

氏 名	永 田 智 也
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 8 0 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses (表 面 に ペ プ チ ド を 結 合 し た リ ポ ソ ー ム に よ る イ ン フ ル エ ン ザ 感 染 防 御)
審 査 委 員	主 査 教 授 後 藤 敏 副 査 教 授 鳥 居 隆 三 副 査 教 授 西 克 治

論文内容要旨

※整理番号	585	(ふりがな) 氏名	永田 智也
学位論文題目	<p>Peptides coupled to the surface of a kind of liposome protect infection of influenza viruses (表面にペプチドを結合したリポソームによるインフルエンザ感染防御)</p>		
<p>【研究の目的】</p> <p>我々の過去の研究で Oleoyl liposome (dioleoyl phosphatidyl choline, dioleoyl phasphatidyl ethanolamine, dioleoyl phosphatidyl glycerol acid および cholesterol が 4:3:7:2 molar の比率で構成されている) と OVA (卵白アルブミン) の結合体は OVA 特異的な IgE 抗体産生をすることなく、OVA 特異的な IgG 抗体産生を引き起こすことが明らかになっている。さらに OVA₂₅₇₋₂₆₄ (OVA タンパクに含まれる MHC class I 抗原ペプチド) を表面に結合した Oleoyl liposome (OVA₂₅₇₋₂₆₄-Oleoyl liposome) は CpG によって CTL (細胞障害性 T リンパ球) 反応を引き起こし、マウスにおいて E. G7 腫瘍を拒絶することが分かっている。今回の研究で我々は、ペプチド-Oleoyl liposome 結合体が、マウスの肺でのインフルエンザウイルス感染に対する防御能があるかどうかをテストし、ワクチンとして有効であるかどうかを検証した。</p> <p>【方法】</p> <p>実験はいずれもマウスを用いて行った。</p> <p>1. リポソーム製剤に含まれるペプチドはいずれも OVA₂₅₇₋₂₆₄ を用いて行った。Oleoyl liposome と他の liposome 製剤 (Multilamellar liposome および PS-Oleoyl liposome) 、また CpG と他の免疫刺激物質 (Poly (I:C)、LPS、CpG、Flagellin がそれぞれ TLR3、4、9、5 を刺激する) を比較し、抗原特異的な免疫反応に有用であることを in vivo CTL assay を用いて CTL 反応を確認した。さらに Oleoyl liposome と CpG を組み合わせた免疫が CD40 刺激に依存するかどうかを、同じく in vivo CTL assay を用いて確認した。</p> <p>2. インフルエンザの構成成分であるヌクレオプロテイン中のヌクレオペプチド NP₃₆₆₋₃₇₄ (MHC class I 抗原) と結合させた Oleoyl liposome (NP₃₆₆₋₃₇₄-Oleoyl liposome) を作成し、CpG とともにワクチネーション (皮下注射) した。その後インフルエンザウイルスによる攻撃試験 (鼻腔感染) を行い、in vivo CTL assay を用いて CTL 反応の確認を。また MDCK cell を用いたプラークアッセイを行ってウイルス排除能を確認した。さらに攻撃試験後の血清中 IgG および IgE 値を、ELISA 法を用いて測定した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

1. Oleoyl liposome による免疫は Multilamellar liposome (Fig. 1A) によるものよりも高い CTL 反応を示し、PS-Oleoyl liposome (Fig. 1B) と同等の CTL 反応を示した。また CpG を同時投与しない免疫方法では CTL 反応は発現せず、この現象は CD40 の刺激の有無に依存しなかった (Fig. 2)。Oleoyl liposome と各種免疫刺激物質をそれぞれ同時投与した場合、Poly (I:C) と CpG で高い CTL 反応が見られ (Fig. A)、Fragellin では中程度の CTL 反応が見られた (Fig. 3B)。LPS では CTL 反応は見られなかった (Fig. 3AB)。

2. ワクチネーションを行ったマウス群において、攻撃試験 7 日後で高い CTL 反応が認められ (Fig. 4A)、攻撃試験 5 日後のマウス肺において高いウイルス排除能が認められた (Fig. 4B)。また攻撃試験 5 日後の血清 IgG 値はワクチネーション群の方が高く、血清 IgE 値は両群とも低く優位差は認めなかった。

【考察・結論】

CpG 存在下において、OVA₂₅₇₋₂₆₄-Oleoyl liposome は他の liposome 製剤に比べてより高い CTL 反応を示した。また NP₃₆₆₋₃₇₄-Oleoyl liposome を CpG とともに投与すると A 型インフルエンザウイルスに対する感染防御を示し、IgE 抗体を産生をすることなく IgG 抗体産生を引き起こした。

現在水酸化アルミニウムや MF95 などのアジュバントが臨床的に使用されているが、これらは液性免疫に対しての効果は知られているが、細胞性免疫には関与しないと言われている。さらにアルミニウムアジュバントは IgE 抗体産生を引き起こすことが知られており、ワクチンに対するアレルギー反応が危惧されている。

一方 CpG は抗原提示細胞である樹状細胞を TLR9 を通して刺激することができ、CTL を効率よく活性化できる。過去の研究では CpG による CTL 反応は CD4⁺T リンパ球非依存的であると報告されており、実際 CD4⁺T リンパ球の存在しない MHC class II 不全マウスに CpG と OVA₂₅₇₋₂₆₄-Oleoyl liposome を投与すると CTL 反応が認められた (データ未掲載)。

以上のことからペプチド-Oleoyl liposome 結合体をワクチンとして用いた場合、健全な生体のみならず CD4⁺リンパ球不全においてもアレルギー反応などの毒性を伴わない免疫賦活化が可能であることを示唆している。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	585	氏名	永田智也
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>Oleoyl liposome peptide ワクチンの有効性をマウスにおいて検討した。その結果、以下のことを明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) OVA(ovalbumin) peptide-Oleoyl liposome と CpG あるいは poly(I:C) の同時投与により細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の高い特異的細胞傷害能 (CTL 活性) を誘導できた。この誘導は、CD4+ T 細胞に依存しなかった。2) NP₃₆₆₋₃₇₄-Oleoyl liposome と CpG の同時投与により、インフルエンザウイルス特異的 CTL 活性を誘導できた。このペプチドワクチン接種によりウイルス増殖の抑制と抗ウイルス IgG 抗体の誘導が認められた。 <p>本研究は、インフルエンザウイルス感染に対する Oleoyl liposome peptide ワクチンの有効性を示した論文であり、博士 (医学) の学位を授与するに値すると認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 21 年 2 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 21 年 2 月 5 日)			