

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

耳鼻咽喉科免疫アレルギー (2003.06) 21巻2号:208~209.

インフルエンザ菌P6外膜蛋白反応性T細胞の解析

石田芳也, 安部裕介, 柳内充, 今田正信, 林達哉, 野中聡,
原渕保明

93. インフルエンザ菌 P6 外膜蛋白反応性 T 細胞の解析

○石田芳也, 安部裕介, 柳内 充, 今田正信, 林 達哉, 野中 聡, 原淵保明

旭川医科大学耳鼻咽喉科

Analysis of the T cell line specific to the outer membrane protein P6 of nontypeable
Haemophilus influenzae

Ishida Y, Abe Y, Yanai M, Imada M, Hayashi T, Nonaka S, Harabuchi Y

Dept. of Otolaryngology- Head and Neck Surgery, Asahikawa Medical College

1. はじめに

夾膜を持たないインフルエンザ菌 Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHI) は、肺炎球菌、モラクセラ・カタラーリスとともに、中耳炎の 3 大起炎菌の 1 つである。以前我々は、NTHI の外膜蛋白の一つである P6 蛋白に対する分泌型 IgA の抗体価と、NTHI の分離頻度、中耳炎の罹患頻度が逆相関することを示した^{1, 2)}。さらに小児反復性中耳炎患者におけるアデノイドリンパ球、および急性増悪を繰り返す成人慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者における末梢血リンパ球において P6 蛋白に対する反応性が低下していることを示し^{3, 4)}、P6 蛋白に対する免疫応答の低下が NTHI 反復感染に関与している可能性を報告した。以上のことから、P6 蛋白は NTHI 感染症に対するワクチンの有力な候補と考えられている。

また、ワクチンの投与形態としては、従来の P6 蛋白そのものを直接投与する方法のほかに、あらかじめ T 細胞が認識する部位 (エピトープ) を調べておいて、エピトープを含むペプチドを直接投与するペプチドワクチンという方法も考えられている。この場合ペプチドは直接 HLA に結合し、T 細胞に抗原提示することになる。この方法の利点は、抗体を産生する上で必要のない蛋白の部分で投与しないので、余計な免疫反応が動かない点であり、このワクチンは余計な副反応が少ない理想のワクチンになりうると思われる。また、抗原のエピトープ部分のみ投与するため従来の蛋白そのものを投与する場合よりも選択的なより強い免疫応答を起こすことが可能であると考えられ、これらのエピトープを重合させるなどの工夫により、より効果的なワクチンとなる可能性も考えられて

いる。

そこで今回我々は、ペプチドワクチン開発の基礎的研究として、健康人末梢血より分離した CD4 陽性細胞および樹状細胞を用いて P6 蛋白に特異的に反応する T 細胞株を樹立し、その反応性について解析した。

2. 方法

P6 蛋白のエピトープを解析するにあたり、P6 蛋白のアミノ酸配列をもとに、前後 5 残基ずつ重複する 15 残基長のオーバーラッピングペプチドを 13 本作製した。また、ネガティブコントロールとして yellow fever の任意のアミノ酸配列より、同様の 15 残基長のペプチドも作製した。

樹状細胞 (DC) は末梢血単核球 (PBMC) から磁気ビーズ法を用いて分離した CD14 陽性細胞を GM-CSF、IL-4 の存在下で 7 日間培養することで誘導した。

まず樹状細胞を用いて、オーバーラッピングペプチドに対する CD4 陽性 T 細胞のリンパ球増殖反応を検討した。磁気ビーズ法にて分離した CD4 陽性 T 細胞を、DC を抗原提示細胞として P6 蛋白 (10 $\mu\text{g/ml}$) と 14 本のペプチド (5 $\mu\text{g/ml}$) それぞれで刺激した。また、ポジティブコントロールとして、T cell mitogen である PHA (5 $\mu\text{g/ml}$) を用いた。96 穴プレートで 7 日間、37°C、5%CO₂ で培養した後、³H-thymidine (1 $\mu\text{Ci/well}$) を加え、18 時間後その放射能を測定した。リンパ球増殖反応の評価は、stimulation index (SI : それぞれの CPM をバックグラウンドである抗原を入れない medium のみの CPM で除し算出) を用いた。

P6 外膜蛋白反応性 T 細胞株は、CD4 陽性 T 細胞

に DC および PBMC を抗原提示細胞として P6 蛋白の抗原刺激を与えることで樹立した。DC による抗原刺激は最初の 1 回のみで、その後は週 1 回のペースで PBMC による抗原刺激を繰り返した。24 穴プレートまで増殖させた後、オーバーラッピングペプチドに対するリンパ球増殖反応を検討した。

つぎに、この T 細胞株の増殖反応を拘束する HLA 分子を解析した。抗原提示細胞としての PBMC に、抗 HLA Class I 抗体、抗 HLA-DR 抗体、抗 HLA-DQ 抗体を加えそれぞれの HLA 分子をブロックした。各 HLA 分子をブロックした PBMC に P6 蛋白を抗原として加え、T 細胞株に P6 蛋白の抗原刺激を与え、それぞれの T 細胞株のリンパ球増殖反応を評価した。

続いて、抗原提示を受ける HLA Class II DR 分子についてさらに詳細に解析した。EBV で transform した異なる DR 分子を持った B 細胞株 7 株を抗原提示細胞とし、それぞれの B 細胞株で T 細胞株に P6 蛋白の抗原刺激を与え、T 細胞株のリンパ球増殖反応を評価した。

3. 結果

CD4 陽性 T 細胞のオーバーラッピングペプチドに対するリンパ球増殖反応の検討では、P6 と PHA については強い反応が認められ、ネガティブコントロールの yellow fever のペプチドでは反応が認められなかった。P6 蛋白のオーバーラッピングペプチドに対しては、2, 5, 6, 8, 10 番のペプチドに対して S. I. 2.0 以上の反応が認められた。

樹立した T 細胞株は、P6 の 8 番のオーバーラッピングペプチドに S. I. 5.0 以上の特異的な反応を示し、この 8 番のペプチド内に T 細胞エピトープが存在すると考えられた。

また、HLA DR 分子をブロックした場合にリンパ球増殖反応が抑制されたことから、この T 細胞株は HLA DR 分子を介して抗原提示を受けていることが示唆された。さらに、HLA class II DR 分子が判明している B 細胞株を抗原提示細胞とした検討では、DR9 を有する B 細胞株により増殖反応が誘導されたため、この T 細胞株の増殖反応は HLA-DR9 分子によって拘束されていると考えられた。

以上の結果より、HLA-DR9 保有者に対しては、P6 蛋白の 8 番目のオーバーラッピングペプチドがそのワクチン抗原となる可能性が考えられた。

4. まとめ

CD4 陽性細胞を、樹状細胞 (DC) を用いて P6 蛋白で刺激することで P6 蛋白に特異的に反応する T 細胞株を樹立した。

樹立された、P6 外膜蛋白反応性 T 細胞株は、P6 蛋白のオーバーラッピングペプチドの 8 番のペプチド内に、エピトープが存在していた。

この T 細胞株は、HLA-DR9 分子を介して P6 蛋白の抗原提示をうけていた。

DR9 分子保有者に対する P6 蛋白のペプチドワクチン療法として、P6 蛋白のオーバーラッピングペプチドの 8 番のペプチドがそのワクチン抗原の一つになる可能性が考えられた。

5. 参考文献

- 1) Harabuchi, Y., Faden H., et al.: Human milk secretory IgA antibody to nontypeable Haemophilus influenzae: possible protective effects against nasopharyngeal colonization. J Pediatr. 124: 193-8, 1994.
- 2) Harabuchi, Y., Faden H., et al.: Nasopharyngeal colonization with nontypeable Haemophilus influenzae and recurrent otitis media. J Infect Dis. 170: 862-6, 1994.
- 3) Kodama, H., Faden H., et al.: Cellular immune response of adenoidal and tonsillar lymphocytes to the P6 outer membrane protein of non-typeable Haemophilus influenzae and its relation to otitis media. Acta Otolaryngol. 119: 377-83, 1999.
- 4) Abe, Y., Murphy T.F., et al.: Lymphocyte proliferative response to P6 of Haemophilus influenzae is associated with relative protection from exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 165(7): 967-71, 2002.