

学位論文題名

Development of cytotoxic T lymphocyte-inducing peptide vaccine

(細胞傷害性T細胞誘導型ペプチドワクチンの開発)

学位論文内容の要旨

獲得免疫応答は抗体が産生される液性免疫と細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) が誘導される細胞性免疫から構成される。現在主に使用されている不活化ワクチンや成分ワクチンでは抗体のみが誘導される一方、生ワクチンは抗体と CTL の両方を誘導することが可能である。現状で、ある種の感染症に対して生ワクチンによる防御効果がより強いと言われるのは、液性免疫と細胞性免疫を活性化し病原体に対して極めて有効な免疫応答を誘導できるからである。しかし、副反応の問題や適切な弱毒株を作製することが困難である等の理由で、生ワクチンを使用できる感染症は少数に限られている。

これまでに CTL の誘導を目的とした様々なワクチン開発が行われてきた。その中で MHC class I 分子に提示される 8~10 アミノ酸から成るエピトープペプチドで免疫し CTL を誘導するペプチドワクチンは安全で実用的なワクチンであると考えられる。しかしペプチド自体の免疫原性は弱いため、ペプチドワクチンで強力な CTL 活性を誘導するためには、抗原提示細胞を活性化するためのアジュバントと共に、ペプチドを抗原提示細胞へ効率良く輸送するためのキャリアーが必要となる。

本研究は、実用的なペプチドワクチンの開発を目指し、インフルエンザに対する CTL エピトープワクチンの評価および細胞性免疫誘導に効果的な新たなペプチドキャリアーの開発を目的に実施した。

第一章では A 型インフルエンザウイルス内部蛋白質由来の CTL エピトープの同定および、同定されたペプチドでの免疫による防御効果の検討を行った。

現行の中和抗体誘導を目的としたインフルエンザワクチンは、表面蛋白質であるヘマグルチニンの亜型に防御効果が依存するため、亜型間での交差防御効果は低い。また、同じ亜型間でも流行するウイルス株の抗原性を予測してワクチンを毎年作り直す必要がある。そこで本研究は、ウイルス内部蛋白質を認識でき、ウイルス亜型に対する依存性が低い CTL を誘導可能なワクチンを開発するため、ペプチドワクチンの技術を用いた。さらにヒトにすぐに応用可能とするため、主要なヒト MHC クラス I 分子である HLA-A*2402 分子を発現する

HLA-A24 transgenic mice (A24Tg)をワクチン効果の解析に用いた。まず抗原ペプチドを結合予測プログラムにより HLA-A*2402 分子に結合する可能性が高いペプチド配列を絞り込んだ。次にそのペプチドをリポソームの表面に結合して A24Tg を免疫し、*in vivo* CTL 活性の測定により高い CTL 誘導効果を示すペプチドを選定した。最終的にこれらのペプチドで A24Tg を免疫し、インフルエンザウイルスを感染させて感染防御効果を検討した。その結果、亜型間で共通に保存されているペプチド3種類を経鼻投与した場合は、異なる2種類のウイルス亜型を感染させても無症候または軽度の体重減少のみで全マウスが生存し、さらに肺におけるウイルス増殖も有意に抑制されていた。しかし、皮下投与した場合は途中まで非免疫群と同様の体重減少を示し、生存率は50~80%であった。次にワクチン投与経路による防御効果の差を病理組織学的に調べたところ、ワクチン経鼻投与群では細気管支周囲に T 細胞の集積が認められたが、皮下投与群では認められなかった。以上の結果により、インフルエンザウイルス由来の内部構造蛋白質から同定された CTL エピトープを用いた CTL 誘導型ペプチドワクチンは、気道内で感染細胞を排除しウイルスの増殖を阻止することによってウイルス抵抗性を誘導すると考えられた。

第二章では新たなペプチドキャリアーの探索を行った。リポソームは4種類の異なる脂質から構成され、二分子膜が何重にも重なった多重膜構造を形成している。この多重膜リポソームを作製するには時間がかかることや生産コストが高いこと等が実用上の問題点である。そこでリポソームに代わる安価で容易に調製可能なキャリアー物質を探索するため、様々な候補物質をペプチドに結合して B6 マウスを免疫し、生体内でのエピトープ特異的細胞傷害活性を測定することで、有効なキャリアーを選別した。その結果、フォスファチジルセリン(phosphatidylserine, PS)が最も強い CTL 誘導効果を持つことが判明した。さらに、PS の免疫増強機序を解析するため、各種免疫細胞による PS の取込み能および抗原提示能を調べた。その結果、PS は通常型樹状細胞(conventional dendritic cells, cDCs)に優先的に取り込まれることで抗原を効率良く cDCs へ輸送し、エピトープ特異的な CTL の誘導効果を増強させていることが明らかになった。

以上、本研究では、第一章で予測プログラムにより CTL エピトープを予測し、*in vivo* で免疫原性ペプチドを選別する技術により、感染防御効果があるペプチドを同定、さらに感染防御試験を実施してペプチドワクチンの効果を評価する系を確立した。また、第二章では実用的な新たなペプチドキャリアーを開発し、その作用機序を明らかにした。これらの研究成果は、インフルエンザウイルスに限らず種々の細胞内寄生体に対する CTL 誘導型ワクチンの開発、実用化において極めて有益な技術を提供するものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	杉本千尋
副査	教授	大橋和彦
副査	教授	高田礼人
副査	准教授	梶野喜一

学位論文題名

Development of cytotoxic T lymphocyte-inducing peptide vaccine

(細胞傷害性T細胞誘導型ペプチドワクチンの開発)

獲得免疫応答は抗体が産生される液性免疫と細胞傷害性T細胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) が誘導される細胞性免疫から構成される。現在主に使用されている不活化ワクチンや成分ワクチンでは抗体のみが誘導される一方、生ワクチンは抗体とCTLの両方を誘導する事が可能である。現状で、生ワクチンによる防御効果がより強いと言われるのは、液性免疫と細胞性免疫を活性化し病原体に対して極めて有効な免疫応答を誘導できるからである。しかし、副反応の問題や適切な弱毒株を作製する事が困難である等の理由で、生ワクチンを使用できる感染症は少数に限られている。

これまでにCTLの誘導を目的とした様々なワクチン開発が行われてきた。その中でMHC class I分子に提示されるエピトープペプチドで免疫しCTLを誘導するペプチドワクチンは実用的なワクチンであると考えられる。しかしペプチド自体の免疫原性は弱いため、ペプチドワクチンで強力なCTL活性を誘導するためには、抗原提示細胞を活性化するためのアジュバントと共に、ペプチドを抗原提示細胞へ効率良く輸送するためのキャリアーが必要となる。

本研究は、実用的なペプチドワクチンの開発を目指し、インフルエンザに対するCTLエピトープワクチンの評価および細胞性免疫誘導に効果的な新たなペプチドキャリアーの開発を目的に実施した。

第一章ではA型インフルエンザウイルス内部蛋白質由来のCTLエピトープの同定および、同定されたペプチドでの免疫による防御効果の検討を行った。現行の中和抗体誘導を目的としたインフルエンザワクチンは、表面蛋白質であるヘマグルチニンの亜型に防御効果が依存するため、亜型間での交差防御効果は低い。また、同じ亜型間でも流行するウイルス株の抗原性を予測してワクチンを毎年作り直す必要がある。そこで本研究は、ウイルス内部蛋白質を認識でき、ウイルス亜型に対する依存性が低いCTLを誘導可能なワクチンを開発するため、ペプチドワクチンの技術を用いた。さらにヒトへの応用を考え、HLA-A*2402分子を発現するHLA-A24遺伝子導入マウス(A24Tg)をワクチン効果の解析に用いた。まず抗原ペプチドを結合予測プログラムによりHLA-A*2402分子に結合する可能性が高いペプチド配列を絞り込んだ。次にそのペプチドでA24Tgを免疫し、*in vivo* CTL活性の測定により

高いCTL誘導効果を示すペプチドを選定した。そして、ペプチド免疫によるインフルエンザウイルスに対する感染防御効果を検討した。その結果、 亜型間で共通に保存されているペプチド3種類を経鼻投与した場合は、異なる亜型のウイルスを感染させても無症候または軽度の体重減少のみで全マウスが生存し、さらに肺におけるウイルス増殖も有意に抑制されていた。しかし、皮下投与した場合は途中まで非免疫群と同様の体重減少を示し、生存率は50～80%であった。次にワクチン投与経路による防御効果の差を病理組織学的に調べたところ、ワクチン経鼻投与群では細気管支周囲にT細胞の集積が認められたが、皮下投与群では認められなかった。以上の結果により、内部構造蛋白質から同定されたCTLエピトープを用いたCTL誘導型ペプチドワクチンは、気道内で感染細胞を排除しウイルスの増殖を阻止する事によってウイルス抵抗性を誘導すると考えられた。

第二章では新たなペプチドキャリアーの探索を行った。リポソームは複数の異なる脂質から構成され、二分子膜が何重にも重なった多重膜構造を形成している。この多重膜リポソームを作製するには時間がかかる事や生産コストが高い事などが実用上の問題点である。そこでリポソームに代わる安価で容易に調製可能なキャリアー物質を探索するため、様々な候補物質をペプチドに結合してC57BL/6マウスを免疫し、生体内でのエピトープ特異的細胞傷害活性を測定する事で、有効なキャリアーを選別した。その結果、フォスファチジルセリン(PS)が最も強いCTL誘導効果を持つ事が判明した。さらに、PSの免疫増強機序を解析するため、各種免疫細胞によるPSの取込み能および抗原提示能を調べた。その結果、PSは通常型樹状細胞へ優先的に取り込まれる事で抗原を効率良く抗原提示細胞へ輸送し、エピトープ特異的なCTLの誘導効果を増強させている事が明らかになった。

以上、本研究では、第一章で予測プログラムによりCTLエピトープを予測し、*in vivo*で免疫原性ペプチドを選別する技術により、感染防御効果があるペプチドを同定、さらに感染防御試験を実施してペプチドワクチンの効果を評価する系を確立した。また、第二章では実用的な新たなペプチドキャリアーを開発し、その作用機序を明らかにした。これらの研究成果は、インフルエンザウイルスに限らず種々の細胞内寄生体に対するCTL誘導型ワクチンの開発、実用化において極めて有益な技術を提供するものである。

よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者市橋徹君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。