスの肺・縦隔リンパ節には

MPT51 特異的 T 細胞は認められなかった。これはレンチウイルスの気管内投与は肺に特異的記憶 CD8 陽性 T 細胞を誘導することを示唆する。

4. 結核菌に対する防御免疫能の誘導

免疫マウスに対する結核菌の感染実験として、結核菌 H37Rv 強毒株 $1x10^4$ CFU を経気道感染させ、5 週後の臓器内菌数を計測した。MPT51 レンチウイルスで免疫されたマウスの肺では、有意差をもってコロニー数が減少した。

［考察］

この実験では、第三世代レンチウイルスベクターの抗結核 T 細胞粘膜ワクチンとしての可能性を検討した。上記の実験結果から、我々は以下の結論を出すことができた。

1. 結核菌由来主要分泌タンパクMPT51を遺伝子導入したレンチウイルスベクターの気道内投与は、縦隔リンパ節に特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導する。
2. MPT51 特異的記憶 T 細胞は肺に見られたが、縦隔リンパ節には認められなかった。
3. レンチウイルスベクターの単回の気道投与により、肺における結核菌感染防御能を誘導できた。

様々な抗結核ワクチンは、現在標準とされている BCG ワクチンを上回る効果を求めて研究されてきた。ウイルスベクターを用いた方法もその一つであり、非分裂細胞の宿主染色体内に遺伝子導入でき安定的に発現するレンチウイルスベクターの特性は、免疫記憶の導入に効果的と考えられた。また、経気道免疫というワクチンの投与経路が、経気道感染する結核菌に対してより効率の良い粘膜免疫を獲得できる可能性が示唆された。

［結論］

MPT51 を遺伝子導入した第三世代レンチウイルスベクターの気管内投与により、気道粘膜面に効率良く結核菌特異的な細胞性免疫を誘導できた。

論文審査の結果の要旨

CD8 陽性 T 細胞はクラス I 分子に抗原ペプチドを結合した抗原提示細胞と相互作用すること七より、分化・成熟する。ウイルス・細菌感染細胞の表面に発現しているクラス I 結合抗原ペプチドを認識すると、これら CD8 陽性 T 細胞はインターフェロン γ(IFN-γ)、パーフォリンなどの細胞毒性分子を放出し、あるいは Fas-Fas リガンドなどの細胞間相互作用により標的細胞を傷害する。したがって、CD8 陽性 T 細胞は結核を含む感染防御に重要な役割を果たす。結核は世界最大規模の感染症であるにもかかわらず、BCG が唯一臨床の場で用いられているワクチンである。BCG は小児には有効であるが、成人に対しては結核予防効果を示さず、新たなワクチンの開発が模索されている。有効なワクチン開発の一つの基本的ストラテジーとして、結核抗原ペプチドを認識する CD8 陽性 T 細胞の効率良い誘導があげられる。申請者は *Mycobacterium tuberculosis* の分泌抗原である MPT51 を発現する第三世代レンチウイルスベクターを経気道投与することにより、MPT51 特異的 CD8 陽性感染防御性 T 細胞の誘導をマウスで検討した。

用いられた材料、方法は適切であった。すなわち、MPT51 とオワンクラゲ緑色発光タンパクとの融合遺伝子を自己不活性化ベクタープラスミドに挿入し、293T 細胞にて第三世代レンチウイルスベクターを作

製した。遺伝子発現プラスミドベクターを気管内投与して BALB/c マウスを免疫し、MPT51 特異的 CD8 陽性 T 細胞の誘導を気管支肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織、縦隔リンパ節、脾臓で検討した。CD8 陽性細胞の検出はテトラマーアッセイと IFN-γ 産生で調べた。

得られた結果は以下の通りである。

1. ウイルスベクター単回投与 1～2 週後には、BALF 中肺胞マクロファージにオワンクラゲ緑色発光タンパクの発現を認めた。
2. ウイルスベクター単回投与 2～3 週後には、MPT51 特異的 CD8 陽性 T 細胞が縦隔リンパ節に誘導できたが、脾臓には見られなかった。
3. ウイルスベクター単回投与 10 週後には、MPT51 特異的記憶 CD8 陽性 T 細胞が肺に見られたが、縦隔リンパ節には認められなかった。
4. ウイルスベクター免疫マウスに結核菌を経気道感染させたところ、5 週後には肺内細菌数は非免疫群と比べ有意に少なかった。

これらの結果から、申請者が考案したレンチウイルスベクターワクチンを気管内投与することにより、肺における結核菌感染を防御できることが明らかとなった。現在、結核予防に関して BCG を上回る効果をもたらす実用的ワクチンの開発が望まれている。また、ワクチン接種方法として簡便で生体侵襲の少ないことが必須である。本実験の結果から、レンチウイルスベクターワクチンは肺結核を防御する粘膜免疫誘導のための新たなワクチンとなる可能性が示された。

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) 結核感染における免疫学的記憶について
2) 結核菌に対する T 細胞エピトープとそれに対する免疫反応について
3) BCG の成人肺結核に対する予防効果について
4) MPT51 の結核感染防御への関与について
5) MPT51 におけるクラスⅠ、Ⅱエピトープについて
6) 第三世代レンチウイルスベクターについて
7) レンチウイルスベクターを用いたワクチンの細胞内寄生菌感染の予防効果について
8) ウイルスベクターとくにレンチウイルスベクターの種類と安全性について
9) ワクチン作用を誘導するために必要な MPT51 特異的 CD8 細胞の血中、組織中の量的割合について
10) 第三世代レンチウイルスベクターと MPT51 タンパクを用いた免疫との有効性の比較について
11) レンチウイルスベクターを用いたワクチンのヒトでの臨床応用について

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　大西　一功　　小川　法良