

博士(医学) 右藤智啓

論文題目

A novel vaccine strategy to induce mycobacterial antigen-specific Th1 responses by utilizing the C-terminal domain of Heat Shock Protein 70

(Heat Shock Protein 70 の C 末端領域を利用した結核菌抗原特異的 Th1 応答を誘導する新しいワクチンの戦略)

論文の内容の要旨

[背景と目的]

結核に対するワクチンとしては BCG が用いられているが、成人では有効性が乏しく、BCG にかわる有用なワクチンの開発が求められている。ワクチンの有効性を高めるためには、樹状細胞のような抗原提示細胞に抗原を効率よく取り込ませる必要がある。そこで本研究では樹状細胞に発現する複数の分子に対してリガンドとして機能する結核菌 Heat Shock Protein 70 (HSP70) に着目した。HSP70 はストレスタンパク質ともよばれ、分子シャペロンとして機能するとともに、CD91、CCR5、CD40、Toll-like receptor (TLR)-2、TLR-4 などのレセプターを介して抗原提示細胞を活性化し、サイトカインの分泌、抗原提示、接着を促すといわれている。Tobian らは結核菌の HSP70 に結合させた卵白アルブミン・ペプチドが CD91 を介してマウスの樹状細胞とマクロファージに取り込まれ、MHC class I によって抗原として提示されたことを報告している。また HSP70 はケモカインレセプターである CCR5 と結合することが Whittal らによりヒトの系で示されている。我々はこの結核菌 HSP70 の遺伝子を結核菌防御抗原である MPT51 の遺伝子に連結させた DNA ワクチンを作製し、その増強効果を抗原単独のものと比較検討した。

[方法]

DNA ワクチン：結核菌の HSP70 遺伝子を結核菌 H37Rv 株の genomic DNA から PCR 法によりクローニングした。哺乳類細胞発現用のベクターである pCI に HSP70 全長 (HSP70F)、ATPase domain を含む N 末側 (HSP70N)、peptide binding domain を含む C 末側 (HSP70C) の遺伝子をそれぞれ MPT51 遺伝子の 5' 側に融合させた DNA ワクチン (HSP70F-MPT51、HSP70N-MPT51、HSP70C-MPT51) を作製した。Gene gun を用いて BALB/c または C57BL/6 に 10 日毎に 3 回免疫し、最終免疫後 14 日目に脾細胞を調製し、CD8⁺T 細胞 (BALB/c) または CD4⁺T 細胞 (C57BL/6) が認識する MPT51 のエピトープペプチドで刺激した。ELISA により培養上清中の IFN- γ を定量し、MPT51 単独の DNA ワクチンと比較した。

タンパク質ワクチン：クローニングした結核菌の HSP70 遺伝子を大腸菌発現用のベクターである pRSET に挿入し、大腸菌 JM109 株を用いて発現させ、各々の融合タンパク質を作製した。それぞれ BALB/c、C57BL/6 に 10 日毎に 3 回皮下注射し、最終免疫後 14 日目に脾細胞を調製し、DNA ワクチンと同様の方法で ELISA 法を用いて IFN- γ を定量した。

[結果]

C57BL/6 を用いて確認した CD4⁺T 細胞反応では、HSP70F-MPT51 または HSP70C-MPT51 で免疫した場合(特に HSP70C-MPT51 で免疫した場合)に MPT51 単独のものより有意に高い IFN- γ 産生が誘導された。一方、HSP70N-MPT51 では IFN- γ の産生量は増加する傾向が見られたが、統計的に有意な上昇はみられなかった。また BALB/c を用いて確認した CD8⁺T 細胞反応では、いずれも IFN- γ の有意な上昇はみられなかった。それぞれの融合タンパク質で免疫した場合も同様に HSP70C-MPT51 でより強く CD4⁺T 細胞からの IFN- γ 産生が誘導された。

[考察]

我々はマウス樹状細胞が CCR5 リガンド(MIP-1 α)と結核菌抗原の融合分子を取り込むことを報告しており、HSP70 の場合も同様にして取り込まれていることが予想された。これらの抗原摂取機能の増強に加え、HSP70 は他のレセプターである CD40、TLR-2、TLR-4 などを介して、樹状細胞などの抗原提示機能を増強している可能性も考えられた。

HSP70 は大きく分けて 2 つの domain で構成されるが、どちらが免疫反応をより増強させるかについては明確に結論が出ていない。Wang らは HSP70 の C 末側でヒト単球を刺激すると、効率良く IL-12、TNF- α 、NO、CC ケモカインを産生したり、樹状細胞を成熟化させたりするが、N 末側で刺激した場合はこれらの効果がみられなかったと報告している。我々の研究でも HSP70C-MPT51 で免疫したマウスの脾細胞での iNOS mRNA 発現は MPT51 単独で免疫したものより強く、HSP70C-MPT51 が Th1 細胞をより強く誘導し、IFN- γ 、iNOS の発現を増強したものと考えられる。

[結論]

結核菌に対する防御機構としては結核菌の抗原特異的に IFN- γ を産生する Th1 細胞が重要であり、それを強く誘導する結核菌ワクチンが望ましいと考えられる。今回我々が作製した、結核菌防御抗原と結核菌 HSP70 の C 末側を融合した DNA ワクチンは抗原単独のものとは比べ、結核菌抗原特異的 Th1 細胞をより強く誘導した。

論文審査の結果の要旨

結核に対するワクチンの効率性を高めるために、抗原のみではなく他の分子を結合させたワクチンが戦略となる。申請者は、結核菌 HSP70 の遺伝子を結核菌抗原である MPT51 の遺伝子に連結させた DNA ワクチンを作製し、その結核菌に対する T 細胞性免疫反応をマウスで検討した。HSP70 を用いた理由は、この熱ショック蛋白が、抗原提示細胞上の数種の受容体 (CD91、CCR5 等) に結合し、効率性を高めるためである。

HSP70 遺伝子を結核菌株からクローニングし、HSP70 全長 (HSP70F)、N 末側 (HSP70N)、C 末側 (HSP70C)の遺伝子をそれぞれ MPT51 遺伝子上流に融合させた DNA ワクチンを作製した。Gene gun を用いて BALB/c または C57BL/6 に免疫し、脾細胞中の CD8⁺T 細胞(BALB/c)

または CD4⁺T 細胞(C57BL/6)が認識する MPT51 のエピトープペプチドで in vitro 刺激し、培養上清中の IFN- γ を定量した。タンパク質ワクチンについても、各々の融合タンパク質を作製し、同様に免疫後の特異的 T 細胞誘導性を検討した。

CD4⁺T 細胞反応では、HSP70F-MPT51 または特に HSP70C-MPT51 で免疫した場合、MPT51 単独のものより有意に抗原特異的 T 細胞が誘導された。一方、特異的 CD8⁺T 細胞は誘導されなかった。蛋白質抗原でも同様であった。

本研究により、樹状細胞が HSP70 の受容体を介して、抗原融合分子を取り込み、特異的 T 細胞を誘導することが示唆された。この DNA ワクチンは抗原単独のものとは比べ、抗原特異的 Th1 細胞をより強く誘導するため、臨床応用への道を開いたことを高く評価した。

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 戸倉 新樹
副査 大西 一功 副査 小川 法良