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

Identification of HLA-DR4-restricted T-Cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from mycobacterium tuberculosis, using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination

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: 王, 麗欣 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/807

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　５４５号	学位授与年月日	平成２１年　３月１８日
氏　　名	王　　麗　欣		
論文題目	Identification of HLA-DR4-restricted T-Cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *mycobacterium tuberculosis*, using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination （オーバーラッピング・ペプチドスクリーニング法および DNA ワクチンを用いた結核菌主要分泌タンパク MPT51 の HLA-DR4 拘束性 T 細胞エピトープの同定）		

博士（医学） 王　麗 欣

論文題目

Identification of HLA-DR4-restricted T-Cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from *mycobacterium tuberculosis*, using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination
（オーバーラッピング・ペプチドスクリーニング法及び DNA ワクチンを用いた結核菌主要分泌タンパク MPT51 の HLA-DR4 拘束性 T 細胞エピトープの同定）

論文内容の要旨

［背景］

結核は世界の主要な感染症の一つであり、我が国においても代表的な再興感染症である。現在、抗結核ワクチンとしては BCG ワクチンが用いられているが、特に成人における感染防御効果については疑問がもたれており、より効果のあるワクチンの開発が求められている。結核菌等の細胞内寄生細菌に対する感染防御には、細胞性免疫、中でも 1 型ヘルパーT 細胞 (Th1)と細胞傷害性 T 細胞 (CTL)が重要であることが知られている。結核に対する有効なサブユニットワクチンや適切な診断法の開発には、感染防御抗原の同定、及びその抗原内のドミナント T 細胞エピトープの同定が重要である。

MPT51 は結核菌由来分泌タンパクの一つで近年その結核における診断的有用性が報告されている。これまで我々のグループは、結核菌の主な分泌タンパクである MPT51 が主要な感染防御抗原分子であることを示し、MPT51 のマウス CTL エピトープの同定、MPT51 のヒト HLA-A*0201 拘束性 CTL エピトープの同定を行ってきた。本研究ではヒト MHC クラス II 分子である HLA-DR4 拘束性ヘルパーT 細胞エピトープの同定を試みた。

［方法］

H2-A^b を欠損し代わりに HLA-DR0401 を発現する 004149-MM マウスに MPT51 DNA ワクチンを遺伝子銃で免疫した。免疫マウス脾細胞、MPT51 全体を網羅するオーバーラッピング・ペプチドの 20mer の各ペプチドで刺激し、IFN-γ の産生を指標にして抗原ペプチドを検索した。また *M. bovis* BCG 株感染マウス脾細胞でも同様に抗原ペプチドを検索した。IFN-γ 産生を誘導したペプチド領域に関し、ProPred T 細胞エピトープ予測アルゴリズムを用い Th エピトープ領域を絞り込み、かつ ELISA 法及び細胞内 IFN-γ 染色法を用い、そのペプチドの IFN-γ 誘導能を確認した。

［結果］

004149-MM マウスに MPT51 DNA を免疫した後その脾細胞をオーバーラッピング・ペプチドの各ペプチドで刺激したところ MPT51 p191-210 のみが高い IFN-γ の産生を誘導した。また *M. bovis* BCG 株感染マウス脾細胞でも同様に、MPT51 p191-210 のみが高い IFN-γ の産生を誘導した。ProPred T 細胞エピトープ予測アルゴリズムを用いた解析の結果 MPT51 p191-202 が HLA-DR4 拘束性 T 細胞エピトープであると予測された。ELISA 法及び細胞内 IFN-γ 染色により MPT51 DNA ワクチン免疫マウスの脾臓由来 CD4+ T 細胞が MPT51 p191-202 ペプチド存在下で IFN-γ を産生することを確認した。

［考察］

以上の結果は MPT51 p191-202 が HLA-DR4 拘束性ドミナント T 細胞エピトープであることを示している。このペプチド領域は、ProPred T 細胞エピトープ予測アルゴリズムで、多くの HLA-DR サブタイプにお

いて T 細胞エピトープである可能性があった。そして、我々は以前このペプチド領域が $H2\text{-}A^b$ 拘束性 T 細胞エピトープであることを報告している。以上のことより、このペプチド領域が、単一の MHC クラス II 分子のみに結合するのではなく多くの異なったサブタイプの MHC クラス II 分子に結合する「promiscuous $CD4^+$ T 細胞エピトープ」であることが示唆された。このことは、種々の HLA タイプからなる雑種集団であるヒトに対するサブユニットワクチンの成分として非常に有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

結核は世界最大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、結核抗原を認識する CD4 陽性 T 細胞及び CD8 陽性 T 細胞の効率良い誘導があげられる。CD4 陽性 T 細胞はクラス II 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により、分化・成熟する。結核菌感染細胞の表面に発現しているクラス II 結合抗原ペプチドを認識すると、CD4 陽性 T 細胞はインターフェロン γ(IFN-γ)を放出し標的細胞を障害する。申請者らのグループはこれまで、*Mycobacterium(M.) tuberculosis* の分泌抗原である MPT51 のマウス及びヒト CD8 陽性 T 細胞エピトープ、マウス CD4 陽性 T 細胞エピトープを明らかにしてきた。本研究では、ヒト HLA-DR4 発現マウスにて MPT51 特異的 CD4 陽性 T 細胞を誘導し、ヒト MHC クラス II 拘束性 MPT51 エピトープを同定した。

用いられた材料、方法は適切であった。すなわち、HLA-DR0401 発現 B6 マウスを遺伝子銃により MPT51DNA ワクチンで 4 回、あるいは *M.bovis* BCG で 2 回免疫した。MPT51 全体を網羅する 20mer の 26 個のペプチドで、各々の 10 アミノ酸残基がオーバーラップするペプチドを合成した。免疫マウス脾細胞をオーバーラッピング・ペプチドで in vitro で刺激し、IFN-γ 産生を指標として抗原ペプチドを検索した。さらに、ProPred T 細胞エピトープ予測アルゴリズムを用いて CD4 陽性 T 細胞エピトープを絞り込んだ。IFN-γ 産生は ELISA 法及び細胞内 IFN-γ 染色法を用いた。

得られた結果は以下の通りである。

1. オーバーラッピング・ペプチドのうち MPT51 p191-210 のみ、MPT51 あるいは *M.bovis* BCG 免疫脾細胞に強い IFN-γ 産生を誘導した。
2. IFN-γ 産生を誘導するペプチド最低濃度は 10^{-8}M で、産生は 10^{-5}M で最大となった。
3. ProPred T 細胞エピトープ予測アルゴリズムから MPT51p191-202 が CD4 陽性 T 細胞エピトープであることが予測された。また、多くの HLA-DR サブタイプに結合する可能性が示唆された。
4. MPT51 p191-202 は MPT51 免疫脾細胞に強い IFN-γ 産生を誘導した。

これらの結果から、MPT51p191-202 が CD4 陽性 T 細胞エピトープであること、そして多くの異なったサブタイプの MHC クラス II 分子に結合する promiscuous な T 細胞エピトープである可能性が明らかとなった。現在結核予防に関しては BCG を上回る効果が期待できるワクチンの開発が望まれている。本研究で示されたような CD4 陽性 T 細胞エピトープは、種々の HLA タイプからなるヒトに対する新たなワクチンとして有用であることを示唆した。

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) 結核菌の特徴と感染様式について
2) 結核菌感染における免疫反応について
3) T 細胞による結核菌感染細胞の障害機序について
4) 結核菌感染における Treg の役割について
5) 結核菌脂質抗原の CD1 分子による認識について
6) 結核菌に対する T 細胞エピトープとそれに対する反応について
7) 結核菌ワクチン開発について
8) MPT51 タンパクと Ag85B 複合体タンパクとの構造的類似性について
9) MPT51 の結核感染防御への関与について
10) MPT51 におけるクラス I、II 拘束性 T 細胞エピトープについて
11) MPT51 ペプチド免疫マウスにおける結核菌感染予防効果について

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　　千田 金吾