

論文の内容の要旨

論文題目

サルエイズモデルにおいて誘導される細胞傷害性 T 細胞の
T 細胞受容体遺伝子に関する研究

氏 名 栗原 京子

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) やサル免疫不全ウイルス (SIV) の複製抑制には、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が中心的役割を担っており、ウイルス特異的 CTL を誘導することはエイズワクチン開発において重要である。CTL 誘導型予防エイズワクチンは、ワクチン接種により抗原特異的メモリー細胞を誘導し、感染した際の体内ウイルス量を減らすことで、エイズ発症や感染伝播を防ぐ目的で開発が進められている。この CTL 誘導型ワクチンではウイルスベクターが有効な抗原デリバリーツールとして考えられており、所属研究室ではセンダイウイルス (SeV) ベクターを用いてビルマ産アカゲザルで効果的に SIV 特異的 CTL が誘導されることを確認している。

本研究では、ワクチン接種プロトコルの最適化に向け、SeV ベクターを用いて有効な抗原特異的 CTL を誘導することを目指して研究を行った。抗原特異的メモリー細胞を維持して、持続的に高い抗原特異的 CTL 頻度を維持する為には、ワクチンを複数回接種することが有効と考えられる。しかし、ウイルスベクターワクチンでは、事前のワクチン接種により誘導されているベクタ

一特異的免疫反応が、その後のワクチン接種での免疫誘導効果を妨げる可能性が危惧される。そこで、本研究では、まずビルマ産アカゲザルに SeV ベクターワクチンを複数回接種し、実験に使用した個体で同定されている主要なエピトープ (Gag₂₄₁₋₂₄₉) に焦点を絞り、複数回接種による抗原特異的 CTL 頻度の維持・上昇効果を確認した。また、抗 SeV 抗体の解析に加え、SeV 特異的 CTL 反応についての解析も行った。

ワクチン開発において、誘導される抗原特異的 CTL の頻度と同時に、ワクチン接種によりどのような CTL が誘導されているのかについて解析を行うことも重要である。近年の報告では、誘導される CTL の T 細胞受容体 (TCR) の種類がウイルス複製制御に重要である可能性が示唆されている。そこで、ワクチン複数回接種実験により Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL 頻度の維持・上昇効果が確認できたが、更に実際にワクチン接種により誘導されている CTL の種類 (TCR 遺伝子型) に関する情報を得ることが重要と考えた。しかし、本アカゲザルモデルにおける TCR 遺伝子型の情報解析系が無かった為、次に、この TCR 遺伝子型情報解析に結びつけるべく、SIV エピトープ特異的 CTL の TCR 遺伝子クローン樹立系を確立することとした。

I. ワクチン複数回接種により誘導される抗原特異的 CTL の頻度

ワクチン接種後に SIV を感染させ、ウイルス複製を制御してから 1 年以上が経過した主要組織適合遺伝子複合体クラス I (MHC-I) ハプロタイプ 90-120-Ia を共有するビルマ産アカゲザル 4 頭を用いた。このハプロタイプを共有する個体では、SIV の複製制御に Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL が深く関与していることが知られている。本研究では、この 4 頭に Gag あるいは Gag の一部を発現する SeV ベクターを 3 週間隔で経鼻接種と筋肉内接種を併用して 3 回接種し、Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL の頻度を解析した。また、SeV ベクターに対して誘導される免疫の影響も併せて考察することが重要と考え、ワクチン接種により誘導された SeV 特異的中和抗体と同時に SeV 特異的 CTL についても解析した。その結果、全ての個体において Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL の頻度は 2 度目のワクチン

接種後には最初のワクチン接種後と比較して維持・上昇していることが確認された。また、3 度目のワクチン接種後も、同様にワクチン接種による Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL 頻度の維持・上昇効果を確認することができた。本研究では SeV ベクターに対して誘導される中和抗体と CTL についても解析したが、2 度目と 3 度目のワクチン接種直前には、高いレベルで SeV 特異的中和抗体が誘導されていることが確認された。また、各ワクチン接種から 1 週後の SeV 特異的 CTL の頻度もワクチン接種を繰り返すことにより維持・上昇していることが認められた。

CTL 誘導型ワクチン開発において、持続的に抗原特異的 CTL の頻度を維持することは重要であるが、Gag を抗原とした SeV ベクターワクチンの単回接種では、Gag 特異的 CTL の頻度はワクチン接種から 1 週間辺りにピークに達し、数ヶ月後には検出できなくなる。その為、ワクチンを複数回接種しなかった場合は、最初のワクチン接種から週が経つにつれて抗原特異的 CTL の頻度が低下することが見込まれた。しかし、ワクチン接種を繰り返すことによる SeV 特異的中和抗体並びに CTL の誘導量の維持・増加が認められたものの、抗原特異的 CTL 頻度の維持・上昇効果も認められた。このことから、ワクチン複数回接種の有効性が示唆された。

II. SIV Gag エピトープ特異的 CTL の T 細胞受容体の再構築

MHC-I ハプロタイプ *90-120-Ia* を共有する SIVmac239 感染サル末梢血より分離したリンパ球から Gag₂₄₁₋₂₄₉ ペプチド刺激により樹立された SIV Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL クローンを用いた。この CTL クローンから RNA 全量を抽出し、SMART PCR cDNA Amplification Kit による逆転写、更に PCR を行い、TCR の α 鎖並びに β 鎖をコードしている cDNA を増幅した。各鎖の cDNA をクローニングし、可変領域に関して α 鎖については 12 クローン、 β 鎖については 9 クローンについてシーケンス解析を行った。各々の塩基配列を ImMunoGeneTics データベースに登録されているヒト TCR 遺伝子情報を用いてホモロジー検索を行った結果、 α 鎖については 2 種類 (6 クローン : α 鎖 Group I、5 クローン : α 鎖 Group II)、 β 鎖については 1 種類あることが分かった。また、定常領域に関しては α 鎖については 1 種類、 β 鎖については 2 種類あることが分かった。

その後、可変領域と定常領域の各 α 鎖と β 鎖から PCR により全長の α 鎖と β 鎖を得、全長の TCR α 鎖又は TCR β 鎖をコードしている cDNA を IRES (Internal ribosome entry site) -GFP 遺伝子が組み込まれた pMXs-IRES-GFP ベクターに導入した。その後、パッケージング細胞である Platinum-E 細胞にベクターを遺伝子導入し、48 時間後に培養上清に含まれる組み換えウイルスを回収した。このウイルスを 10 μ g/ml の Polybrene 存在下で TCR を欠損したマウス T 細胞株である TG40 細胞に感染させ、感染 2 日後に SIV Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的テトラマーを用いて SIV Gag₂₄₁₋₂₄₉ の発現をフローサイトメーターにより解析した。

この結果、 α 鎖 Group II と β 鎖を用いた組み合わせにおいて、SIV Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的テトラマー陽性と思われる分画が得られた。したがって、この α 鎖 Group II と β 鎖は、Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL の TCR を構成する遺伝子の一つであると考えられた。

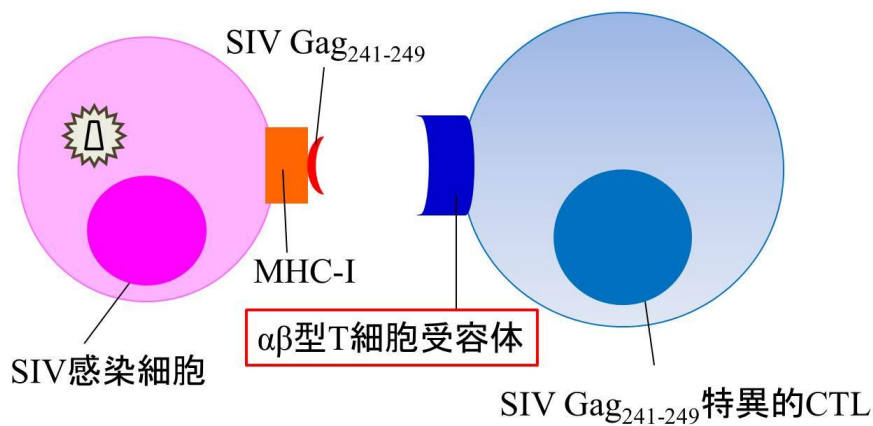


図 CTL の抗原認識

以上のように、本研究では CTL 誘導型予防エイズワクチン接種プロトコルの最適化に向け、SeV ベクターを用いて有効な抗原特異的 CTL を誘導することを目指して研究を行った。まず、ワクチンの複数回接種により、SeV 特異的抗体並びに CTL が誘導されるものの、抗原特異的 CTL の頻度が維持・上昇することを確認した。更に、誘導される CTL の機能に関与する TCR 遺伝子情報の解析に結びつけるべく TCR 遺伝子のクローニングを開始し、SIV Gag₂₄₁₋₂₄₉ 特異的 CTL の TCR 遺伝子クローンの一つを同定した。