



Title	遺伝子導入技術を基盤としたワクチンの粘膜免疫応答に関する研究
Author(s)	庄司, 正樹
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59406
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【2】

氏 名	しょうじ まさき 樹 庄 司 正 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学 位 記 番 号	第 2 5 1 6 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学 位 論 文 名	遺伝子導入技術を基盤としたワクチンの粘膜免疫応答に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 水口 裕之 (副査) 教 授 中川 晋作 教 授 辻川 和丈 教 授 藤尾 慈

論 文 内 容 の 要 旨

世界中で新興・再興感染症が猛威を振るっており、これらの対策及び克服は世界共通の最重要課題である。新興・再興感染症の多くは、粘膜面を初期感染部位とし、宿主に侵入後、全身へと広がる粘膜感染症である。そのため、これら病原微生物に対する有効なワクチンとして粘膜面に免疫応答を誘導可能なワクチンが待望されている。粘膜投与型ワクチンは、全身と粘膜面へ同時に病原微生物特異的な強い免疫応答を誘導させ、「粘膜と全身での二段構えの感染防御」を達成できる。しかしながら、その免疫誘導能は非常に弱く実用化されている例は極めて少ない。一方、従来の全身投与型ワクチンは全身に強い抗原特異的な免疫応答を誘導できるが、粘膜面に抗原特異的な免疫応答を誘導できないため、粘膜感染症への応用は難しいとされてきた。ところ

が近年、遺伝子ワクチンを用いて抗原遺伝子を生体内で発現させることで「全身系への投与にも拘らず強い粘膜免疫を誘導できる」ということを示唆する報告がされた。したがって、遺伝子ワクチンによる搭載抗原特異的な粘膜免疫誘導能及びその詳細なメカニズムを解析することによって、全身系へのワクチン投与により粘膜免疫が誘導できる新規ワクチンやアジュバント開発につながる知見を得られるのではないかと考えた。そこで本研究では、免疫担当細胞の挙動や性質を自在に制御することで強力な粘膜免疫を誘導できるような理想的な全身投与型ワクチンやアジュバントの開発を目指し、遺伝子導入技術を用いたワクチンの粘膜免疫誘導能の評価及びそのメカニズムを解明することを試みた。

抗原遺伝子発現カセットを搭載したプラスミドDNAワクチンを使用し、その抗原特異的な腸管粘膜免疫誘導能とその分子メカニズムについて検討を行った。まず、抗原遺伝子発現カセットを搭載したpDNAをマウスの大腿四頭筋へエレクトロポレーション (e.p.)法により遺伝子導入し (pDNA e.p.筋肉内導入法)、全身系及び腸管粘膜に搭載抗原特異的な免疫応答を誘導できるかを評価した。その結果、全身だけでなく腸管粘膜にも抗原特異的なCD8⁺T細胞及び液性免疫応答 (IgG, IgA)を誘導可能であることを明らかとした。全身系投与により腸管粘膜免疫が誘導された理由として、活性化された抗原特異的なT細胞及びB細胞が腸管粘膜面へ移動した可能性が考えられるが、それにはビタミンAの代謝産物であるレチノイン酸 (RA)による作用が必須であることが明らかにされている。また、自然免疫活性化により産生されるGM-CSFが樹状細胞 (DC)に作用すると、RA合成酵素遺伝子群の発現が上昇しRA合成が促進され、DCが産生するRAを受け取ったリンパ球は、腸管粘膜ホーミング分子を発現するようになり腸管粘膜への遊走能を獲得することも知られている。したがって、pDNA e.p.筋肉内導入法によって自然免疫応答活性化及びRA合成の促進が引き起こされ、活性化された抗原特異的なT細胞における腸管粘膜ホーミング分子の発現が促進されているのではないかと考えた。そこで、まず初めに、投与部位の所属リンパ節である鼠径部リンパ節における自然免疫関連サイトカイン (I型IFN (IFN- α , β)及びGM-CSF))及びRA合成酵素遺伝子群 (*Aldh1a1*, 2, 3)のmRNA発現について検討した。その結果、pDNA e.p.筋肉内導入法は、I型IFNやGM-CSF等の自然免疫応答活性化及びRA合成を促進することで、誘導された抗原特異的なCD8⁺T細胞における腸管粘膜ホーミング分子発現を促進することが示唆された。また、粘膜面でも液性免疫応答が誘導されていたことから、同様の現象はB細胞においても同様に起きていると予想された。したがって、DNAワクチン投与後惹起されるI型IFNが腸管粘膜への抗原特異的な免疫応答の誘導に重要な役割を担っていると示唆された。

次に、DNAワクチン投与時と同様のメカニズムがAdベクターワクチンの場合にも関与しているのではないかと考えた。そこで、Adベクターワクチンによる腸管粘膜免疫の誘導に対するI型IFNシグナルの重要性について、AdベクターによるI型IFN産生に関与する自然免疫シグナル分子であるIPS-1を欠損したマウス (IPS-1^{-/-}マウス)及びI型IFN受容体の β 鎖を欠損させたマウス (IFNAR2^{-/-}マウス)を用いて検討した。その結果、IPS-1^{-/-}マウス及びIFNAR2^{-/-}マウスにおいて、wild-type (WT)マウスと比較し抗原特異的なCD8⁺T細胞頻度は全身系では同等であったが、腸管粘膜では有意に減少した。これにより、IPS-1及びI型IFNシグナルがAdベクターワクチンの筋肉内投与後惹起される全身ではなく腸管粘膜への抗原特異的なCD8⁺T細胞応答の誘導に必要であるこ

とが判明した。さらに、IPS-1- α マウス及びIFNAR2- α マウスにおいて、wild-type (WT) マウスと比較しDLNでのRA合成酵素発現の誘導及び腸間膜リンパ節 (MLN) DCにおけるRA合成活性が減少していたことから、DLNでのRA合成酵素発現の誘導及び腸間膜リンパ節 (MLN) DCにおけるRA合成の促進にI型IFNシグナルが寄与することが示された。これらの現象は、抗原特異的なCD8⁺T細胞における腸管遊走分子の発現を促進し、Adベクターワクチンにより誘導された抗原特異的なCD8⁺T細胞における腸管遊走能の獲得に貢献すると推察される。

これまでの自然免疫応答に関する研究から、核酸を認識する自然免疫受容体が種々同定されてきている。さらに、これらの核酸認識受容体によって自然免疫系が活性化されることでI型IFNの産生が誘導され、獲得免疫応答の活性化に繋がることが明らかにされている。このような知見に基づき、本研究においては遺伝子ワクチンがI型IFNの産生を誘導可能であり、それが腸管粘膜免疫応答を誘導する一因であることを示した。従来の病原体タンパク質やペプチドによるワクチンでは腸管粘膜免疫応答を誘導できないが、これは核酸のようにI型IFN産生を誘導するような機構が存在しないことによるのではないかと考えられる。

現在、新興・再興感染症に対するワクチンの開発は世界中で行われており、数多くの候補が開発されている。しかしながら、HIVやインフルエンザウイルス等の人類に脅威的な粘膜感染病原微生物を撲滅可能な有効なワクチンの開発には至っていないのが現状である。本研究で示した結果は、遺伝子ワクチンによって全身投与型ワクチンでも粘膜免疫を誘導し、粘膜感染症に対抗しうる新規ワクチンやアジュバント開発に貢献できると考えている。また、遺伝子を基盤としたワクチンは迅速かつ大量に様々な抗原に対するワクチン調製が可能であるため、今後新たにどのような粘膜感染症が出現しても即時に対応可能であり、新興・再興感染症に対して有効な対抗策となることが強く期待できる。

論文審査の結果の要旨

世界中で新興・再興感染症が猛威を振るっており、これらの多くは粘膜を初期感染部位とする粘膜感染症である。従来の全身投与型ワクチンは、全身に強い抗原特異的な免疫応答を誘導できるが粘膜面に抗原特異的な免疫応答を誘導できないため、粘膜感染症への応用は難しいとされてきた。ところが近年、遺伝子ワクチンを用いて抗原遺伝子を生体内で発現させることで全身系への投与にも拘らず強い粘膜免疫を誘導できることを示唆する報告がなされた。したがって、遺伝子ワクチンによる搭載抗原特異的な粘膜免疫誘導能及びその詳細なメカニズムを解析することは、全身系へのワクチン投与により粘膜免疫が誘導できる新規ワクチンやアジュバント開発につながる知見を得られると期待される。本研究では、遺伝子導入技術を用いたワクチンの粘膜免疫誘導能の評価及びそのメカニズムを解明することを試み、以下のような結論を得た。

1. pDNA e. p. 筋肉内投与法によって、全身のみならず腸管粘膜においても抗原特異的な細胞性免疫応答及び液性免疫応答を誘導できることを明らかとした。
2. pDNA e. p. 筋肉内投与法により投与部位近傍の所属リンパ節内でのI型IFN及びGM-CSF、レチノイン酸合成酵素の発現上昇が認められた。これによりレチノイン酸が多く産生されることとなり、誘導された抗原特異的なT細胞あるいはB細胞における β_2 インテグリンの発現が上昇し、腸管粘膜面への遊走が誘導されることが示唆された。
3. I型IFNシグナルは、Adベクターワクチン筋肉内投与による所属リンパ節でのGM-CSF発現とレチノイン酸合成酵素の発現上昇を促進することを明らかにした。また、筋肉組織から鼠径

部リンパ節へのDCの移入に寄与する可能性を示した。

4. Adベクターワクチン投与後の腸管膜リンパ節のCD103⁺DCにおけるレチノイン酸合成活性がI型IFNシグナルに依存することを明らかにした。
5. Adベクターワクチンの筋肉内投与による腸管粘膜面への抗原特異的なCD8⁺T細胞の誘導に、上記のI型IFNシグナル依存的なメカニズムが関与する可能性を示した。

以上、本研究では、遺伝子ワクチンの全身投与による腸管粘膜免疫の誘導及びI型IFNシグナルがその誘導メカニズムの鍵であることを示す結果を得た。本研究で解明した遺伝子ワクチンの抗原特異的な腸管粘膜免疫誘導能及びそのメカニズムが、遺伝子導入技術を基盤としたワクチンの粘膜感染症への応用や全身投与型ワクチンでも粘膜免疫を誘導できるようなアジュバントの開発に貢献できることを期待するものであり、極めて意義深く、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。