

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	野 村 由 香
学 位 論 文 題 目 Candidate-Peptides of P6 outer membrane protein as a vaccine against nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i> (インフルエンザ菌 P6 外膜蛋白におけるワクチン候補ペプチドの検討) 共 著 者 名 安部 裕介、 石田 芳也、 小林 博也、 長門 利純、 原渕 保明 (未 公 表) 研 究 目 的 近年小児における急性中耳炎・反復性中耳炎の難治化が問題となっており、これらの経過に伴って生ずる滲出性中耳炎もまた、その予防・治療が論ぜられるところとなっている。 莢膜を持たないインフルエンザ菌(nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>)は、肺炎球菌、カタラーリス菌とともに小児反復性中耳炎の三大起炎菌の一つであり、成人の慢性閉塞性肺疾患における急性増悪の起炎菌としても重要である。近年における薬剤耐性化の問題からも有効なワクチン療法の開発は急務であると考えられている。 インフルエンザ菌 P6 外膜蛋白は、ワクチン療法の責任抗原部位として注目されているが、Harabuchi らは中耳炎患児における抗原に対する特異的免疫応答の脆弱性を示唆している(1)。すなわち、反復性中耳炎児に対する有効性の高いワクチン療法の開発には、免疫応答が高い抗原を投与する必要があると考えられる。 筆者らは、近年注目されている T 細胞や B 細胞が認識する部位(エピトープ)を含むペプチドを用いたワクチン療法に注目し、エピトープペプチドを重合することによって、蛋白そのものを用いたワクチンに比べて副反応が少なく、より効果的な免疫応答を誘導するワクチンを開発することを目標としている。 これまでに、HLA-DR9 を有するドナーを対象に P6 特異性 T 細胞株を樹立し、DR9 に拘束される T 細胞エピトープ(p77-85; EYNIALGQR)を同定した。さらにサイトカイン産生パターンの検討により、IgA の分化誘導に重要な IL-5、IL-6、TGF-γ の産生が認められ、IgA を介した感染防御の面でも有用な免疫応答と考			

えられた。

本研究では、日本人にも、世界的にも頻度の高い DR4 および DR15 を有するドナーにおいて、P6 特異性 T 細胞株を樹立し、T 細胞エピトープと HLA の関係を検討する。また、ワクチン候補となりうるペプチドを反応させた T 細胞株を樹立し、その免疫応答について検討する。

材 料 ・ 方 法

1. 対象

HLA-DR15 を有するドナー1名 (DR15/15) , DR4 を有するドナー2名 (DR4/9 および DR4/13) , 計 3 名の健康成人を対象とした。採血に当たってはインフォームドコンセントを得た。

2. P6 の抽出

Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi 1479 strain) を液体培地で 101 まで培養し、Murphy ら (2) の報告に基づき、P6 を抽出した。蛋白量は BCA 法にて定量した。エンドトキシンは測定感度以下であった。

3. オーバーラッピングペプチドの作製

P6 のアミノ酸配列を基に 15 残基ずつ、前後 5 残基ずつ重複するように 13 種類のペプチドを作製した。ペプチドの陰性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。

4. P6 反応性 T 細胞株およびペプチド反応性 T 細胞株の樹立

樹状細胞を抗原提示細胞として CD4 陽性 T 細胞を P6 (1 μ g/ml) で刺激し、P6 特異的 T 細胞株を樹立した。T 細胞株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は [³H]-thymidine の取り込み能で評価し、T 細胞エピトープを含むペプチドを検討した。さらに T 細胞株エピトープを含むと考えられるペプチド (3 μ g/ml) を反応させたペプチド反応性 T 細胞株を樹立した。

5. T 細胞株の HLA 拘束性の検討

HLA class I、DR、DQ をそれぞれ抗ヒト HLA class I 抗体 (IMMUNOTECHBD 社製)、抗ヒト HLA-DR 抗体 (BD Biosciences 社製)、抗ヒト HLA-DQ 抗体 (IMMUNOTECH 社製) でブロックした PBMC を抗原提示細胞として T 細胞株のリンパ球増殖反応を解析し、さらに異なる HLA 抗原型を有する B 細胞株を抗原提示細胞とした増殖反応を検討することで、T 細胞株の反応に関わる HLA-DR 分子を同定した。

6. サイトカイン産生パターンの検討

末梢血単核球を抗原提示細胞として樹立された T 細胞株と P6 (1 μ g/ml) あるいはペプチド (3 μ g/ml) を共培養して 12, 24, 48, 72 時間後の上清を回収した。上清中のサイトカイン、Human gamma interferon (IFN- γ)、interleukin (IL)-4、IL-5、IL-6、transforming growth factor (TGF)- β を ELISA 法により定量した。

7. SYFPEITHI により選択されたワクチン候補ペプチドにおける検討

複数の DR への結合性の高さをスコア化したソフトウェア SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) (3) を用いて、DR4、DR15 へのスコアが高く、他の DR への結合性も高いペプチド P42-56、P45-59、P30-44 を選び、それぞれで刺激した ($3\mu\text{g/ml}$) T 細胞株を樹立した。これらの T 細胞株の P6 への反応を確認、HLA 拘束性を検討し、また、サイトカイン測定による T 細胞免疫応答の解析を行った。

成 績

1. P6 特異的 T 細胞株の樹立とその HLA 拘束分子の検討

HLA-DR15 を有するドナーから P71-85 反応性 T 細胞株および P41-55 反応性 T 細胞株が樹立され、ともに DR15 拘束性であった。DR4/9 を有するドナーからは複数のペプチドとともに P41-55 に反応する T 細胞株が樹立された。

2. P41-55 反応性 T 細胞株の樹立と HLA 拘束分子の検討

DR4 を有するドナー 2 名 (DR4/9、DR4/13) において、P41-55 反応性 T 細胞株を樹立した。それぞれ P6 にも反応を示し、ともに DR4 により増殖反応が拘束されていた。

以上の結果より、DR15 を有するドナーの T 細胞株のエピトープは P41-55、P71-85 に存在し、DR4 を有するドナーの T 細胞株のエピトープは P41-55 に存在することが示された。

3. サイトカイン産生パターンの検討

DR15 を有するドナーの P41-55 反応性 T 細胞株および P71-85 反応性 T 細胞株、DR4/9 を有するドナーおよび DR4/13 を有するドナーの P41-55 反応性 T 細胞株のサイトカイン産生パターンを検討した。すべての T 細胞株で Th1 応答に有益な IFN- γ の産生が認められ、IL-4 は測定感度以下であった。また、DR15 を有するドナーの P41-55 反応性 T 細胞株では IL-5、IL-6、TGF- β の産生、DR15 を有するドナーの P71-55 反応性 T 細胞株および DR4 を有する 2 ドナーの P41-55 反応性 T 細胞株では IL-6、TGF- β 産生が認められ、IgA の誘導産生に關与するサイトカインの産生が確認された。

4. SYFPEITHI により選択されたワクチン候補ペプチドにおける検討

DR4 を有するドナーより P42-56 反応性 T 細胞株、DR15 を有するドナーより P45-59 反応性 T 細胞株および P30-44 反応性 T 細胞株が樹立され、それぞれ P6 への反応が確認された。これらの T 細胞株におけるサイトカイン産生は、ペプチド刺激でそれぞれ Th1 応答に有益な IFN- γ の産生が認められ、IL-4 は測定感度以下であった。また IgA の誘導産生に關与する IL-5、IL-6、TGF- β の産生も認められた。

考 案

本研究では、インフルエンザ菌 P6 外膜蛋白の HLA-DR4 分子および DR15 分子に拘束される T 細胞エピトープを含むペプチドを同定した。これまでに DR9 拘束性 T 細胞エピトープを含むことが示されていた P71-85 は DR15 拘束性 T 細胞エピトープも含むことが明らかとなった。さらに、P41-55 は DR4 および DR15 拘束性

T細胞エピトープを含むことが示された。

さらに、HLA への結合性の高さを予測するソフト (SYFPEITHI) により選択されたペプチドでは、DR15 を有するドナーより P45-59、P30-44 反応性 T 細胞株、および DR4 を有するドナーより P42-56 反応性 T 細胞株を樹立することができ、それぞれの T 細胞株は P6 への反応性を有していた。従って、P42-56、P45-59 および P30-44 は、DR4、DR15 のみならず、複数の HLA に対応可能なペプチドワクチン候補と考えられた。

また、サイトカイン産生パターンの検討において、これらすべてのペプチド刺激により Th1 応答に有益な IFN- γ の産生が認められ、細菌感染に対して殺菌的な免疫応答を誘導することが可能であると考えられた。さらに、IgA の分化誘導に重要な IL-5、IL-6、TGF- γ の産生も認められることから、IgA を介した感染防御の面でも有用な免疫応答を誘導すると考えられた。

先にも述べたように、筆者らは、エピトープペプチドの重合によって蛋白そのものを用いたワクチンに比べて副反応が少なく、より効果的な免疫応答を誘導するワクチンを開発することを目標としている。

今回までに明らかとなった、DR4、DR15 および DR9 に反応したこれらのエピトープペプチドを組み合わせることにより、複数の HLA に対応可能な、つまり多くの対象に有効なペプチドワクチン候補を導くことが可能であり、将来的なインフルエンザ菌感染に対するペプチドワクチン開発の可能性が示唆された。

結 論

1. インフルエンザ菌 P6 外膜蛋白の HLA-DR4 分子および DR15 分子に拘束される T 細胞エピトープを含むペプチド (P41-55, P71-85) を同定した。
2. エピトープのペプチドにより Th1 応答に有益な IFN- γ の産生が認められ、細菌感染に対して殺菌的な免疫応答の誘導が期待できた。IgA 産生に関与するサイトカイン IL-5、IL-6、TGF- γ の産生も認められ、IgA を介した感染防御の面でも効果が期待できた。
3. HLA への結合性の高さを予測するソフト (SYFPEITHI) を参考にペプチドを選択、DR15 を有するドナーよりペプチド (P45-59、P30-44) 特異的な T 細胞株、および DR4 を有するドナーより P42-56 特異的な T 細胞株を樹立した。
4. それぞれの T 細胞株は P6 への反応性を有していたことから、P42-56、P45-59、P30-44 は、DR4、DR15 のみならず、複数の HLA に対応可能なペプチドワクチン候補と考えられた。

以上の結果より、これらのペプチドを利用したインフルエンザ菌に対するペプチドワクチン療法の開発が可能であると考えられた。

引用文献

1. Harabuchi, Y., H. Faden, N. Yamanaka, L. Duffy, J. Wolf, and D. Krystofik. Nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* and recurrent otitis media.

Tonawanda/Williamsville Pediatrics. J Infect Dis 170:862, 1994.

2. Murphy, T. F., and M. A. Apicella. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection. Rev Infect Dis 9:1. 1987.
3. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics. 50(3-4):213-9, 1999.

参考文献

1. Nomura Y, Ishibashi T, Yano J, Shinogami M, Ichikawa T, Shinogami M, Monobe H, Hirai R, Kaga K. Effect of myringotomy on prognosis in pediatric acute otitis media. : Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2005 ;69(1):61-4
2. Monobe H, Ishibashi T, Nomura Y, Shinogami M, Yano J. Role of respiratory viruses in children with acute otitis media. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2003 Jul; 67(7):801-6.
3. Ishibashi T, Monobe H, Nomura Y, Shinogami M, Yano J. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction for respiratory viruses in acute otitis media. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2003; 112(3):252-7.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	野村 由香
審査委員長 若 宮 信 隆 ㊞ 審査委員 原 淵 保 明 ㊞ 審査委員 小 林 博 也 ㊞			
学 位 論 文 題 目 Candidate-Peptides of P6 outer membrane protein for the vaccine of nontypeable <i>Haemophilus Influenzae</i> (邦題：インフルエンザ菌P 6外膜蛋白におけるワクチン候補ペプチドの検討)			
夾膜をもたない、インフルエンザ菌は、肺炎球菌などと並んで、小児反復性中耳炎の3大起炎菌のひとつであり、成人の慢性閉塞性肺疾患における急性増悪に起炎菌としても重要である。そのなかでインフルエンザ菌P 6外膜蛋白は、ワクチン療法の責任抗原として、注目されているが、小児の中耳炎患者における抗原に対する、特異免疫応答の脆弱さが指摘されてきた。 論文提出者は、このインフルエンザ菌P 6外膜蛋白において、その内部に存在するペプチドエピトープの存在を明らかにし、そのエピトープペプチドの重合による、より優れたワクチンの開発を目指し、以下の研究を行った。 方法としては、インフルエンザ菌P 6外膜蛋白において、アミノ酸配列を元に前後5アミノ残基ずつを重複した15残基ペプチドを作成し、インフルエンザ菌P 6外膜蛋白反応性のT細胞株を樹立し、本細胞株における認識エピトープを探索した。さらに、これらのT細胞株のHLA拘束性をそれぞれの抗体を用いて、リンパ球増殖試験で検討した。また、それらのT細胞株において、抗原刺激において、どのようなサイトカインや因子が誘導されるかを、培養上清を用いたELISA法により測定した。最後に、複数のHLA結合能を解析できるソフトであるSYFPEITHI法を用いる			

方法をインフルエンザ菌P 6外膜蛋白に応用し、ワクチン候補となりうる、アミノ酸の配列を選別し、それらのペプチドを反応させたT細胞株を樹立し、免疫応答となる種々のサイトカインの発現について検討をした。

その結果として、あらたなインフルエンザ菌P 6外膜蛋白のペプチド抗原(P 4 1-5 5)となりうる配列を明らかにし、それらが、HLA-DR 4, 1 5分子拘束性であることを明らかにした。また、同時にこれまでHLA-DR 9拘束性であった、ペプチド抗原であったP 7 1-8 5が、HLA-DR 1 5拘束性であるT細胞エピトープを含むことも明らかにした。

さらに、新規の抗原エピトープを探索する方法として、用いたSYFPEITHI法での探索で発見されたエピトープP 3 0-4 4, P 4 2-5 6, P 4 5-5 9は、HLA-DR 4, 1 5の複数のHLAに対応できるペプチド抗原になりうることを明らかにした。

また、サイトカイン産生については、多くのT細胞株においては、Th 1応答に有益なIFN- γ の産生を認め、さらにIL-6, 5, TGF- β などの産生が確認されたことより、Ig A誘導への可能性が示唆された。

以上のことから、本研究での新しい発見は、インフルエンザ菌P 6外膜蛋白において、その内部に存在する新たなペプチドエピトープの存在を明らかにし、そのエピトープペプチドがIg A抗体を誘導する可能性のある、優れたワクチンの候補であることを見出したこと。さらに、従来の方法にとらわれない、新規のHLA結合を予測できるソフトの有用性を実際に応用し、新たなエピトープペプチドの発見を明らかにした点にある。これらの得られた知見は今後、インフルエンザ菌P 6外膜蛋白における、優れたワクチン開発に役立つ可能性があり、臨床的に非常に意義深いと考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。