

博士(医学) Ghada Eweda Ibrahim Eweda

論文題目

Identification of murine T-cell epitopes on low-molecular-mass secretory proteins (CFP11, CFP17, and TB18.5) of *Mycobacterium tuberculosis*

(結核菌の低分子量分泌タンパク (CFP11、CFP17 及び TB18.5) のマウス T 細胞エпитープの同定)

論文の内容の要旨

[はじめに]

結核は世界の主要な感染症のひとつであり、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、及びその抗原内の優勢 (ドミナント) T 細胞エпитープの同定が必須である。抗酸菌由来の分子量約 20 kDa 以下の低分子量分泌タンパクは、主要な結核菌抗原であることが知られている。このグループに属する ESAT6、CFP10 タンパクを用いた QuantiFERON はツベルクリン反応に代わる結核菌感染の特異的検査として注目されている。本研究では、このグループに属し主要な T 細胞免疫誘導能が報告されている CFP11、CFP17 及び TB18.5 抗原タンパクについてマウス T 細胞エпитープの同定を試みた。

[方法]

BALB/c 及び C57BL/6 純系マウスに CFP11、CFP17 及び TB18.5 タンパク DNA を遺伝子銃で免疫した。免疫マウス脾細胞を、各タンパク全体を網羅する各々約 20 mer のオーバーラッピング・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。IFN- γ 産生を誘導したペプチド領域に関し、MHC 結合タンパク予測アルゴリズム (BIMAS、SYFPEITHI、及び RANKPEP) を用い T 細胞エпит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]

本研究で以下の結果を得た。

- (1) BALB/c 及び C57BL/6 純系マウスに CFP11、CFP17 及び TB18.5 タンパク 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各タンパクについて、BALB/c 及び C57BL/6 マウスで、1 つないしは連続する 2 つのペプチド領域において高い IFN- γ の産生を誘導した。
- (2) 細胞内 IFN- γ 染色法及び抗 CD4/CD8 抗体を用いた阻害実験により、BALB/c マウスにお

いては、CFP11、CFP17 及び TB18.5 タンパクに反応する T 細胞サブセットは CD8+ T 細胞であること、C57BL/6 マウスにおいては、CFP11 及び CFP17 タンパクに反応する T 細胞サブセットは CD8+ T 細胞であり、TB18.5 タンパクに反応する T 細胞サブセットは CD4+ T 細胞であることが明らかとなった。

(3) MHC クラス I 結合タンパク予測アルゴリズムを用いた解析の結果、CFP11 抗原については、BALB/c マウスで p76-84 (76-84 番目のアミノ酸領域)、C57BL/6 マウスで p64-71 のペプチド領域が MHC 結合ペプチドであることが予測された。同様に CFP17 抗原については BALB/c マウスで p62-70、C57BL/6 マウスで p113-121 のペプチド領域が、TB18.5 抗原については BALB/c マウスで p83-91 のペプチド領域が、MHC 結合ペプチドであることが予測された。

(4) ELISA 法及び ELISPOT (enzyme-linked immunospot) 法による解析により上記の各ペプチド領域の刺激で、T 細胞が有意に多量の IFN- γ を産生することを確認できた。

(5) MHC 結合実験等により、BALB/c マウスにおいては CFP11 p76-84、CFP17 p62-70、TB18.5 p83-91 がそれぞれ H2-K^d、H2-D^d、H2-K^d 拘束性 T 細胞エпитープであること、C57BL/6 マウスにおいては CFP11 p64-71、CFP17 p113-121 がそれぞれ H2-K^b、H2-D^b 拘束性 T 細胞エпитープであること、TB18.5 p1-19 が H2-A^b 拘束性 T 細胞エпитープであることが明らかとなった。

[考察]

(1) 結核菌の主要な T 細胞抗原である CFP11、CFP17 及び TB18.5 タンパクの中の優勢 (ドミナント) T 細胞エпитープは主に CD8+ T 細胞エпитープであることが判明した。これは、DNA ワクチンによる免疫が効率良く CD8+ T 細胞応答を誘導できること、及びこれらの抗原が低分子量であり 8~9 アミノ酸からなるペプチドに分解され MHC クラス I を介した抗原提示機構を引き起こしやすいことが原因であると推測された。

(2) 本研究で T 細胞エпитープが明らかになったことにより、CFP11、CFP17 及び TB18.5 タンパクの免疫原性の本態が明らかとなり、マウスを使った詳細な T 細胞応答の解析、エпитープワクチンモデルの作製が可能となった。

(3) 本研究で明らかとなった H2-K^d 拘束性 T 細胞エпитープ (CFP11 p76-84、CFP17 p62-70、TB18.5 p83-91) は日本人に多い HLA 型である HLA-A24 拘束性 T 細胞エпитープである可能性が考えられた。この点については今後の解析が必要である。

[結論]

結核菌低分子量分泌タンパクである CFP11、CFP17 及び TB18.5 タンパクのマウス T 細胞エпитープを明らかにした。BALB/c マウスでは CFP11、CFP17 及び TB18.5 タンパクで各 1 つの CD8+ T 細胞エпитープが、C57BL/6 マウスでは CFP11 及び CFP17 タンパクで各 1 つの CD8+ T 細胞エпитープが、TB18.5 タンパクで 1 つの CD4+ T 細胞エпитープの存在が明らかとなった。これらの結果は、結核菌 T 細胞抗原の解析、エпитープワクチンの開発に有用な基盤を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

結核はいまだに世界最大の感染症である。現在結核予防ワクチンとして BCG が用いられているが、小児での有効性は確立されているものの、成人における効果は評価が一定でなく新たな結核ワクチンの開発が必要とされている。申請者らは抗酸菌由来の低分子量分泌タンパクが主要な結核菌抗原であることから、このうち主要な T 細胞免疫誘導能が報告されている CFP11, CFP17 および TB18.5 抗原タンパクに対するマウス T 細胞エピトープの同定を行った。

申請者らは BALB/c マウスおよび C57BL/6 マウスを用い CFP11, CFP17 および TB18.5 タンパク DNA を遺伝子銃で免疫し、そのマウス脾細胞を各タンパクのオーバーラッピング・ペプチドで刺激し、IFN γ 産生を指標にして抗原ペプチドを検索した。各ペプチドについて T 細胞エピトープ領域を同定し、IFN γ 誘導能を確認した。

その結果、CFP11, CFP17 および TB18.5 タンパクに反応する T 細胞サブセットは BALB/c マウスでは CD8⁺T 細胞であり、C57BL/6 マウスでは前 2 者のタンパクに対しては CD8⁺T 細胞であったが、TB18.5 では CD4⁺T 細胞であった。MHC クラス I 結合ペプチドアルゴリズムを用い各ペプチドの MHC 結合ペプチドを予測し、ELISA 法および ELISPOT 法にて IFN γ 産生を確認したところ、BALB/c マウスでは各結合ペプチドが H2-K^d、H2-D^d 拘束性エピトープであること、C57BL/6 マウスでは H2-K^b、H2-D^b 拘束性エピトープである事が明らかになった。本研究で示された H2-K^d 拘束性エピトープは日本人に多い HLA-A24 拘束性 T 細胞エピトープと共通の結合モチーフを有し、低分子量分泌タンパクのヒトへの応用の可能性を示唆した。審査委員会では、申請者の研究はエピトープワクチンの開発に有用な基盤を与えるものと高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与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	大西 一功
	副査	岩下 寿秀
	副査	小川 法良