

学位論文題名

合成ペプチドインフルエンザワクチンの開発

—インフルエンザウイルス A/Aichi/2/68 (H3N2) ヘマグルチニンの
T細胞エピトープによるマウスの免疫誘導—

学位論文内容の要旨

I. 緒言

ヘルパーT細胞が抗原を認識し活性化するには、T細胞抗原受容体(TCR)、ペプチド抗原および主要組織適合複合体(MHC)クラスII分子よりなる、3分子複合体の形成が必要である。3分子複合体は、ペプチド抗原上のエピトープがTCRと、アグレトープがクラスII分子と結合して形成される。この際、ペプチド抗原上のアグレトープとMHCクラスII分子の結合力が、ある抗原に特異的なヘルパーT細胞の増殖反応強度を規定する。一方、B細胞が抗体産生細胞に分化成熟するには、抗原特異的なヘルパーT細胞の関与が重要であるが、ヘルパーT細胞の強い反応は、必然的にB細胞の抗体産生増強に帰結すると推測される。

著者らのこれまでの研究によって、ハトチトクロームcの43番目から58番目のアミノ酸配列よりなる合成ペプチドp43-58(AEGFSYTDANKNKGIT)において、46番目と54番目残基はアグレトープ、50番目と52番目残基はエピトープとして機能することが判明している。さらに、46番目をフェニルアラニン(F)、54番目をアラニン(A)にしたペプチド46F54Aは、I-A^b分子と強く結合すること、さらに、エピトープとアグレトープは、各々独立して機能することが証明されている。本研究においては、これらの結果に基づき、46F54Aのエピトープ部位を他の病原体由来のペプチド断片で置き換えることにより、合成ペプチドワクチンを作製し、これらがI-A^bマウスにおいて病原体特異的なヘルパーT細胞を活性化し、病原体特異的抗体反応を誘導できるか否かをin vitroおよびin vivoにて検討した。

II. 材料と方法

マウスは、静岡県実験動物農業協同組合よりC57BL/6の6週齢の雌を購入し使用した。合成ペプチドワクチン、46F/HA126-134/54A、46F/HA127-133/54A、46F/HA128-132/54A、46F/HA129-131/54Aは、インフルエンザウイルスAichi株のHAの130番目前後の、各々9個から3個のアミノ酸配列で46F54Aのエピトープ部分を置換して、固相法により作製し、レジン切除後、HPLCにて精製した。46F/HA127-133/54A(18mer)は、置換するペプチド断片のアグレトープへの影響を考慮して、46F54Aの中央の5個のアミノ酸をHA由来の7個のアミノ酸で置換して作製した。

T細胞増殖反応は、マウスの皮下にペプチドを完全フロインドアジュバント(CFA)と共に注射し、リンパ節を採取し、これら感作T細胞を免疫原または他のペプチドおよび放射線照射した抗原提示細胞と共に培養し、³H-thymidineの細胞内への取り込みを測定して検索された。

血清の特異性は、マウス腹腔内にペプチドとCFAを投与し、その後、2週間おきに2回同量のペプチドを不完全フロインドアジュバントと共に免疫し、血清を採取し、ELISAプレートに固相化したインフルエンザウイルスAichi株または各合成ペプチドに対する反応性によって検索した。

血清の中和抗体活性は、単層培養したMDCK細胞への感染阻止能によって検索された。感染抵抗性は、多層性リボソームに合成ペプチドを組み込み、マウス鼻腔に投与し、更に4週間隔で2回鼻腔に投与し、最終投与日より4日後にインフルエンザウイルスAichi株を経鼻感染させ、4日後に肺を採取し、MDCK細胞を用いたブランクアッセイにより肺内のウイルス量を定量し、判定した。

Ⅲ. 結果

1) 合成ペプチドワクチン投与によるT細胞増殖反応誘導

インフルエンザウイルスAichi株のHAの123番目から138番目よりなる合成ペプチドHA123-138は、B6マウスにおいてT細胞増殖反応を誘導できなかったのに対して、46F54Aのエピトープ部分をHA由来のペプチド断片と置換した合成ハイブリッドペプチドワクチンは、いずれも強いT細胞増殖反応を誘導した。更にこの反応は、免疫原特異的であり、ある合成ペプチドワクチンで感作されたT細胞が、*in vitro*で他の合成ペプチドワクチンによって刺激されても反応しなかった。

2) ペプチドワクチン投与により産生された抗体の特異性

HA123-138でマウスを免疫しても有効な抗体産生は認められなかったのに対し、46F/HA127-133/54A、46F/HA127-133/54A(18mer)および46F/HA128-132/54Aで免疫して得られたマウスの血清には、インフルエンザウイルスAichi株および免疫原に対して、特異的な抗体が検出された。この抗体は、病原体由来の他のペプチド断片で46F54Aのエピトープ部分を置換したペプチドとは反応しなかった。

3) ペプチドワクチンで免疫したマウス血清のインフルエンザウイルスAichi株の感染中和活性

*in vitro*での中和抗体試験の結果から、導入するペプチド断片の長さとしては、3個、5個あるいは9個では、元のインフルエンザウイルスAichi株に対する中和抗体産生が低く、7個のアミノ酸で置換した46F/HA127-133/54Aまたは46F/HA127-133/54A(18mer)が最も強い中和抗体を誘導した。

4) ペプチドワクチン投与によるインフルエンザウイルスAichi株の感染防御効果

46F/HA127-133/54A(18mer)を多層性リボソームに組み込み、マウスの鼻腔に直接投与したところ、インフルエンザウイルスAichi株の感染を防御した。

Ⅳ. 考察と結語

種々の合成ペプチドワクチンにて感作されたT細胞は、免疫原特異的な反応を示したことから、これらは全ての合成ペプチドワクチンに共通なI-A^b分子との結合モチーフではなく、置換した病原体由来のペプチドを認識していると考えられた。この結果は、病原体由来のペプチド断片をMHCクラスII分子との結合モチーフに導入することにより、病原体由来のペプチドに免疫原性を付与し、病原体特異的なヘルパーT細胞を活性化できることを示している。

更に、これらハイブリッドペプチドはヘルパーT細胞を活性化するだけでなく、ペプチド特異的抗体反応を誘導し、従って、産生された抗体も、MHCクラスII分子との結合モチーフではなく、主として導入した病原体由来のペプチド断片を認識すると考えられた。さらに、これらの抗体は、インフルエンザウイルスAichi株に特異的で、中和活性も有していた。ただし、導入するHA由来のペプチド断片のアミノ酸長により、産生された抗体の特異性に差が認められたが、これは、I-A^b分子との結合モチーフに導入することにより、実際のHAの立体構造と相違が生じたためではないかと推測された。

インフルエンザウイルスの感染防御には、局所免疫が重要と考えられている。この点を考慮して、著者は、46F/HA127-133/54A(18mer)を多層性リボソームに組み込み、マウスの鼻腔に直接投与し、有効な抗ウイルス免疫を誘導し得た。多層性リボソームは、多層性の二重の脂質膜より構成され、この中にペプチド抗原を組み込むことにより、持続的な抗原刺激が可能になることが期待された。一方、リボソームは、他のアジュバントと異なり殆ど副作用がなく、ヒトのMHCクラスII分子との結合モチーフが判明すれば、将来ヒトへの応用が可能になるのではないかと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学 位 論 文 題 名

合成ペプチドインフルエンザワクチンの開発

—インフルエンザウイルス A/Aichi/2/68 (H3N2) ヘマグルチニンの
T細胞エピトープによるマウスの免疫誘導—

I、研究目的

ハトチトクロームcの43番目から58番目のアミノ酸配列よりなる合成ペプチドp43-58において、46番目と54番目残基はアグレトープ、50番目と52番目残基はエピトープとして機能し、さらに、46番目をフェニルアラニン、54番目をアラニンにしたペプチド46F54Aは、I-A^b分子と強く結合する。著者は、これらの知見に基づき、46F54Aの中央のエピトープ部分を、インフルエンザウイルスA/Aichi/2/68(H3N2)のヘマグルチニン(HA)の130番目前後の種々のアミノ酸で置換して、合成ペプチドワクチンを作製し、これらがI-A^bマウスにおいて病原体特異的なヘルパーT細胞を活性化し、抗体産生を誘導できるか否かを検討した。

II、材料および方法

- 1) マウスは、C57BL/6の6週齢の雌を使用した。
- 2) 合成ペプチドワクチン、46F/HA126-134/54A、46F/HA127-133/54A、46F/HA128-132/54A、46F/HA129-131/54Aは、インフルエンザウイルスAichi株のHAの130番目前後の、各々9個、7個、5個、3個のアミノ酸配列で46F54Aのエピトープ部分を置換して、固相法により作製し、HPLCにて精製した。46F/HA127-133/54A(18mer)は、置換するペプチド断片のアグレトープへの影響を考慮して、46F54Aの中央の5個のアミノ酸をHA由来の7個のアミノ酸で置換して作製した。
- 3) T細胞増殖反応は、マウスの皮下にペプチドを免疫し、得られた感作T細胞を免疫原、他のペプチドおよび抗原提示細胞と共に培養し、³H-thymidineの細胞内への取り込みを測定して検索した。
- 4) 血清の特異性は、ELISAにて検索した。
- 5) 血清の中和抗体活性は、単層培養したMDCK細胞への感染阻止能によって検索した。
- 6) 感染抵抗性は、多層性リボソームに合成ペプチドを組み込み、4週間隔で3回マウス鼻腔に投与し、インフルエンザウイルスAichi株を経鼻感染させ、ブランクアッセイにより肺内のウイルス量を定量し、判定した。

Ⅲ、結果

1) 合成ペプチドワクチン投与によるT細胞増殖反応誘導：インフルエンザウイルスAichi株のHAの123番目から138番目よりなる合成ペプチドHA123-138は、B6マウスにおいてT細胞増殖反応を誘導できなかったのに対して、46F/54Aのエピトープ部分をHA由来のペプチド断片で置換した合成ハイブリッドペプチドワクチンは、いずれも強い免疫原特異的なT細胞増殖反応を誘導した。

2) ペプチドワクチン投与により産生された抗体の特異性：HA123-138でマウスを免疫しても有効な抗体産生は認められなかったのに対し、46F/HA127-133/54A、46F/HA127-133/54A(18mer)および46F/HA128-132/54Aで免疫して得られたマウスの血清には、インフルエンザウイルスAichi株および免疫原に対して、特異的な抗体が検出された。

3) ペプチドワクチンで免疫したマウス血清のインフルエンザウイルスAichi株の感染中和活性：46F/HA127-133/54Aまたは46F/HA127-133/54A(18mer)で免疫したマウスの血清は、in vitroの中和抗体試験にてインフルエンザウイルスAichi株の感染性を中和し、置換するHA由来のアミノ酸の長さとしては、7個程度が効果的と考えられた。

4) ペプチドワクチン投与によるインフルエンザウイルスAichi株の感染防御効果：46F/HA127-133/54A(18mer)を多層性リボソームに組み込み、マウスの鼻腔に直接投与したところ、インフルエンザウイルスAichi株の感染を防御した。

Ⅳ、考察および結語

1) 合成ペプチドワクチンにて感作されたT細胞は、免疫原特異的な反応を示したことから、ペプチドワクチンに共通なI-A^b分子との結合モチーフではなく、置換した病原体由来のペプチドを認識していると考えられた。この結果は、病原体由来のペプチド断片をクラスII分子との結合モチーフに導入することにより、これに免疫原性を付与し、病原体特異的なヘルパーT細胞を活性化できることを示唆している。

2) 46F/HA127-133/54Aまたは46F/HA127-133/54A(18mer)で免疫したマウスの血清には、インフルエンザウイルスAichi株に特異的な抗体が認められ、抗原特異的なヘルパーT細胞を活性化することにより、抗原特異的な抗体産生が誘導されることが示唆された。

3) in vitroの中和抗体試験の結果から、置換するHA由来のアミノ酸の長さとしては、7個程度が効果的と考えられたが、これは、I-A^b分子との結合モチーフに導入するアミノ酸長により、実際のHAの立体構造と相違が生じたためではないかと推測された。

4) インフルエンザウイルスの感染防御には、局所免疫が重要と考えられ、この点を考慮して、46F/HA127-133/54A(18mer)を多層性リボソームに組み込み、マウスの鼻腔に直接投与し、有効な抗ウイルス免疫を誘導し得た。

以上の結果より、MHCクラスII分子との結合モチーフに病原体由来のペプチド断片を組み込むことにより、これに免疫原性を付与し、新しい形のワクチン開発の可能性が示唆された。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文とし妥当なものと判断される。