

学位論文題名

マクロファージ遊走阻止因子を標的にした DNA ワクチン

—関節リウマチの新規治療法に関する基礎的研究—

学位論文内容の要旨

内容の要旨

【目的】マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、近年、関節リウマチ(RA)を含むさまざまな炎症性疾患におけるメディエータとして注目を浴びている。RA患者の関節液中ではMIFが上昇すること、また、滑膜でのMIFの発現とMIF遺伝子上流のプロモータ領域に認められる遺伝子多型はRAの疾患重篤性と密接に関連することが知られている。サイトカインに対する抗体は抗サイトカイン療法として臨床応用され、RAやクローン病など難治性の炎症性疾患の治療で大きな成果をあげている。MIFに対する抗体についてもこれまでげっ歯類動物のRAモデルにおいて抗MIFモノクローナル抗体がこれらの炎症を顕著に抑制することが報告されている。しかし臨床的なモノクローナル抗体の使用は、1)生産コストが高い、2)継続的な投与が必要、3)抗体のヒト化、などから制約される。これらの問題を克服する一つの方法として、今回、自己抗体を誘導する能動免疫を基盤にしたワクチンによる新規治療法の開発を試みた。従来生体は通常自己成分に対して免疫寛容にあり抗体産生は起こらないとされている。本研究ではマウスMIFに破傷風毒素(TTX)のヘルパーT(Th)エピトープを組み込み、この変異MIFが生体内で抗MIF自己抗体の産生を誘導する方法を開発した。

【材料と方法】免疫学的に活性のあるMIF抗原を作成するため、第2ループ領域をTTX(破傷風毒素)のThエピトープの配列に置換した。マウスMIFの第2ループをコードする領域、則ちアミノ酸32-37(GKPAQY)、を取り除いてここにEcoRIサイトを導入し、このサイトにEcoRI認識配列を両端に持つTTXのcDNAを挿入した。このpMIF/TTX DNAワクチンをIn vivoでエレクトロポレーション法によりBalb/cマウスの前頸骨筋に投与した。DNAワクチンを接種したマウスにおいて抗MIF抗体の産生が誘導されているかどうかを調べるため、抗MIF抗体の抗体価を直接ELISA法により評価した。また産生された抗MIF抗体の抗原特異性を競合的ELISA法にて評価した。マウス内で産生された抗MIF抗体がLPSの静脈注射の後、血清中のTNF- α の上昇を抑制する効果があるかをマウスTNF- α ELISAキットを用いて測定した。DNAワクチンを投与した抗型コラーゲン抗体誘導関節炎マウス(CAIA)およびインターロイキン(IL)-1受容体阻害因子欠損(IL-1Ra欠損)マウスにおいて、自己免疫関節炎の発症が抑制されるかを、関節炎の発症率、MIF抗体価、関節炎スコア、肢の腫脹により調べた。

【結果】マウスMIFの第2ループ領域をTTXの外来性Thエピトープで置換したDNAワクチンを作製した。第2ループ領域置換は他のループに比べて三量体MIF複合体の4次構造と抗原性にあまり影響しないと考えられたからである。pMIF/TTX DNAワクチンが正常なMIFを認識するポリクローナル抗体を誘導するか否かを調べたところ、Balb/cマウスに

野生型 pMIF, pMIF/TTX,あるいはベクター DNA をエレクトロポレーション法で接種したマウスは、接種から 4 週後に pMIF/TTX 接種マウスは正常 MIF に反応する自己抗体を持つようになったが、野生型 MIF ワクチンとベクターのみのワクチンは 12 週後でも MIF に反応する抗体を産生しなかった。pMIF/TTX DNA ワクチンを導入したマウスにおいては MIF 自己蛋白に対する免疫学的寛容をすり抜けることができたと考えられる。産生された抗 MIF 抗体が正常マウス MIF との結合に関して中和活性を持つ抗 MIF モノクローナル抗体と競合するかどうかを調べたところ、抗 MIF 中和モノクローナル抗体のリコンビナントマウス MIF への結合を阻害した。従って誘導された抗体は確かに MIF に対する特異性を持つこと、さらにこの抗体が中和活性を持つという可能性が示唆された。ポリクローナル抗 MIF 抗体を投与されたマウスは、LPS の静脈注射の後、無処置マウスに比べて血清中の TNF- α の上昇が抑制されることが報告されている。ワクチン誘導抗 MIF 抗体が同様の効果を持つかを調べたところ、一度ワクチン接種を受けたマウスにその 6 週後に LPS を静脈注射した時、血清 TNF- α のレベルはベクター DNA を前処置した LPS 投与マウスよりも有意に低かった。これらの結果から、pMIF/TTX DNA による免疫は正常 MIF を特異的に認識する抗体を産生している可能性が考えられた。

コラーゲン抗体関節炎 (CAIA) をもつマウスでは、MIF の内因性産生が増強されており、MIF に対する抗体は関節の炎症を強く抑制することが示されている。そこで pMIF/TTX DNA を Balb/c マウスに免疫することによりリウマチ様関節炎のマウスモデルである CAIA の発症を抑制するかどうかを調べた。関節炎の発生を肉眼的に観察し、四肢関節について腫脹と発赤を発症ピーク時の LPS 投与後 7 日目でスコア化したところ、pCAGGS(空)ベクター投与群では関節炎スコアの平均±標準誤差が 7.1 ± 0.7 であったのに対し、pMIF/TTX DNA ワクチン投与群では 3.3 ± 0.5 で関節炎の抑制効果が認められた。また組織学的解析においても pMIF/TTX DNA ワクチン投与マウスから得た足根下腿関節の病理切片は、滑膜の軽度の肥厚と増殖、軽度の炎症細胞浸潤、パンヌスの侵入無し、無傷の骨、軟骨構造を示した。関節炎の臨床症状がこれらの動物で減少したことを意味している。

pMIF/TTX DNA ワクチンが IL-1Ra 欠損マウスの自然発症関節炎の重症化を阻止するように作用できるかを調べた。マウスで作られた抗 MIF 抗体価を調べると、ワクチン免疫 6 週後、有意に上昇した値を示した。動物における自己免疫関節炎の臨床的重症度は、関節炎スコアの評価と後趾の腫脹の程度によって決めた。pMIF/TTX DNA ワクチンを受けたマウスは、ワクチン接種 6, 8, 12 週後有意に低い関節炎スコアを示し、肢の腫脹も、ワクチン接種 12 週後、pCAGGS(空)ベクター投与グループと比べて有意に低かった。また病変のある足関節は非常に軽度の滑膜炎、軟骨・骨のびらん、軟骨のサフラニン O 染色の消失、そして MIF の免疫染色を示した。

【考察】Th 修飾ワクチン法は、自己蛋白に対する免疫学的寛容をすり抜けることができることから、疾患の発症に関わる自己蛋白に対して免疫反応を惹起するワクチンとして治療に使える可能性を証明している。pMIF/TTX DNA ワクチンによる能動免疫は、治療用に注射された抗 MIF モノクローナル抗体と同じ程度に CAIA の症状を軽減することを示した。結論として、Th 修飾 MIF-DNA はコストの低い有望な予防的ワクチン法で CAIA や IL-1Ra 欠損マウスの自然発症関節炎を抑制する。このように、MIF に対する能動免疫は、関節リウマチに対する新しいアプローチの治療である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 守 内 哲 也
副 査 教 授 清 水 宏
副 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 助 教 授 小 林 正 伸

学位論文題名

マクロファージ遊走阻止因子を標的にした DNA ワクチン

—関節リウマチの新規治療法に関する基礎的研究—

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は近年、関節リウマチ (RA) を含むさまざまな炎症性疾患におけるメディエータとして注目を浴びている。これまでげっ歯類動物の RA モデルにおいて抗 MIF モノクローナル抗体がこれらの炎症を顕著に抑制することが報告されている。しかし臨床的なモノクローナル抗体の使用は、1) 生産コストが高い、2) 継続的な投与が必要、3) 抗体のヒト化が必要、などから制約されている。これらの問題を克服する一つの方法として今回、自己抗体を誘導するワクチン能動免疫による新規治療法の開発を試みた。

本研究ではマウス MIF に破傷風毒素(TTX)のヘルパーT (Th) エピトープを組み込むことにより、この変異 MIF が生体内で抗 MIF 自己抗体の産生を誘導することを見い出した。マウス MIF の第 2 ループをコードする領域、則ちアミノ酸 32-37 (GKPAQY)、を取り除いてここに TTX(破傷風毒素)の Th エピトープの配列を挿入した (pMIF/TTX DNA ワクチン)。Balb/c マウスに野生型 pMIF、pMIF/TTX、あるいはベクター DNA をエレクトロポレーション法で接種した。接種から 4 週後、pMIF/TTX 接種マウスは正常 MIF に反応する自己抗体を持つようになったが、野生型 MIF ワクチンとベクターのみのワクチン接種マウスは 12 週後でも MIF に反応する抗体を産生しなかった。次に、ワクチン誘導抗 MIF 抗体が LPS 投与後の血中 TNF- α レベルの上昇を抑制するか否かを調べた。ワクチン接種を受けたマウスに 6 週後 LPS を静脈注射したしても血清 TNF- α のレベルはベクター DNA を前処置した LPS 投与マウスよりも有意に低かった。pMIF/TTX DNA ワクチンを Balb/c マウスに免疫することによりリウマチ様関節炎の短期モデルである抗 II 型コラーゲン抗体誘導関節炎 (CAIA) の発症を抑制するかどうかを調べた。pCAGGS(空)ベクター投与群では関節炎スコアの平均±標準誤差が 7.1 ± 0.7 であったのに対し、pMIF/TTX DNA ワクチン投与群では 3.3 ± 0.5 で有意な関節炎の抑制効果が認められた。また pMIF/TTX DNA ワクチン投与マウスでは関節炎の病理組織学的変化が抑制

された。さらに、pMIF/TTX DNA ワクチンが長期関節炎モデルである IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) 欠損マウスの自然発症関節炎の重症化を阻止するか否かを調べた。マウスで作られた抗 MIF 抗体価を調べると、ワクチン免疫 6 週後、有意に上昇した値を示した。関節炎スコアは pCAGGS (空) ベクター投与グループと比べて有意に低く、病理形態学的にも関節炎は抑制された。以上の結果から、MIF DNA ワクチンによる能動免疫は、関節リウマチに対する新しい治療法となる可能性が示された。

公開発表において、副査の清水教授から、1) TNF- α をブロックすると感染症などの種々の副作用があるが MIF DNA ワクチンではどうか、2) MIF DNA ワクチンの特許戦略について、浅香教授から、1) MIF ノックアウトマウスは正常に育つのか、2) 人への臨床応用の準備はどの程度進んでいるか、小林助教授から、1) MIF-DNA ワクチン接種後に産生される蛋白量を測定したか、2) naked (裸の) DNA 発現ベクターの遺伝子導入は電気穿孔法で 20~100 倍の効率になるが、人で試したことはあるか、3) DNA ワクチン導入局所以外で目的の蛋白が発現していることはなかったか; 等について質問があった。最後に主査の守内教授から、DNA ワクチンで自己抗体を誘発しても自己免疫反応はコントロールできるのかについて質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの実験データと文献的考察を交えて概ね適切な回答を行った。

この論文は、炎症性サイトカインを DNA ワクチンで抑制する方法を開発したことが高く評価され、今後この成果は戦略的な特許として北大医学研究科と応用特許に関する特許プールの作成が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (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。