

博士(医学) 鈴木大介

論文題目

Characterization of murine T-cell epitopes on mycobacterial DNA-binding protein 1 (MDP1) using DNA vaccination

(DNA ワクチンを用いたマイコバクテリア DNA 結合タンパク 1(MDP1)上のマウス T 細胞エピトープの特徴づけ)

論文の内容の要旨

[はじめに]

結核菌に対するワクチンを開発するために、感染防御抗原および抗原上の T 細胞エピトープの同定は重要である。マイコバクテリア DNA 結合タンパク 1 (MDP1) は主要なマイコバクテリアのタンパクであり、遺伝子発現制御、増殖速度抑制、細胞壁でのミコール酸の輸送や、肺上皮細胞への接着を制御する多機能性タンパクである。また、MDP1 は感染防御抗原であることがヒトとマウスで示されている。MDP1 は新規結核ワクチンの成分として有用と考えられるため、MDP1 のマウス T 細胞エピトープの同定を行った。

[材料と方法]

pCI 発現ベクターに MDP1 遺伝子を組み込み、遺伝子銃にて BALB/c、C57BL/6、C3H/He マウスにそれぞれ免疫した。免疫は 1 μg のプラスミドを 1 週ごとに 4 回接種した。また、 10^6 集落形成単位の Bacille de Calmette et Guérin (BCG) を 2 週間隔で 2 回皮下接種を行う群を作成した。最終免疫より 4 週後に脾臓を摘出し、脾細胞浮遊液を調製した。MDP1 の全長を網羅する重複ペプチドを合成し、脾細胞 2×10^6 個あたり 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のペプチドで刺激した。48 時間後の培養上清中のインターフェロン-ガンマ (IFN- γ) を酵素結合免疫吸着法 (ELISA 法) にて測定した。さらに、抗 CD4 または抗 CD8 抗体が結合したビーズ用い、CD4 または CD8 陽性 T 細胞を脾細胞から除去し、これらをペプチドで刺激し、IFN- γ 産生細胞のサブセットを解析した。またコンピューターアルゴリズムを用いて T 細胞エピトープを推定した。推定された最小エピトープを合成し、これらのペプチドによる IFN- γ 産生誘導と、産生する T 細胞サブセットを確認した。CD8 陽性 T 細胞のエピトープに関しては主要組織適合抗原 (MHC) クラス I 分子との結合能を MHC 結合試験で検討した。

[結果]

(1) MDP1 免疫マウスを MDP1 の全長 (1-205 : N 末端を 1 として表記) を網羅する重複ペプチドで刺激し、IFN- γ 産生量を計測した。C57BL/6 マウスでは 21-40、71-90、91-110、BALB/c マウスでは 41-60、46-65、C3H/He マウスでは 41-60、111-130、141-160 のペプチドで有意 ($p < 0.05$) な IFN- γ の産生を認めた。BCG 免疫マウスでは BALB/c マウスにて、41-65 に対してのみ有意 ($p < 0.05$) な IFN- γ 産生が認められた。

(2) 脾細胞から CD4 または CD8 陽性 T 細胞を除去し、これらのペプチドで刺激をすると、

C57BL/6 マウスでは 21-40 は CD8 陽性 T 細胞除去で IFN- γ 産生量が低下し、71-90、91-110 は CD4 陽性 T 細胞除去で IFN- γ の産生が低下した。BALB/c マウスでは 41-60、46-65、C3H/He マウスでは 41-60、111-130、141-160 の刺激による IFN- γ 産生は、いずれも CD4 陽性 T 細胞を除去することで低下した。

(3) コンピューターアルゴリズムを用いて、これらのペプチド内にエピトープとして推定されるアミノ酸配列が含まれるか確認した。その結果、C57BL/6 マウスでは 21-40 に MHC クラス I 分子である H2-D^b に結合能が高いアミノ酸配列 23-31 が含まれていた。BALB/c マウスでは、41-60 と 46-65 のペプチドの重複部分 (46-60) に MHC クラス II 分子である H2-A^d に結合能が高いアミノ酸配列 52-60 が含まれていた。

(4) MDP1 で免疫した C57BL/6 ならびに BALB/c マウスの脾細胞を、新たに合成した 23-31、46-60 でそれぞれ刺激すると有意 ($p < 0.05$) な IFN- γ 産生がみられた。C57BL/6 マウスでは CD8 陽性 T 細胞除去、BALB/c マウスでは CD4 陽性 T 細胞を除去で、それぞれ、23-31 と 46-60 による IFN- γ 産生量が低下した。

(5) H2-D^b に対する 23-31 の結合能を MHC 結合試験で検討したところ、10 μ M で平均蛍光強度比が増加し、100 μ M の濃度で細胞表面に存在する全 H2-D^b の 42.5 % まで増加した。

[考察]

T 細胞は、マイコバクテリアに対する防御免疫に重要であり、MDP1 で誘導される感染防御免疫も主に T 細胞反応によると考えられる。MDP1 は DNA 依存性の免疫原性増強作用があり、CpG DNA による抗原提示細胞機能亢進がその機序として推定されている。我々は MDP1 の DNA ワクチンは MDP1 タンパクが、プラスミド骨格の CpG DNA と結合することで十分な免疫反応を誘導すると考えた。

MDP1 DNA 免疫では、7つの T 細胞エピトープを発見したが、BCG 免疫では 1つ (41-65) しか、見出せなかった。MDP1 が細胞質内、もしくは細胞壁に強固に固定されて局在しているために BCG では MDP1 が免疫反応を起こしにくいこと、また BCG は MHC クラス I 分子を介した抗原機構が働きにくいことが理由として考えられる。

C57BL/6 マウスでは、1つの CD8 陽性 T 細胞エピトープと、2つの CD4 陽性 T 細胞エピトープを発見した。23-31 は H2-D^b で提示されることがコンピューターアルゴリズムで推定され、MHC 結合試験でも確認された。H2-D^b に結合する優位なペプチド配列は 5 番目のアミノ酸がアスパラギンでイソロイシンやロイシンのような疎水性の残基を C 末端に持つと報告されている。23-31 の 5 番目のアミノ酸はアスパラギンであるが、C 末端のアミノ酸はこれに合わない。23-32 の C 末端はイソロイシンであり、このペプチドも CD8 陽性 T 細胞エピトープとして機能すると考えられる。

BALB/c マウスにおいて、46-60 が H2-A^d 依存性の CD4 陽性 T 細胞エピトープと同定された。41-60 と 46-65 のペプチドは免疫した脾細胞から IFN- γ を誘導したが 51-70 は誘導しなかった。このことから、N 末端残基の 46-50 が機能に重要であると考えた。

[結論]

我々は、MDP1 のマウス T 細胞エピトープを同定した。MDP1 はマイコバクテリアの主要なタンパクで、休眠期のマイコバクテリアでも発現している。我々は、既に急性期の結核菌の主要な結核分泌タンパクの一つである MPT51 のマウス T 細胞エピトープを報告している。MPT51 と MDP1 の T 細胞エピトープは異なるステージの結核における T 細胞反応の解析や、将来の結核ワクチンの成分として適していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

結核は世界的に深刻な感染症である。現在、結核ワクチンとして 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、新規結核ワクチンの開発が必要とされている。申請者は結核菌の主要なタンパクであり、感染防御抗原でもあるマイコバクテリア DNA 結合タンパク 1 (MDP1:205 アミノ酸) が、結核ワクチンの有用な成分と考え、MDP1 におけるマウス T 細胞エピトープの同定を行った。

申請者は C57BL/6、BALB/c および C3H/He マウスに *MDP1* 遺伝子を遺伝子銃で免疫した後、MDP1 の全長をオーバーラップする合成ペプチド (21 個) で脾細胞を刺激し、IFN γ 産生を促す MDP1 ペプチドの同定と T 細胞のサブセットを検討した。さらにコンピュータアルゴリズムを用いて、各ペプチドにおける T 細胞エピトープを同定し、エピトープペプチドによる IFN γ 産生能を確認した。

C57BL/6 マウスでは、CD8⁺T 細胞が認識する MDP1 ペプチドには MHC クラス I の H2-D^b 拘束性エピトープが含まれ、エピトープペプチドが IFN γ を産生させること及び MHC クラス I に結合することを明らかにした。また BALB/c マウスでは、CD4⁺T 細胞が認識する MDP1 ペプチドには MHC クラス II の H2-A^d 拘束性エピトープが含まれ、エピトープペプチドが IFN γ を産生させることを明らかにした。さらに C3H/He マウスでは、CD4⁺T 細胞が認識する MDP1 ペプチドには MHC クラス II の H2-E^k 拘束性エピトープが含まれ、エピトープペプチドが IFN γ を産生させることを明らかにした。以上の結果から、申請者は MDP1 における T 細胞エピトープのペプチドが MHC クラス I の H2-D^b または MHC クラス II の H2-A^d、H2-E^k を介してマウス T 細胞を活性化させ、IFN γ を産生させることを解明し、MDP1 を用いた結核ワクチンの有用性を示唆した。

審査委員会では研究方法論とデータの解釈を中心に詳細な質疑が出され、申請者は適切な回答をした。申請者の研究は新規結核ワクチンの開発に有用な基盤を与えるものと高く評価された。

論文審査担当者 主査 岩下 寿秀
副査 鈴木 哲朗 副査 千田 金吾