

博士（医 学） 増 田 満

学 位 論 文 題 名

Oral Immunization with Simian Immunodeficiency Virus p55gag and Cholera Toxin Elicits Both Mucosal IgA and Systemic IgG Immune Responses in Nonhuman Primates.

(サル免疫不全ウィルス p55gag 蛋白とコレラ毒素による経口免疫  
はサルに粘膜型 IgA と全身型 IgG の免疫反応を誘導する)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

現在、全世界で600～800万人がヒト免疫不全ウィルス（HIV）に罹患しており治療薬の開発が進んでいるが、多くの後天性免疫不全（AIDS）患者が未感染者への感染源になっているのもまた事実である。さらにHIVの感染は主に同性・異性間の性交渉で経粘膜的に生じることを考えても、これ以上感染を広げないためにHIVに対する経粘膜ワクチンの開発が急務であるといえる。AIDSの研究・ワクチン開発のために、アカゲザル/サル免疫不全ウィルス（SIV）感染系がAIDS動物モデルとして広く用いられている。これまでに、SIV不活化ワクチンをアカゲザルに筋肉内投与・経口投与そして経気管内投与をすることでSIV感染を予防できたという報告や、SIV関連蛋白であるgp120とp27をアカゲザルの鼠径リンパ節に直接投与するterget lymph node (TLN)免疫法で粘膜に有効な抗原特異的S-IgAを誘導でき、かつ感染を予防できたという報告がある。しかし、細胞生物学的・分子生物学的検討が十分ではないのが現状である。

さて、ワクチン抗原を単独で経口免疫しても、高レベルの抗原特異的免疫グロブリンを誘導することは期待できない。そこで、抗原と共に投与すると宿主の免疫応答を非特異的に高める物質（アジュバント）が必要になってくる。コレラ毒素（CT）は、コレラ菌によって產生される毒素であり、ヒトの腸管に作用すると重症の下痢を引き起こす反面、有効な粘膜アジュバントとして現在最も期待されている。我々は以前に破傷風類毒素（TT）をCTと共にマウスに経口投与し、TT特異的血清IgGと分泌型IgAが誘導され、さらにTT特異的なIL-4、IL-5、IL-6を產生するTh2型CD4<sup>+</sup>T細胞応答が誘導されることを証明した。現在、遺伝子工学により作製された無毒性の変異型CTを用いてヒトへの応用を検討しているところである。

今回、我々はSIV関連抗原としてp55gag (p55) を、粘膜アジュバントとしてCTを選択し、この混合ワクチンをアカゲザルに経口投与した。そして、抗原特異的な粘膜及び全身免疫系の反応、即ち抗原特異的IgG及びIgA反応、さらに抗体反応を誘導するのに重要なヘルパーT細胞反応について詳細に検討した。

実験には5匹のアカゲザルのメスが用いられ、3群に分けて1ヶ月毎に3回経口ワクチンが投与された。No.25754とNo.26040の2匹は250μgのp55と50μgのCTが経口投与され

(少量p55・CT併用群)、No.26208とNo.26898の2匹は1mgのp55と50μgのCTが経口投与された(大量p55・CT併用群)。残りのアカゲザル(No.25785)には1mgのp55のみが経口投与され、CTは投与されなかった(p55単独投与群)。

血清中のp55特異的IgGに関しては、p55単独投与群に比べてCT併用群ではp55の投与量に関係なく高値を示した。一方、血清中のp55特異的IgAは、大量p55・CT併用群において初回免疫の7日後から高値でかつその後持続したが、少量p55・CT併用群及びp55単独投与群では低値を示した( $P<0.05$ )。当然のことながら、血清中のCT特異的免疫グロブリンはCT併用群において高値を示した。興味深いことに、アカゲザルでは50μgのCTは下痢などの消化器症状を引き起こさなかった。さらにp55投与量に関わらず、CT併用群において直腸洗浄液、膣洗浄液及び唾液などの外分泌液中にも高レベルのp55特異的免疫グロブリンが認められた。特に直腸洗浄液と唾液中にp55特異的IgAが誘導され、膣洗浄液中にはp55特異的IgAの代わりにp55特異的IgGが認められた。HIV感染患者の膣洗浄液中にはHIV特異的IgGがIgAよりも優位に存在しているという報告や、アカゲザルに有効なワクチン投与が行われた際に、膣洗浄液中に抗原特異的IgGが産生されたという報告があり、ヒトやアカゲザルの子宮頸管における粘膜免疫の主体はIgGである可能性がある。また、p55単独投与群では、いずれの外分泌液中にもp55特異的免疫グロブリンは誘導されなかった。つまりこの結果は、粘膜アジュバントとしてCTを用いた確実な抗原量で経口免疫をすることで、粘膜系と全身系両方の免疫機構に抗原特異的な免疫反応を誘導できることを強く示唆している。

次にp55・CT併用群の血液から分離した末梢血单核球(PBMC)をp55によって4日間刺激培養し、p55特異的なT細胞に関して検討した。 $[^3\text{H}]$ サイミジンを用いたT細胞増殖試験で、p55刺激群のPBMCは、無刺激群に比して約10倍の $[^3\text{H}]$ サイミジンの取り込みをみた。これは、大量p55・CT併用群において、少量p55・CT併用群及びp55単独投与群よりも顕著であった( $P<0.01$ )。

最後に、このT細胞から產生されるp55特異的なTh1及びTh2型サイトカインについて検討した。CT併用群のPBMCをp55で刺激したところ、培養上清中にIFN- $\gamma$ (Th1型サイトカイン)とIL-10(レベル2Th2型サイトカイン)を产生していたが、IL-4(レベル1Th2型サイトカイン)の产生は認められなかった。さらに細胞レベルで検討するため、CT併用群のPBMCをp55で刺激した後、FACSにてCD4 $^+$ T細胞に分離し、それらの細胞からのTh1及びTh2型サイトカイン产生パターンを解析した。サイトカイン特異的ELISPOTにて、IFN- $\gamma$ 产生CD4 $^+$ T細胞が多数認められたが、IL-4产生CD4 $^+$ T細胞は少なかった。また、同じCD4 $^+$ T細胞からRNAを抽出し、サイトカイン特異的RT-PCRを用いてmRNAレベルで解析した。p55特異的CD4 $^+$ T細胞から产生されるサイトカインのmRNAは、IFN- $\gamma$ とIL-6・IL-10(レベル2Th2型サイトカイン)であり、やはりIL-4は認められなかった。尚、少量p55・CT併用群では初回免疫後7日でIFN- $\gamma$ が誘導され、28日後にTh2型サイトカインの产生が増強していたが、一方、大量p55・CT併用群では早期からTh2型サイトカインが产生される傾向があった。これは血清中のp55特異的IgAの出現と相関しており、大量p55・CT併用群における抗原量がワクチン投与後早期から有効な細胞性免疫と体液性免疫を誘導する至適量と考えられた。

CTを併用したSIV抗原経口免疫で、分泌型IgAの誘導に不可欠なTh2細胞だけでなく、ウィルス排除に欠かせない細胞性免疫を主導するTh1型細胞が誘導されるという事実は、AIDSに対する経口ワクチンの開発を考える際に非常に重要なポイントである。IFN- $\gamma$ がIL-4を抑制することは良く知られており、このことはアカゲザルにCTをアジュ

バントとしてSIV抗原を経口免疫した際に、細胞性免疫を誘導するTh1型サイトカインがまず産生され、そのTh1優位の環境下で有効に粘膜にIgAを誘導するために、選択的なレベル2Th2型サイトカインの産生が行われていることを示唆している。AIDSの予防には粘膜局所における免疫反応と全身の免疫反応の誘導が、そして細胞性免疫と体液性免疫の両方の賦活が重要であり、まさしく二段構えのAIDSに対する防御バリアーが、CTを粘膜アジュバントとした経口ワクチンに期待されている。

## 学位論文審査の要旨

主査教授 小林邦彦

副査教授 吉木敬

副査教授 小池隆夫

### 学位論文題名

Oral Immunization with Simian Immunodeficiency Virus p55gag and Cholera Toxin Elicits Both Mucosal IgA and Systemic IgG Immune Responses in Nonhuman Primates.

(サル免疫不全ウィルス p55gag 蛋白とコレラ毒素による経口免疫  
はサルに粘膜型 IgA と全身型 IgG の免疫反応を誘導する)

現在、全世界で600～800万人のヒト免疫不全ウィルス(HIV)感染症があり、治療薬の開発も進んでいるが、未だ多くの後天性免疫不全(AIDS)患者が未感染者への感染源になっている。HIVの感染は主に同性・異性間の性交渉で経粘膜的に生じることを考えると、感染の防止にはHIVに対する粘膜防御反応を惹起するワクチンの開発が急務である。AIDSの研究やワクチン開発のために、アカゲザル / サル免疫不全ウィルス(SIV)感染系がAIDS動物モデルとして広く用いられている。これまで、SIV不活化ワクチンをアカゲザルに筋肉内投与や経口投与、または経気管内投与などでSIV感染を予防できたという報告や、SIV関連蛋白であるgp120とp27をアカゲザルの鼠径リンパ節に直接投与するtarget lymph node (TLN)免疫法で粘膜に有効な抗原特異的S-IgAを誘導でき、かつ感染を予防できたという報告があるが、細胞生物学的・分子生物学的検討が十分ではない。申請者は経口ワクチンの開発の基礎的検討のため、アカゲザルにサル免疫不全症ウイルスp55gag蛋白とアジュバントとしてコレラ毒素(CT)を経口免疫し、抗原特異的な粘膜及び全身免疫系の反応、さらに抗体反応に関わるヘルパーT細胞反応について詳細に検討した。

5匹のアカゲザルのメスを用い、3群に分けて1ヶ月毎に3回経口ワクチンを投与した。No.25754とNo.26040の2匹は250μgのp55と50μgのCTの経口投与(少量p55・CT併用群)、No.26208とNo.26898の2匹は1mgのp55と50μgのCTが経口投与(大量p55・CT併用群)、残りのNo.25785は1mgのp55のみを経口投与(p55単独投群)した。

血清のp55特異的IgGは、p55単独投与群に比べてCT併用群ではp55の投与量に関係なく高値を示した。一方、血清のp55特異的IgAは、大量p55・CT併用群で初回免疫7日後から高値でかつ持続したが、少量p55・CT併用群及びp55単独投与群では低値を示した( $P<0.05$ )。なお、50μgのCTは下痢などの消化器症状を引き起こさなかった。p55投与量に関わらず、CT併用群において直腸洗浄液、膣洗浄液及び唾液などの外分泌液中にも高レベルのp55特異的免疫グロブリンが認められた。特に直腸洗浄液と唾液中にp55特異的

IgAが誘導され、膣洗浄液中にはp55特異的IgAの代わりにp55特異的IgGが認められた。HIV感染患者の膣洗浄液中にはHIV特異的IgGがIgAよりも優位に存在しているという報告や、アカゲザルに有効なワクチン投与が行われた際に、膣洗浄液中に抗原特異的IgGを認めるという報告があり、ヒトやアカゲザルの子宮頸管における粘膜免疫の主体はIgGである可能性がある。また、p55単独投与群では、いずれの外分泌液中にもp55特異的免疫グロブリンは誘導されなかった。以上から、粘膜アジュバントとしてCTを用い、的確な抗原量で経口免疫をすることで粘膜系と全身系両方の免疫機構に抗原特異的な免疫反応を誘導できることが強く示唆された。次に、p55/CT併用群の末梢血単核(PBMC)をp55で4日間刺激培養したところ、無刺激群に比して約10倍の[<sup>3</sup>H]サイミジンの取り込みをみた。これは、大量p55・CT併用群において、少量p55・CT併用群及びp55単独投与群よりも顕著であった( $P<0.01$ )。さらに、このT細胞から產生されるTh1及びTh2型サイトカインに関して検討したところ、CT併用群のPBMCはp55刺激により培養上清中にIFN- $\gamma$ (Th1型サイトカイン)とIL-10(レベル2Th2型サイトカイン)を產生したが、IL-4(レベル1Th2型サイトカイン)の產生は認めなかった。次に、CT併用群のPBMCをp55刺激後、FACSにてCD4 $^{+}$ T細胞に分離し、それらの細胞からのTh1及びTh2型サイトカイン產生パターンを解析した。サイトカイン特異的ELISPOTにて、IFN- $\gamma$ 產生CD4 $^{+}$ T細胞が多数認められたが、IL-4產生CD4 $^{+}$ T細胞は少なかった。また、同じCD4 $^{+}$ T細胞からRNAを抽出し、サイトカイン特異的RT-PCRを用いてmRNAレベルで解析した。p55特異的CD4 $^{+}$ T細胞から產生されるサイトカインのmRNAは、IFN- $\gamma$ とIL-6、IL-10(レベル2Th2型サイトカイン)であり、IL-4は認められなかった。尚、少量p55・CT併用群では初回免疫後7日でIFN- $\gamma$ が誘導され、28日後にTh2型サイトカインの產生が増強していたが、大量p55・CT併用群では早期からTh2型サイトカインが產生される傾向があった。これは血清中のp55特異的IgAの出現と相関しており、大量p55・CT併用群における抗原量がワクチン投与後早期から有効な細胞性免疫と体液性免疫を誘導する至適量と考えられた。

CTを併用したSIV抗原の経口免疫で、分泌型IgAの誘導に不可欠なTh2細胞だけでなく、ウィルス排除に欠かせない細胞性免疫を主導するTh1型細胞が誘導されるという事実は、AIDSに対する経口ワクチンの開発を考える際に非常に重要なポイントである。IFN- $\gamma$ がIL-4を抑制することは良く知られている。このことからアカゲザルにCTをアジュバントとしてSIV抗原を経口免疫した際は、細胞性免疫を誘導するTh1型サイトカインがまず產生され、そのTh1優位の環境下で有効に粘膜にIgAを誘導するために、選択的なレベル2Th2型サイトカインの產生が行われることが示唆される。AIDSの予防には粘膜局所における免疫反応と全身の免疫反応の誘導が、さらに細胞性免疫と体液性免疫の両方の賦活が重要であり、まさしく二段構えのAIDSに対する防御バリアー発現作用が、CTを粘膜アジュバントとした経口ワクチンに存在すると考えられる。

公開発表に際し、副査の吉木教授から、他のワクチン法でのデータとの違いについて、直腸と膣に於ける免疫反応の差の理由、使用した抗原の選択理由、感染防御の効果の有無などについて、副査の小池教授から、免疫経路の違いにおける血清型IgG抗体产生の差、粘膜の抗体量と感染防御の関係、レベル2Th2細胞の粘膜特異性、メモリーの有無、経口トレランスとの関係、安全なアジュバント開発などについて、主査の小林教授から粘膜免疫の持続期間、膣粘膜の免疫反応とホルモンの関係などについて質問があつたが、申請者は何れに対しても豊富な知識と実験結果から妥当な回答を行った。

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