

学 位 論 文 題 名

A novel DNA vaccine targeting macrophage
migration inhibitory factor improves
the survival of mice with sepsis

(マクロファージ遊走阻止因子を標的とした新規 DNA ワクチンは
敗血症マウスの生存率を向上させる)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

敗血症は致死性の疾患であり、死亡率を減少させるため新たな治療法の早急な開発が必要とされる。マクロファージ遊走阻止因子(以下 MIF)は炎症のメディエーターとして注目されており、敗血症、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎など様々な炎症性疾患における重要な役割が指摘されている。抗 MIF 中和抗体や MIF ノックアウトマウスなどを用いた研究から、MIF を抑制することにより、これらの疾患モデルにおいて TNF- α 、IL-6、IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現が抑制され、また疾患重篤性が軽減されることが報告されている。炎症性サイトカインに対し、その中和抗体を外部より投与する受動的抗体療法はその有効性が証明され、抗 TNF- α 抗体などが実際に臨床現場において用いられているが、コストが高いことやアナフィラキシーショック、長期投与による作用の減弱などの問題点もある。これを克服するために、標的となるサイトカインの構造を一部改変してワクチンとして投与し、生体内に抗サイトカイン自己抗体を惹起させて標的サイトカイン活性の中和を図ることにより疾患の治療を行う能動的抗体療法が試みられている。本研究では、MIF を標的としてこれに対する自己抗体を惹起するワクチンを DNA ワクチンとして開発し、この方法が敗血症の予防に有効かどうかを敗血症モデルマウスを用いて検証した。

【対象と方法】

MIF-DNA ワクチン (以下 MIF DV) はマウス MIF cDNA 配列を基本とし、この 2nd loopout 部分をヘルパー T エピトープとしてテタヌス毒素配列で置換したものを発現プラスミドに挿入して作製した。コントロールワクチン (以下 CV) は発現プラスミドをそのまま用いた。3 週令 ♂ Balb/c マウスに麻酔下で MIF DV ないしは CV を前脛骨筋内にエレクトロポレーション法により 1 回導入し、6 週後に抗 MIF 抗体価を測定して上昇を確認後、敗血症モデル発症誘導を行った。評価を行うために 2 種類の敗血症モデルを使用した。lipopolysaccharide(以下 LPS) モデルは 15mg/kg の LPS をマウス腹腔内に投与した。cecal ligation and puncture (以下 CLP)モデルは麻酔下でマウスを開腹して虫垂先端を 5 mm 大に結紮し、18G 針で 2 回穿孔を行って閉腹し作成した。評価として、両モデルともに、①発症誘導後 6 時間ごとに生存率を算定、②

発症誘導後 24 時間まで経時的に採血および肺の摘出を行い、ELISA 法により血清中各種炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MIP-2、および MIF)濃度を、Real Time PCR 法により肺におけるこれらサイトカインおよび LPS 受容体である toll like receptor (TLR) 4 の mRNA レベルを測定、および③敗血症発症誘導後 12 時間での肺の病理学的組織評価、を行った。また本研究では MIF-DV 接種による副作用に関して検討を行った。短期的には、MIF-DV ないしは CV 接種後 6 週経過したマウスに関して創傷治癒実験を行い、抗 MIF 自己抗体の誘導が創傷治癒能に影響するかどうか検討した。また長期的には MIF DV ないしは CV 接種後 1 年半を経過したマウスに関して、①抗 MIF 抗体価を含む血液生化学的評価、②肺・肝・腎の重量および病理学的評価を行った。

【結果】

1. 敗血症実験

生存率においては、両モデルとも MIF DV 群が CV 群に比べ有意な生存率の改善を示した。血清サイトカイン濃度は、両モデルとも MIF DV 群において全般に低値の傾向であり、とくに LPS モデルにおいて TNF- α 濃度は有意差を認めた。肺における各種炎症性サイトカインおよび TLR-4 mRNA レベルは、両モデルとも MIF DV 群が CV 群に比べ有意に低値であった。肺の病理組織評価においても、両モデルとも MIF DV 群は CV 群に比べ肺胞壁の肥厚などの炎症所見の軽減が認められた。

2. 副作用の検討

創傷治癒実験では MIF DV 群は CV 群に比べやや傷の修復がやや遅延したが、有意差は認めなかった。ワクチン接種後 1 年半経過したマウスは MIF DV 群、CV 群ともすべて生存し、体重、臓器重量、血液生化学的評価(GOT、GPT、creatinine、尿蛋白)、抗 MIF 抗体価、いずれにおいても両群間に有意差を認めなかった。MIF DV 群、CV 群ともに肺、肝臓、腎臓の病理組織において異常を認めなかった。

【考察】

DNA ワクチンは病原体、サイトカイン、腫瘍抗原などを標的としうる新しい治療法のひとつであり、タンパクワクチンに比べ短時間で作成できること、低コスト、効果のスクリーニングが簡便であることなど利点が多い。本研究では、MIF を標的とする新たな敗血症治療のアプローチを行った。敗血症では様々な炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6、IL-1 β など) の関与が認められるが、MIF はこれらサイトカインの上流に位置すると考えられている。今回の結果からは MIF DV 接種によりこうした炎症性サイトカインのほか、TLR-4 mRNA の発現亢進の抑制も示された。すなわち MIF DV 接種による敗血症モデル致死率の抑制の機序には、LPS 感受性の抑制も示唆され、こうした知見は MIF の活性制御が敗血症の新たな治療戦略になることをあらためて示すものである。本研究では 2 種類の敗血症モデルマウスを用いたが、特に臨床的に敗血症に近いとされる CLP モデルでも効果を認めたことは本アプローチが臨床的にも有効性を示す可能性を示唆している。MIF DV 導入のようなアプローチでは MIF の恒常的中和による副作用も考えられるが、本研究の結果からは抗 MIF 抗体価上昇が永久的なものではなく、かつ短期、長期いずれでも明確な副作用は認めておらず、今後臨床応用にむけて中動物などを対象としたさらなる検討が必要である。

【結論】

マウスに MIF DV ないしは CV 接種後、2 種類の敗血症モデル発症誘導を行い、致死率等に差があるか検討した。MIF DV 群は CV 群に比べいずれのモデルにおいても有意な致死率の抑制および各種炎症性サイトカインレベルの抑制を示した。これらの所見は今まで報告されてきた抗 MIF 抗体投与による敗血症マウスモデルの結果と同等であり、

この新しいアプローチは敗血症に対する予防法として有望である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor improves the survival of mice with sepsis

(マクロファージ遊走阻止因子を標的とした新規 DNA ワクチンは
敗血症マウスの生存率を向上させる)

敗血症は致死性疾患であり、その死亡率を減少させるためには新たな治療法の開発が必要である。近年、抗マクロファージ遊走阻止因子(以下 MIF) 中和抗体や MIF ノックアウトマウスなどを用いた研究から、MIF を抑制することによって炎症性サイトカインの発現が抑制され、敗血症モデルの重篤性が軽減されることが報告されてきた。一方、標的となるサイトカインの構造を一部改変してワクチンとして投与し、生体内に抗サイトカイン自己抗体を惹起させて標的サイトカイン活性の中和を図ることにより疾患の治療を行う能動的抗体療法が試みられている。本研究は、MIF を標的としてこれに対する自己抗体を惹起する DNA ワクチンを開発し、これを用いた治療が敗血症の生存率を向上させるか否かを、敗血症モデルマウスを用いて検証した。

申請者はマウス MIF の cDNA 配列の second loopout 部分をヘルパー T エピトープとしてテタヌス毒素で置換したものを発現プラスミドに挿入して MIF-DNA ワクチン(以下 MIF DV) を作製した。コントロールワクチン(以下 CV) には発現プラスミドをそのまま用いた。3 週令 ♂ Balb/c マウスに MIF DV ないしは CV をエレクトロポレーション法により 1 回導入し、6 週後に抗 MIF 抗体価を測定した。評価には以下の 2 種類のマウス敗血症モデルを使用した。lipopolysaccharide (LPS) モデルは 15mg/kg の LPS をマウス腹腔内に投与して作製した。cecal ligation and puncture (CLP) モデルは開腹したマウスの虫垂先端を 5 mm 大に結紮し、18G 針で 2 回穿孔して作製した。両モデルにおいて以下の評価を行った。①発症誘導後 6 時間ごとに生存率を算定した。②発症誘導後 24 時間まで経時的に採血を行い、ELISA 法により血清中各種炎症性サイトカイン濃度を測定した。また経時的に肺の摘出を行って Real Time PCR 法により肺における炎症性サイトカインおよび toll like receptor (TLR) 4 の mRNA レベルを測定した。③発症誘導後 12 時間における肺の病理組織学的評価を行った。また MIF-DV 接種による副作用を評価するために、短期的には、MIF-DV ないしは CV 接種後 6 週経過したマウスにおける創傷治癒実験を行った。また長期的には MIF DV ないしは CV 接種後 1 年半を経過したマウスに関して、抗 MIF 抗体価を含む血液生化学的評価、および臓器の重量および病理学的評価を行った。

結果として、両モデルとも MIF DV 群が CV 群に比べ有意に高い生存率を示した。また血清

サイトカイン濃度は MIF DV 群が有意に低値、または低値の傾向を示した。肺における各種炎症性サイトカインおよび TLR-4 mRNA レベルは、両モデルとも MIF DV 群が CV 群に比べ有意に低値であった。肺の病理組織評価においても、MIF DV 群は CV 群に比べ炎症所見（肺胞壁の肥厚など）の軽減が認められた。また副作用の検討では、創傷治癒実験における創の修復には有意差を認めなかった。ワクチン接種後 1 年半経過したマウスは MIF DV 群および CV 群のすべての動物が生存し、体重、臓器重量、血液生化学的評価、抗 MIF 抗体価のいずれにおいても両群間に有意差を認めず、また両群ともに肺、肝臓、腎臓の病理組織に異常を認めなかった。本研究は、申請者らが開発した MIF-DNA ワクチンが、2 種類のマウス敗血症モデルにおいてその生存率の向上に有効であることを明らかにした。これらの所見は今まで報告されてきた抗 MIF 抗体投与による敗血症マウスモデルの結果と同等であり、この新しいアプローチは敗血症に対する治療法として有望であることが示唆された。

口頭発表の後、副査の守内教授より人間に対する DNA ワクチンの非侵襲的導入法および DNA ワクチンの体内伝達経路などについて質問があった。次いで主査の清水は急性の経過をとる疾患に対するこの種のワクチンの使用方法、およびワクチンを接種する対象などについて質問を行った。最後に副査の安田教授より、創傷治癒実験において創の修復に有意差を認めなかった理由、および MIF を恒常的に低値に抑制することの副作用の評価などについて質問があった。いずれに対しても申請者は、自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究は、研究者らが開発した MIF-DNA ワクチンの治療効果を、敗血症モデルマウスを用いて調べ、このワクチンが種々の炎症性サイトカインレベルを抑制し、敗血症モデルマウスの生存率を有意に向上させることを初めて明らかにすることによって、今後の DNA ワクチンの開発に重要な情報を与えた。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。