

学位論文題名

ヒトクラスⅡ分子拘束性T細胞反応を誘導する
インフルエンザウイルスヘムアグルチニン由来の
ペプチドの同定

学位論文内容の要旨

緒 言

T細胞抗原受容体(TCR)、主要組織適合抗原複合体(MHC)分子、抗原ペプチドからなる三分子複合体が形成され、T細胞の抗原特異的反応が誘導される。従って、ペプチド抗原の免疫原性は、MHC分子との結合性に依存すると考えられる。

ハトチトクロームcの43から58番残基よりなるペプチド、p43-58の46と54番残基はアグレトープ(MHC結合部位)として、50と52番残基はTCRと結合するエピトープ(TCR結合部位)として機能することが判明している。またエピトープの50番残基を他のアミノ酸に置換しても、MHC分子に対する結合能には影響はない。従って、MHC分子との結合性を保ったまま、エピトープ部分のアミノ酸置換が可能ではないかと考えられた(カセットセオリー)。

これを検証するために、p43-58由来でアグレトープ残基を含むI-A^b結合性ペプチドフレームの間に、インフルエンザウイルスのヘムアグルチニン蛋白(HA)の127から133番残基よりなるペプチド断片(HA127-133)を挿入した。このハイブリッドペプチドワクチンは、I-A^bを有するマウスにおいてHA特異的T細胞反応を誘導し、インフルエンザウイルス感染に対して有効な免疫を付与することが判明した。

以上より，ヒトのMHCクラスII分子に結合するモチーフが同定されれば，ヒトで有効なペプチドワクチンが開発できると考えられた．今回，DQ6トランスジェニックマウス(DQ6tgm)を用い，HLA-DQ6結合モチーフが同定されたので報告する．

方法

T細胞増殖反応：ペプチド抗原で免疫したマウスのT細胞を，抗原提示細胞(APC)とペプチドとともに培養後， $[^3\text{H}]$ -thymidine 取り込みを測定した．

T細胞ハイブリドーマ：インフルエンザウイルスHA由来のペプチドHA123-138で免疫したDQ6tgmのT細胞をBW1100と融合した．HAT選択とクローン化後，抗原特異的T細胞ハイブリドーマDQH42-3を樹立した．ペプチドに対する反応性は，DQH42-3をペプチドおよびAPCと培養後，培養上清中のIL-2量で定量した．DQH42-3に対する各ペプチド間の競合抑制試験では，1%パラホルムアルデヒド固定同系マウス脾細胞をAPCとして用いた．

ペプチドとMHC分子の直接結合試験：DQ6トランスフェクタントとビオチン化ペプチドを共培養し，続いてphycoerythrin-conjugated streptavidin，次にビオチン化ヒツジ抗streptavidin抗体，そして再びPE-SAで染色した．

結果

DQ6拘束性HA123-138特異的T細胞反応

インフルエンザウイルスHA由来のペプチドHA123-138でDQ6tgmとB6マウスを免疫した．DQ6tgmのT細胞は，HA123-138によるin vitroの刺激に対して有意の増殖反応を生じたが，B6マウスのT細胞は極めて弱い反応しか示さなかった．DQ6tgmは，DQ6を発現している以外はB6マウスと同じ遺伝的背景を有することから，この反応はDQ6分子拘束性と考えられた．実際抗DQ6抗体を上記培養中に加えたところ，反応が著明に阻害されたことから，DQ6拘束性HA123-138特異的T細胞の存在が確かめられた．

DQ6拘束性 T 細胞ハイブリドーマ DQH42-3の反応特異性の解析

HA123-138特異的 DQ6拘束性 T 細胞ハイブリドーマ DQH42-3 は、DQ6 をトランスフェクトした L 細胞の存在下で、HA123-138により活性化されることから DQ6拘束性であることが確認された。

次に DQ6拘束性 HA123-138特異的 T 細胞反応を増強するために、カセットセオリーに基づきハイブリッドペプチドを作成した。ペプチド 46F/HA127-133/54Aは、7個のアミノ酸から成る HA127-133を p43-58由来 I-A*結合フレーム 46F50V54Aの 43-46と 54-58番残基の間に挿入して作られた。以下、数字の後のアルファベットは置換後のアミノ酸を表すようにペプチドを命名した。46F/HA127-133/54A、46D/HA127-133/54Aおよび 46R/HA127-133/54Aは DQH42-3 を全く刺激しなかった。次に 9 個のアミノ酸から成るペプチド HA126-134を同じ I-A* 結合フレームに挿入し、46F/HA126-134/54A を作成した。46F/HA126-134/54A は、免疫原の HA123-138よりも強く DQH42-3 の反応を惹起した。しかし、46R/HA126-134/54Aは、46F/HA126-134/54Aと比較して、DQH42-3に対して弱い刺激性しか示さなかった。46番残基におけるアミノ酸の置換により、DQH42-3の反応性が変化したので、この46番残基がDQ6分子への結合性に影響を与えると考えられた。

DQH42-3 T 細胞反応でのアグレトープの同定

p43-58由来の I-A*結合モチーフの 46番残基が、DQH42-3の反応においてもアグレトープとして機能していることを証明するために、競合的阻害試験を行った。DQH42-3を刺激しない 46F/HA127-133/54A、46D/HA127-133/54A および 46R/HA127-133/54Aを競合ペプチドとして、DQH42-3を 46F/HA126-134/54A で刺激する培養系に加えた。DQH42-3の反応は 46F/HA127-133/54A、46R/HA127-133/54A、および 46D/HA127-133/54Aの順に抑制された。つまり 46番残基の違いにより抑制効果に差が生じたので、マウス I-A拘束性 T 細胞反応と同様、46番残基が DQ6拘束性 T 細胞反応においてもアグレトープとして機能していることが判明した。

直接結合試験を用いたアグレトープの証明

HLA-DQ6分子に結合する際の、p43-58類似ペプチド上の46番残基のフェニルアラニン(46F)の機能を直接調べるために、p43-58類似ペプチドを用いた直接結合試験を行った。46F/HA127-133/54Aまたは46F/HA126-134/54Aと基本的には同一のアグレトープモチーフを持つ46F50E54A、46R50E54Aおよび46D50E54Aをビオチン化し、DQ6トランスフェクタントとの結合を検討した。これら3種のペプチドの中で46F50E54AがDQ6トランスフェクタントと最も強く結合し、次に46R50E54A、46D50E54Aの順であった。これらの結果から、46F50E54Aがここで調べた他の46番残基置換ペプチドに比べ、強くDQ6分子に結合すると結論された。

考察

46F/HA126-134/54Aの46番残基のフェニルアラニンが、DQ6分子と結合する際のアグレトープとして機能していることが示された。つまり、N末端より4番目のアミノ酸が、マウスにおける大部分のタイプのI-A拘束性T細胞反応と同様に、DQ6拘束性T細胞反応においてもアグレトープとして機能していた。

HLA-DR1分子とインフルエンザウイルスHAペプチドとの複合体のX線結晶解析によって、HLA-DR1の抗原結合ポケットが主として $\alpha 1$ と $\beta 1$ ドメインの両方の非極性残基($\alpha 26$, $\alpha 31$ および $\beta 86$)により囲まれていることが示されている。この知見を著者の系にあてはめてみると、本研究で明らかとなったアグレトープの46番残基のフェニルアラニンは、HLA-DQ6分子の $\alpha 26$ のスレオニン、 $\alpha 31$ のグリシン、 $\beta 86$ のバリン、またはグリシンより成るポケット内に結合していると想定される。

本研究において、ヒトMHCクラスIIトランスジェニックマウスを用い、強力なDQ6結合性アグレトープモチーフを同定した。これにより、著者らのカセットセオリーをマウスと同様ヒトにも応用できる可能性が開けた。著者は現在、DQ6^{tg}とクラスIIノックアウトマウスをかけあわせ、DQ6分子のみを発現するF2マウスを作出し、このF2マウスをカセ

ットセオリーに基づいて作成したペプチドワクチンで免疫することにより，H3サブタイプインフルエンザウイルスの感染防御が可能かどうかの *in vivo* の実験を行っている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 細 川 真澄男

学 位 論 文 題 名

ヒトクラスⅡ分子拘束性T細胞反応を誘導する インフルエンザウイルスヘムアグルチニン由来の ペプチドの同定

T細胞受容体(TCR)、主要組織適合抗原複合体(MHC) 分子、抗原ペプチドからなる三分子複合体が形成され、T細胞の抗原特異的反応が誘導される。したがって、ペプチド抗原の免疫原性は、MHC 分子との結合性に依存する。申請者は、これまでハトチトクロームcの43から58番残基よりなるペプチドp43-58の、46と54番残基はアグレトープ(MHC 結合部位)として、50と52番残基はエビトープ(TCR 結合部位)として機能することを明らかにした。またMHC 分子との結合性を保ったまま、エビトープ部位のアミノ酸置換が可能ではないかという仮説(カセットセオリー)の下に、アグレトープ残基を含むI-A^b結合性ペプチドフレームの間に、インフルエンザのヘムアグルチニン(HA)蛋白断片(HA127-133)を挿入し、I-A^bを有するマウスにおいて有効な、ハイブリッドペプチドワクチン作成に成功した。本研究においては、カセットセオリーに基づき、ヒトで有効なペプチドワクチンを開発するため、ヒトMHC の一つ、DQ6トランスジェニックマウス(DQ6tgm)を用い、HLA-DQ6 結合モチーフを同定することを目的とした。

まず、インフルエンザウイルスHA由来のペプチドHA123-138 で、DQ6tgmと、B6マウスを免疫した。DQ6tgmのT細胞は、HA123-138によるin vitroの刺激に対して有意の増殖反応を生じたが、B6マウスのT細胞は極めて弱い反応しか示さなかった。DQ6tgmは、DQ6 を発現している以外はB6マウスと同じ遺伝的背景を有することから、この反応はDQ6 分子拘束性と考えられた。実際、抗DQ6 抗体によって、この反応が阻害されたことから、DQ6 拘束性、HA123-138 特異的T細胞がDQ6tgm内に産生されたことが確かめられた。

次に、HA123-138 特異的、DQ6拘束性T細胞ハイブリドーマ、DQH42-3を樹立した。DQH42-3 は、DQ6 をトランスフェクトしたL細胞の存在下で、HA123-138 により活性化され、DQ6 拘束性であることが確認された。

次にDQ6 拘束性、HA123-138特異的T細胞反応を増強するために、カセットセオリーに基づきハイブリッドペプチドを作成した。ペプチド46F/HA127-133/54A は、HA127-133 をp43-58由来I-A^b 結合フレーム46F50V54A の43-46 と54-58 番残基の間に挿入して作られた。以下数字の後のアルファベットは、置換後のアミノ酸を表すようにペプチドを命名した。46F/HA127-133/54A、46D/HA127-133/54A、及び46R/HA127-133/54A は、DQH42-3を全く刺激しなかった。次に9個のアミノ酸から成るペプチドHA126-134を同じI-A^b 結合フレームに挿入し、46F/HA126-134/54Aを作成した。46F/HA126-134/54A は、免疫原のHA123/138よりも強く DQH42-3の反応を惹起した。しかし、46R/HA126-134/54A は、46F/HA126-134/54Aと比較して、DQH42-3 に対して弱い刺激性しか示さなかった。つまり、46番残基が、DQ6 分子への結合性に影響を与えると考えられた。そこで、この46番残基がDQH42-3 の反応においてもアグレトープとして機能していることを証明するために、競合的阻害試験を行った。DQH42-3 を刺激しない46F/HA127-133/54A、46D/HA127-133/54A、および46R/HA127-133/54A を競合ペプチドとして、DQH42-3 を46F/HA126-134/54A で刺激する培養系に加えた。DQH42-3 の反応は、46F/HA127-133/54A、46R/HA127-133/54A、次に46D/HA127-133/54A の順に抑制された。従って、マウスI-A 拘束性T細胞反応と同様、46番残基がDQ6 拘束性T細胞反応においてもアグレトープとして機能していることが判明した。このことはp43-58類似ペプチドを用いた直接結合試験によって確認された。つまり、p43-58アナログペプチド上の46番残基のフェニルアラニン（F）が、調べた範囲ではDQ6 分子に最も強く結合するモチーフと結論された。

口頭発表に際し、細川教授より感染予防実験の進行状況、ワクチンの有効なインフルエンザのタイプについて、皆川教授より誘導される液性免疫と細胞性免疫、またサイトカインの役割について、有川教授より中和抗体の有無、特異性について、柿沼教授よりメモリーリンパ球の誘導について、御質問があったが、申請者は大旨適切に解答した。なお皆川教授、細川教授より個別に御審査いただき、合格と判定された。

以上本研究は、ヒトMHC の一つDQ6 結合性モチーフを同定し、このモチーフはヒトで有効なペプチドワクチン作成に重要な基礎データとなると考えられた。よって博士（医学）に値すると判定した。