

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	石田 芳也
学 位 論 文 題 目			
Epitope Analysis of P6 Outer Membrane Protein of Non-Typeable Haemophilus Influenzae (邦題：インフルエンザ菌 P6 外膜蛋白における抗原決定基の解析)			
共 著 者 名			
安部 裕介			
柳内 充			
小林 博也			
原 渕 保明			
(未 公 表)			
I. 研究目的			
<p>莢膜を持たないインフルエンザ菌 (Nontypeable Haemophilus influenzae) は小児反復性中耳炎の三大起炎菌の一つであるとともに、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。P6 外膜蛋白はすべてのインフルエンザ菌に共通であり、感染防御抗体の標的抗原となっていることからワクチン療法の責任抗原部位として注目されている (1, 2)。近年、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は新しい治療方法として注目されている。これらのエピトープを含むペプチドを幾つか組み合わせることにより、従来の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の開発が可能と考えられている。しかし、ヒトにおける P6 の T 細胞エピトープは未だ報告されていない。</p> <p>本研究では、P6 のアミノ酸配列を基に、一部重複させた 13 種類のオーバーラッピングペプチドを作成し、健康人末梢血リンパ球を用いて、P6 の T 細胞エピトープ解析を行った。さらにそのエピトープのアミノ酸配列を一部置換させたペプチドに対する T 細胞の応答を解析し、より効果的な T 細胞の反応を惹起しうるエピトープペプチドを検索した。</p>			

II. 材料・方法

1. 末梢血リンパ球

健康成人 17 名の末梢血リンパ球を用いた。そして、提供者の HLA 抗原型を同定した。採血、HLA 抗原型の同定にあ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 (3) の報告に基づいて 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. CD4 陽性 T 細胞のリンパ球増殖反応の検討

末梢血より比重遠心法にて単核球を分離後、MACS カラム (Miltenyi 社製) を用いて CD14 陽性細胞を分離し、GM-CSF、IL-4 添加 10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 培地にて 7 日間培養して樹状細胞を得た。CD4 陽性 T 細胞も MACS カラム (Miltenyi 社製) を用いて末梢血単核球より分離した。誘導した樹状細胞を抗原提示細胞とし、CD4 陽性 T 細胞の P6 および P6 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を [³H]-thymidine の取り込み能で評価した。結果は抗原なしの cpm を 1.0 とした Stimulation Index (SI) で表した。

5. P6 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 で刺激した。1 週毎に放射線照射した末梢血単核球を抗原提示細胞として P6 で繰り返し刺激、増殖させ、P6 に特異的に反応する T 細胞株を樹立した。P6 に特異的に反応する細胞株を選択し P6 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を [³H]-thymidine の取り込み能で評価した。

6. 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た。更に詳細な拘束 HLA 分子を同定するために異なる HLA 抗原型を有する B 細胞株を抗原提示細胞として増殖反応を行った。

7. T 細胞エピトープのアミノ酸配列の同定

エピトープが含まれていると考えられた 15 残基のアミノ酸を 1 残基ずつずらした 14 種類のペプチドを

新たに合成し、T細胞株の増殖反応を検討することでエピトープペプチドのアミノ酸配列を同定した。

8. 置換ペプチドに対するリンパ球増殖反応の解析

同定されたエピトープのアミノ酸配列を置換したペプチドに対する T 細胞株の増殖反応を解析した。まず、抗原の認識に重要なアミノ酸配列を検討する為に親水性や疎水性などのアミノ酸の性質を逆転させるように各アミノ酸を 1 残基置換した 9 種類のペプチドを用意し、それぞれに対する増殖反応を検討した。さらに本来の配列よりもより強い抗原性をもつ置換ペプチドを同定する為に、アミノ酸の性質を保存したまま置換したペプチドを 9 種類用意し、そのリンパ球増殖反応を検討した。

9. 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、エピトープペプチド、置換ペプチドを共培養して 48 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。

III. 成績

1. オーバーラッピングペプチドを用いた健常成人 17 例のリンパ球増殖反応

SI が 2 以上かつ陰性コントロールペプチドより高い反応を示すペプチドが、インフルエンザ菌 P6 蛋白の T 細胞増殖に関わる重要なエピトープペプチドになると考えられた。それらの中の数種類のペプチドは多くのドナーの末梢血リンパ球に反応した。日本人に多い HLA-DR9 を有する 6 名のドナーに注目すると複数のドナーが、DR9 に結合するとされているアミノ酸配列を持つ p51-65、p71-85 などのペプチドに反応を示していた。これらのドナーにおいては HLA-DR9 を介して、T 細胞が抗原 (ペプチド) を認識していることが推測された。以上の結果より DR9 を有する 2 名のドナーに注目し以下の検討を進めた。

2. P6 反応性 T 細胞株の樹立とその HLA 拘束分子の検討

DR9 を有する 2 名のドナーより P6 反応性 T 細胞株を樹立しその反応性を検討した。NO. 4 のドナーからは p51-65 に特異的に反応する T 細胞株 (YAS) が樹立された。NO. 8 のドナーからは p71-85 に特異的に反応する T 細胞株 (YILY) が樹立された。共に HLA-DR9 により増殖反応が拘束されていた。以上の結果よりこの 2 つの T 細胞株のエピトープはそれぞれ p51-65、p71-85 に存在し、共に DR9 によって T 細胞株に提示されることが示された。

3. T 細胞エピトープのアミノ酸配列の同定

T 細胞株 (YILY) のエピトープのアミノ酸配列を同定するために p71-85 のアミノ酸配列をもとに一残基ずつずらした 14 種類のペプチドを用意し、このペプチドに対する T 細胞株 (YILY) のリンパ球増殖反応を検討した。SI5.0 以上の反応が得られたペプチドに共通したアミノ酸配列 (p77-85; EYNIALGQR) がこの T 細胞株のエピトープと同定された。

4. 置換ペプチドに対するリンパ球増殖反応の検討

エピトープのアミノ酸配列の中で抗原の認識に重要なアミノ酸配列を検討する為に親水性、疎水性などのアミノ酸の性質を逆転させるように各アミノ酸を置換した 9 種類の置換ペプチドを用意し、それぞれに対する増殖反応を検討した。E77A(77 番を E(グルタミン酸) から A(アラニン)に置換したペプチド)、Y78A、N79A、A81S、G84A、Q85A で増殖反応が低下した。そのうち 78 番 Y(チロシン)と 81 番 A(アラニン)のアミノ酸配列が DR9 結合モチーフとされているため、77 番 E(グルタミン)、79 番 N(アスパラギン酸)、84 番 G(グリシン)、85 番 Q(グルタミン酸)が T 細胞の抗原認識に重要であると考えられた。

また、本来の配列よりもより強い抗原性をもった置換ペプチドを同定する為にエピトープのアミノ酸の性質を保存したまま置換したペプチドを 9 種類用意し、T 細胞株のリンパ球増殖反応を検討した。その結果 E77D、N79G で本来の配列よりも 1.5 倍以上の強い増殖反応が誘導された。

5. サイトカイン産生パターンの検討

この T 細胞株 (YILY) のサイトカイン産生パターンを検討した。P6 刺激、または p71-85 のペプチドによる抗原刺激では IFN- γ の産生が認められた。IL-4 は測定感度以下であり Th1 応答が誘導されていた。また IgA の誘導産生に関与する IL-5、IL-6、TGF- β の産生も認められた。

さらに置換ペプチドによるサイトカイン産生の変化も検討した。IFN- γ は E77D、N79G、R85K で本来の配列よりも産生量が増加した。IL-4 は測定感度以下だったが、I80L では IL-5 と IL-6 の産生が亢進し、N79G、R85K では TGF- β の産生が増加した。

IV. 考案

本研究ではインフルエンザ菌 P6 外膜蛋白の T 細胞エピトープを同定し、このエピトープは HLA-DR9 を介してリンパ球増殖反応を拘束していることを見出した。さらにこのエピトープのアミノ酸配列を一部置換することでより強いリンパ球増殖反応を誘導し、感染防御に有用なサイトカインの産生を増強することが示された。

これまでの研究で P6 がインフルエンザ菌に対するワクチン療法の標的抗原として注目されている(1-3)。P6 そのものを抗原としたワクチン療法も検討されているが、P6 単独では免疫原性が弱く、強い免疫応答を誘導するアジュバントとともに投与する必要があること、蛋白そのものでは免疫応答に関与しないアミノ酸が含まれているために副反応の危険性があることなど問題も多い。そこで本研究では副反応が少なくより強い免疫応答を誘導できるペプチドワクチン療法の開発に必要な、P6 外膜蛋白のエピトープペプチド解析を行った。本研究で明らかにされたエピトープは日本人に多い HLA class II 分子の一つである HLA-DR9 分子を介してリンパ球増殖反応を惹起していたことから、このエピトープのアミノ酸配列は HLA-DR9 の保有者に有効なペプチドワクチン抗原の一つと考えられた。このペプチドにより IFN- γ を介した Th1

応答が誘導されており、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。また、IgA の分化誘導に重要な IL-5、IL-6、TGF- β の産生も認められ、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。さらにこのエピトープのアミノ酸配列を一部置換することでより強い免疫応答を誘導し、サイトカインの産生増加と産生パターンの変化を可能にした。以上のことから、P6 のエピトープペプチドと有用な免疫応答の得られる置換ペプチドを組み合わせることで、より有効なペプチドワクチンとすることが可能であり、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考えられた。

V. 結論

1. インフルエンザ菌 P6 外膜蛋白の T 細胞エピトープを同定した。
2. そのエピトープは HLA-DR9 分子を介してリンパ球増殖反応を拘束していた。
3. エピトープのペプチドに対して IFN- γ を優位に産生する Th1 応答が誘導されていた。
4. エピトープのペプチドに対して IgA 産生に関与する IL-5、IL-6、TGF- β の産生も認められた。
5. エピトープのアミノ酸配列を一部置換することでより強く効果的な免疫応答の誘導が可能であった。

以上の結果よりこのエピトープのアミノ酸配列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。

VI. 参考文献

1. Harabuchi, Y., H. Faden, N. Yamanaka, L. Duffy, J. Wolf, and D. Krystofik. 1994. Human milk secretory IgA antibody to nontypeable *Haemophilus influenzae*: possible protective effects against nasopharyngeal colonization. *J Pediatr* 124:193.
2. Harabuchi, Y., H. Faden, N. Yamanaka, L. Duffy, J. Wolf, and D. Krystofik. 1994. Nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* and recurrent otitis media. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. *J Infect Dis* 170:862.
3. Murphy, T. F., and M. A. Apicella. 1987. Nontypable *Haemophilus influenzae*: a review of clinical aspects, surface antigens, and the human immune response to infection. *Rev Infect Dis* 9:1.