

学位論文題名

DNA vaccination against macrophage migration inhibitory factor improves atopic dermatitis in murine models

(MIF-DNA ワクチンはアトピー性皮膚炎モデルマウスの症状を改善させる)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

アトピー性皮膚炎(AD)はアトピー素因の保有をベースに増悪・寛解を繰り返す広範囲の湿疹病変を特徴とする皮膚疾患である。ADの病因として近年皮膚バリア機能の低下(フィラグリン遺伝子変異)が報告されたが、その他に免疫学的異常、環境的要因などが複合していると考えられ、特にサイトカインは皮膚炎の病態形成に重要な役割を果たしている。

Macrophage migration inhibitory factor (MIF)は、TNF- α や IL-1 β を誘導して炎症反応を惹起する炎症性サイトカインである。AD患者では健常人と比べMIF発現量が血中・病変部皮膚ともに多いことから、MIFは病変部局所にとどまらず、全身のサイトカインネットワークの中でADの病態に関与していると考えられる。

MIF中和抗体は、アレルギー接触過敏反応モデルマウスへの投与実験においてその炎症抑制効果が認められており、MIFの活性を抑える抗体療法はADに対して有用であると考えられる。しかし、抗体自体を投与する受動的抗体療法では持続性に欠けること、コストが高いこと、投与抗体に対する抗体産生が惹起され薬効が減弱することなど臨床応用上その限界も指摘されている。このような課題を克服するために、MIFを抗原に宿主を免疫して、MIFに対する自己中和抗体産生を誘導し、MIF活性を抑えることを検討した。生体はサイトカインのような自己成分に対しては免疫寛容にあり抗体を産生しにくいというのが定説であったが、Thエпитープ(主要組織適合抗原によりヘルパーT細胞に提示される約20アミノ酸程度のペプチド)として既に知られる破傷風トキソイドの一部でMIFの第2ループ部分を置換することにより、宿主は免疫寛容から逃れ自己成分であるMIFに結合する抗体の産生が容易に誘導されるようになる。私たちはこれまでに、この改変MIF発現プラスミド(MIF/TTX DNA ワクチン)を関節リウマチおよび敗血症のモデルマウスに投与し、その治療効果を報告している。

本研究では、MIF-DNA ワクチンのADに対する発症予防的かつ治療的効果を検討した。ADモデルマウスとして、黄色ブドウ球菌を抗原にAD様皮膚炎を自然発症するDS-Nhマウスと、ダニを抗原にAD様皮膚炎を自然発症するNC/Ngaマウスの2系統を用いた。

【方法・結果】

最初にMIF/TTX DNA ワクチンのAD発症予防効果について調べるために、皮膚炎発症前の9週齢のDS-NhマウスにMIF/TTX DNA ワクチンまたはコントロールpCAGGSプラスミドを投与し、Clinical skin score、血中抗MIF抗体価、血中IgE濃度、血中MIF濃度および病変部皮膚組織中のサイトカイン発現量を測定した。pCAGGSプラスミドを投与したマウスは顔や肩に紅斑、びらんを生じAD様皮膚炎の発症を認めしたが、MIF/TTX DNA ワクチンを投与したマウスは21週齢になっても皮膚炎症状を生じなかった。MIF/TTX DNA ワクチンマウスではClinical skin scoreは21週齢まで低い値が維持され、血中抗MIF抗体価は有意に高値だった。血中IgE濃度とMIF濃度の上昇は、コントロールと比較して軽度であり、病変部皮

膚組織中のサイトカイン発現量は IL-4 で減少、IFN- γ で増加する傾向がみられ、IL-1 β と IL-6 は著明に抑制された。以上より MIF/TTX DNA ワクチンには AD 発症予防的効果があり、これは Th1/Th2 サイトカインバランスというよりは全般的な炎症の抑制による効果であることが示唆された。

続いて MIF/TTX DNA ワクチンに AD 治療効果があるか調べるために、AD 様皮膚症状を生じた 15 週齢の DS-Nh マウスに MIF/TTX DNA ワクチンまたはコントロール pCAGGS プラスミドを投与し、Clinical skin score、血中抗 MIF 抗体価、血中 IgE 濃度、血中 MIF 濃度、血中 TNF- α 濃度を測定した。臨床的にコントロールでは皮膚症状の悪化を認めたのに対し、MIF/TTX DNA ワクチンを投与したマウスでは 6 週間後には改善した。MIF/TTX DNA ワクチン投与マウスでは、Clinical skin score が低下し、21 週齢時（ワクチン投与後 6 週目）の血中抗 MIF 抗体価は有意に高値だった。その他、血中 IgE 濃度は低下傾向で、血中 MIF 濃度は皮膚炎発症前と同程度まで低下、血中 TNF- α 濃度は有意に低値であった。

臨床所見の改善を裏付けるように、組織学的にも MIF/TTX DNA ワクチン投与後 6 週目には表皮の過角化や肥厚、真皮の浮腫、炎症細胞浸潤が著明に改善し、好酸球数、肥満細胞数も有意に減少していた。以上より、MIF/TTX DNA ワクチンの AD に対する治療効果が示された。

さらに別系統の AD モデルマウスである NC/Nga マウスを用いて、同様に AD 治療効果を検討した。AD 様皮膚症状を生じた 15 週齢の NC/Nga マウスに MIF/TTX DNA ワクチンまたはコントロール pCAGGS プラスミドを投与し、Clinical skin score、血中抗 MIF 抗体価、血中 MIF 濃度を測定した。コントロールでは皮膚症状が悪化したのに対し、MIF/TTX DNA ワクチンを投与したマウスの皮膚症状は 6 週間後には改善し、Clinical skin score の低下がみられた。MIF/TTX DNA ワクチン投与マウスでは 21 週齢時（ワクチン投与後 6 週目）の血中抗 MIF 抗体価が有意に高値であり、血中 MIF 濃度は皮膚炎発症前と同程度まで低下した。これらの結果から、2 系統の AD モデルマウスにおいて MIF/TTX DNA ワクチンの AD に対する治療的効果が示された。

さらに MIF/TTX DNA ワクチンの治療効果は、ワクチンにより誘導された抗体によることを実証するために、9 週齢の DS-Nh マウスに MIF/TTX DNA ワクチンまたはコントロール pCAGGS プラスミドを投与後 6 週間目の血清から IgG を精製した。精製した IgG を AD 様皮膚症状を生じた 15 週齢の DS-Nh マウスに 3 日に 1 度 3 週間にわたって静注し、臨床像と clinical skin score で評価した。MIF/TTX DNA ワクチン投与マウスの IgG を静注した DS-Nh マウスの AD 様皮膚症状は改善するのに対し、コントロールプラスミド投与マウスの IgG を静注した DS-Nh マウスの皮膚症状は改善が見られなかった。以上より、MIF/TTX DNA ワクチンによる治療効果はワクチン投与マウスの血中 IgG を介して移入できることが示唆された。

【結論】

AD モデルマウスを用いて MIF-DNA ワクチン療法が AD の予防および治療に有用であることを明らかにした。ワクチン療法は中和抗体自体を投与する受動的抗体療法で指摘される欠点（低持続性、抗体惹起性、経済性）を補うことができる新しい治療法であり、難治性で慢性の経過に苦しむ AD 患者にとっては福音となると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治

副 査 准教授 遠 山 晴 一

副 査 教 授 清 水 宏

学位論文題名

DNA vaccination against macrophage migration inhibitory factor improves atopic dermatitis in murine models

(MIF-DNA ワクチンはアトピー性皮膚炎モデルマウスの症状を改善させる)

アトピー性皮膚炎(AD)はアトピー素因の保有をベースに慢性の湿疹病変を形成する皮膚疾患である。Macrophage migration inhibitory factor (MIF)は、TNF α やIL-1 β を誘導し全身のサイトカインネットワークの中でADの病態に関与していると考えられる。MIF活性を抑える抗体療法はADに有用と考えられるが、持続性に欠け、コストが高く、投与抗体に対する抗体産生により効果が減弱するなど限界も指摘される。このような課題を克服するため、MIFを抗原に宿主を免疫して抗MIF自己抗体産生を誘導し、MIF活性を抑えることを検討した。

今回我々は、ワクチンの抗原惹起性を高めるためMIFの第2ループをThエピトープで置換し、プラスミドに挿入した(MIF/TTX DNA ワクチン)。AD自然発症モデルマウスには黄色ブドウ球菌を抗原とするDS-Nhと、ダニを抗原とするNC/Ngaの2種類を用いた。

まずMIF/TTX DNA ワクチンのAD発症予防効果を調べるため、皮膚炎発症前のDS-NhにMIF/TTX DNA ワクチンまたはコントロールプラスミドを投与した。その結果、ワクチンを投与すると21週齢時まで皮膚炎を認めず、Clinical skin scoreは低値が維持され、血中抗MIF抗体価は有意に高値だった。血中IgEとMIF濃度の上昇は、コントロールと比較し軽度であり、皮膚組織中のIL-1 β とIL-6発現は著明に抑制されたが、IL-4とIFN- γ は有意差がなかった。以上よりこのワクチンは、全般的な炎症の抑制によりAD発症を予防すると考えた。

続いてMIF/TTX DNA ワクチンにAD治療効果があるか調べるために、皮膚症状を生じた15週齢のDS-NhにMIF/TTX DNA ワクチンまたはコントロールプラスミドを投与した。ワクチンを投与すると6週間後に臨床像の改善を認めたほか、Clinical skin scoreが低下し、21週齢時の血中抗MIF抗体価も上昇していた。血中IgE・MIF濃度は低下傾向で、血中TNF- α 濃度は有意に低値だった。組織学的にもワクチン投与後6週目には表皮の過角化や肥厚、真皮の浮腫、炎症細胞浸潤が著明に改善し、好酸球数、肥満細胞数も有意に減少していた。さらにNC/Ngaを用いて同じ条件でAD治療効果を検討したところ、ほぼ同様の結果が得られ、2系統のADモデルマウスにおいてMIF/TTX DNA ワクチンのADに対する治療的効果が示された。

また、MIF/TTX DNA ワクチンの治療効果がワクチンで誘導された自己抗体の働きによることを実証するために、DS-NhにMIF/TTX DNA ワクチンまたはコントロールプラスミドを投与し6週後の血清からIgGを精製した。AD様皮膚症状を生じた15週齢のDS-Nhに、これらのIgGを3週間静注したところ、MIF/TTX DNA ワクチン投与マウスのIgGを静注したDS-Nhの

皮膚症状は改善し、Clinical skin score の低下を認めた。このように MIF/TTX DNA ワクチンによる治療効果がワクチン投与マウスの血中 IgG を介して移入できたことから、ワクチン投与は皮膚炎治療効果のある自己抗体産生を誘導することが示唆された。

MIF-DNA ワクチン療法は受動的抗体療法 of 欠点を補う新しい治療法であり、今回マウスモデルで AD に対する予防および治療効果が示されたことは、難治性で慢性の経過に苦しむ AD 患者の福音となる。

副査の遠山晴一准教授から、AD 予防効果を調べた系で TNF α 発現の解析について、体内で恒常的に MIF 中和抗体を産生させることの問題点について、臨床応用にむけてのワクチン導入方法について質問があった。主査の西村正治教授からは、ワクチンにより血中 MIF が下がったデータの解釈について、ワクチンにより誘導された抗 MIF 抗体の中和活性について、ワクチンにより IgE が低下したメカニズムについて、リンパ球に対する効果について、臨床応用に向けての課題について、それぞれ質問があった。最後に副査の清水教授から、臨床応用に際してどのようなタイプの AD 患者をターゲットとするべきか、他にどのような疾患に応用できるか、との質問があり、申請者は概ね適切な回答をした。

この論文は、AD に対する治療効果のみならず予防効果についても証明した点で高く評価され、今後はヒトへの投与方法や恒常的に MIF 抗体をさせることに問題がないのかといった臨床応用に向けての課題が解決されてゆくことが期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院過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と判定した。