

学 位 論 文 題 名

DQ6 マウスにおける H3-H3 ペプチドワクチン

のインフルエンザ感染抑制能の検討

学位論文内容の要旨

【目的】 ヘルパーT細胞が抗原を認識し反応するためには、T細胞抗原受容体(TCR)、主要組織適合抗原複合体(MHC)クラス II 分子、抗原ペプチド断片よりなる三分子複合体の形成が必要である。従って免疫系を活性化するためには、少なくともペプチド抗原と MHC 分子との結合性が高くなければならないことになる。そこで、ペプチド抗原と MHC 分子との結合性を高め、T 細胞に対する抗原性を増強させる方法としてカセットセオリーが考案された。

先に我々は、このカセットセオリーに基づいて作製されたインフルエンザウイルス A/Aichi/2/68(H3N2)に対するペプチドワクチン 46F/HA127-133/54A(18mer)が、A^bマウスにおいてインフルエンザウイルスの感染を抑制することを報告した。今回は、このペプチドワクチンが他のウイルス株に対しても有効であるかを検討した。また、46F/HA127-133/54A(18mer)の C 端にさらに HA127-133 をつないだペプチドワクチン H3-H3 を新たに作製し、その効果を検討した。また、我々のペプチドワクチンには種々の MHC クラス II と結合するスーパーモチーフが含まれることが判明したので、MHC クラス II 分子としてヒト HLA-DQ6 分子のみを発現している DQ6 マウスを新たに作製し、このマウスをヒトのモデルとして使用することにより、ペプチドワクチンのヒトへの応用の可能性を検討した。

【材料と方法】 マウス；DQ6 マウスは、HLA-DQ6 (DQA1*0103, DQB1*0601) トランスジェニック (Tg) マウスと、MHC クラス II ノックアウト (KO) マウスを交配して作製した。ペプチド；ペプチドは自動ペプチド合成機 430A を用いて合成した。Phenyl acetamidomethyl resin を TFMSA で切断後、Vydac C18 カラムを用い、HPLC にて 95%以上の純度に精製した。ペプチドのアミノ酸構成は、JMS-HX110 (JEOL) による質量分析で確認した。中和試験；ペプチド抗原 (50nmol) とフロインドの完全アジュバント (CFA) を 1:1 の比率で混合してエマルジョンを作製し、マウス腹腔内に 3 週毎に 3 回投与した。その後採取した抗血清とウイルス (50 プラーク/ウェル前後に調整) を混和し、37°C で 1 時間静置後、24 穴プレートに単層培養した MDCK 細胞へ接種し、37°C で 48 時間培養、固定・染色後にウェル中のプラーク数を計測し、その 50%感染阻止能で抗体価を判定した。T 細胞増殖反応試験；マウスの四肢皮下にペプチド抗原 (20nmol) と CFA の混合エマルジョンを免疫し、10 日後に採取した所属リンパ節細胞をナイロンウールカラムを通し回収した T 細胞画分 (4x10⁵/ウェル) を、同系マウスの脾臓細胞から得た抗原提示細胞 (APC) (1x10⁵/ウェル) と階段希釈したペプチドとともに 37°C・72 時間培養した。その後 [³H]-thymidine を加え (18.5kBq/

ウェル) 更に 16 時間培養後, その取り込みを Direct beta counter MATRIX 96 で計測した. フローサイトメトリー; 末梢血リンパ球をビオチン化 Y3P (抗 H-2A^b) と 4°C で 30 分反応後, r-phycoerythrin (PE)-streptavidin (SA) と 4°C で 30 分反応させたものと, 末梢血リンパ球を fluorescein isothiocyanate (FITC)-抗ヒト HLA-DQ と 4°C で 30 分反応させたものとを FACSscan® で解析した. 感染実験; 多層性リポソームに組み込んだペプチドをマウス鼻腔より 4 週毎に 3 回投与した後, 適当な日数で鼻腔よりインフルエンザウイルス (A/Aichi/2/68, 6x10³PFU) を投与した. その 4 日後に採取した肺をホモジェナイズした上清を 24 ウェルプレートに単相培養した MDCK 細胞に接種し, 37°C・48 時間培養後固定・染色後, ウェル中のプラークを計測・比較した. 直接結合試験; ヒト EBV リンパ芽球様細胞株である KT12 および EBWa より, それぞれ HLA-DR9 (DRB1*0901) および HLA-DR4 (DRB1*0405) を精製し, これらの分子とビオチン化 DR9 結合性ペプチド (ANDGATGWVASMSSAY) および ビオチン化 DR4 結合性ペプチド (GSTVFDNLPNPEIDGDYYGW) をそれぞれ結合阻害する非ビオチン化ペプチドとともに 48 時間室温で反応させた. その後, 抗 DR 抗体を結合させたプレート, さらに streptavidin-alkaline phosphatase と反応させ, p-nitrophenolphosphate を加えて発色後, 405nm の吸光度を測定し, その値よりペプチドと HLA-DR 分子との結合性を算出した.

【結果と考察】今回, これまで用いてきた 46F/HA127-133/54A(18mer)が, H3 インフルエンザウイルスの他の変異株にも有効であるかどうかを検討した. 以前の実験から, 46F/HA127-133/54A(18mer)で誘導した抗体は, 主として中央部分に挿入した HA127-133 を認識し, ウイルスを中和することが判明している. インフルエンザウイルス A/Texas/1/77(H3N2)はヘムアグルチニン(HA)の 127-133 番残基のアミノ酸配列が A/Aichi/2/68 と同一であるので, ペプチドワクチン 46F/HA127-133/54A(18mer)で A^b マウスを免疫して誘導した抗体は A/Texas/1/77 ウイルスを in vitro において中和するのではないかと考えた. 実際この抗体は, A/Texas/1/77 を in vitro で中和した (50%中和価=64 倍). また, インフルエンザウイルス A/Philippines/2/82(H3N2), A/Hokkaido/20/89(H3N2)は, ヘムアグルチニン(HA)の 127-133 番残基のアミノ酸配列が A/Aichi/2/68 とは 133 番残基の 1 残基が異なるが, ペプチドワクチン 46F/HA127-133/54A(18mer)で誘導した抗体は, これらのウイルスも in vitro において中和した (50%中和価=32 倍). さらに, インフルエンザウイルス A/Memphis/1/94(H3N2)は 1994 年に分離された株であり, ヘムアグルチニン(HA)の 127-133 番残基のアミノ酸配列が A/Aichi/2/68 とは 131-133 番残基の 3 残基が異なるが, このウイルスも, 46F/HA127-133/54A(18mer)で誘導した抗体は, in vitro において中和することが判明した (50%中和価=128 倍). 従って, ペプチドワクチン 46F/HA127-133/54A(18mer)は, その流行年度に関係なく, ほとんどすべての H3 サブタイプ (香港風邪) に有効である可能性が示唆された.

次に, HLA-DQ6 Tg マウスとクラス II KO マウスを掛け合わせ, MHC クラス II として HLA-DQ6 分子のみを発現する DQ6 マウスを新たに作製し, これをヒトのモデルマウスとして使用した. また, ペプチドワクチンの抗体産生を増強する目的から, 46F/HA127-133/54A(18mer)の C 端に, ヘムアグルチニン(HA)の 127-133 番残基を結合させたペプチドワクチン H3-H3 も作製した. リポソームに組み込んだ H3-H3 を鼻腔より投与し, DQ6 マウスにおける感染抑制能を検討した. 最終免疫より 1 週後に A/Aichi/2/68 ウイルスを感染させた場合, リポソーム単独投与群に比べてペプチドワクチンを組み込んだリポソームを投与したマウスにおいては, 有意にウイルスの感染抑制が認められた. さらに, 最終免疫より 3 週後に A/Aichi/2/68 を感染させた時にも, H3-H3 は感染を防ぐことが判明した. H3-H3 が DQ6 マウスにおいて比較的長期間, 感染を抑制したことから, このペプチドワクチンが

HLA-DQ6 陽性のヒトにおいても使用できる可能性が示唆された。

このペプチドワクチンと HLA-DQ6 以外の HLA クラス II 分子との結合性を，精製した HLA クラス II 分子との間の直接結合試験で調べたところ，HLA-DR4 (DRB1*0405)，HLA-DR9 (DRB1*0901) に対して結合性を示した．HLA-DQ6, HLA-DRB1*0405, HLA-DRB1*0901 の日本人における発現頻度を調べると，これらのいずれかを持つヒトは日本人全体の約 72%を占めることが判明している．従って，H3-H3 ペプチドワクチンは，大部分の日本人に対して有効であろうと考えられた．

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

DQ6 マウスにおける H3-H3 ペプチドワクチン のインフルエンザ感染抑制能の検討

ヘルパーT細胞が抗原を認識し反応するためには、T細胞抗原受容体(TCR)、主要組織適合抗原複合体(MHC)クラスII分子、抗原ペプチド断片よりなる三分子複合体の形成が必要である。本研究では、ペプチド抗原とMHC分子との結合性を高め、T細胞に対する抗原性を増強させることにより、インフルエンザウイルス A/Aichi/2/68(H3N2)に有効なペプチドワクチンを作成した。そしてこのワクチン 46F/HA127-133/54A(18mer)が、他のウイルス株に対しても有効であるかを検討した。また、今回用いたペプチドワクチンには種々の MHC クラスII と結合するスーパーモチーフが含まれることが判明したので、MHC クラスII 分子としてヒト HLA-DQ6 分子のみを発現している DQ6 マウスを新たに作製し、このマウスをヒトのモデルとして使用することにより、46F/HA127-133/54A(18mer)と新たに作成した H3-H3 ペプチドワクチンのヒトへの応用の可能性を検討した。

46F/HA127-133/54A(18mer)で A^b マウスに誘導した抗体は、主として中央部分に挿入した HA127-133 を認識し、ウイルスを中和することが判明している。ペプチドワクチン 46F/HA127-133/54A(18mer)とフロインドの完全アジュバントで A^b マウスを免疫して誘導した抗体は、ウイルスプラークアッセイにより、HA127-133 番残基のアミノ酸配列が A/Aichi/2/68 と同一である A/Texas/1/77 を *in vitro* で中和することが判明した。また、HA127-133 の 133 番残基のみが A/Aichi/2/68 と異なる A/Philippines/2/82(H3N2)、A/Hokkaido/20/89(H3N2)も *in vitro* において中和した。さらに、A/Memphis/1/94(H3N2)は 1994 年に分離された株であり、A/Aichi/2/68 とは HA127-133 の 131-133 番残基が異なるが、46F/HA127-133/54A(18mer)で誘導した抗体は、このウイルスも *in vitro* において中和することが判明した。従って、ペプチドワクチン 46F/HA127-133/54A(18mer)は、その流行年度に関係なく、ほとんどすべての H3 サブタイプ（香港風邪）に有効である可能性が示唆された。

次に、HLA-DQ6 トランスジェニックマウスとクラスII ノックアウトマウスを掛け合わせ、MHC クラスII として HLA-DQ6 分子のみを発現する DQ6 マウスを新たに作製し、これをヒトのモデルとして使用した。ペプチドワクチンの抗体産生を増強させるため、46F/HA127-133/54A(18mer)の C 端に、HA127-133 番残基を結合させた H3-H3 ワクチンを作製し、リポソームに組み込み、鼻腔より投与して、DQ6 マウスにおける感染抑制能を検討した。最終

免疫より 1 週後に A/Aichi/2/68 ウイルスを感染させた場合、ペプチドワクチンを投与したマウスにおいては、有意にウイルスの感染抑制が認められ、この効果は 3 週間持続した。H3-H3 が DQ6 マウスにおいて比較的長期間、感染を抑制したことから、HLA-DQ6 陽性のヒトにおいても使用できる可能性が示唆された。

このペプチドワクチンと HLA-DQ6 以外の HLA クラス II 分子 (HLA-DR4、HLA-DR9) との結合性を、精製した HLA クラス II 分子とビオチン化 DR4 結合性ペプチドまたはビオチン化 DR9 結合性ペプチドを用いた、結合抑制試験で調べたところ、HLA-DR4、HLA-DR9 に対して結合性を示した。HLA-DQ6、HLA-DR4、HLA-DR9 陽性者の頻度は、日本人の約 72% を占めることが判明している。従って、H3-H3 ペプチドワクチンは、大部分の日本人に対して有効と考えられた。

公開発表後に副査の細川、皆川教授より DQ6 マウス T 細胞の MHC 拘束性、多種のペプチドに対するカセットセオリーの応用、スーパーモチーフの構造的問題、ペプチドによるトレランス誘導、中和抗体の効果、MHC に結合するペプチドの生物活性、サイトカインによる Th1、Th2 反応の修飾、アジュバントの違い等について、ついで主査の小野江より、ペプチドワクチンの構造、粘膜における IgA 産生について質問があったが、申請者は大概妥当な回答をなし得た。

本論文は変異によってワクチン効果より免れるインフルエンザウイルスの保存されたアミノ酸配列をペプチドワクチンに導入することにより、多種のインフルエンザウイルス株に有効なワクチン作成に成功し、さらにこのワクチンがヒトにも応用されることを示唆した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。