

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790344

研究課題名（和文） CD8 陽性 T 細胞を軸とする新規クラミジアワクチン開発

研究課題名（英文） Induction of CD8⁺ T cell protective immunity against *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis strain by ubiquitin-fusion DNA vaccine.

研究代表者

石井 一成 (ISHII KAZUNARI)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70380954

研究成果の概要（和文）：本研究では、失明につながるトラコーマ、肺炎やオウム病など呼吸器の疾患や不妊症の原因となる卵管閉塞を起こすクラミジアに対するマウスモデルを用いた新規ワクチンの開発を行った。その結果、クラミジア特異的 MHC クラス I 拘束性の CD8 T 細胞の誘導する DNA ワクチンをマウスに免疫する事によって、マウスクラミジアに対する感染抵抗性が賦与された。この事からクラミジア感染症において CD8 T 細胞が重要な役割を果たしており、これら CD8 T 細胞を誘導する事でクラミジアの予防・治療に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Chlamydia trachomatis* is an obligate intracellular pathogen that causes a variety of disease, including trachoma, pelvic inflammatory diseases, infertility and pneumonia. A vaccine is likely the most effective strategy for controlling human chlamydial infections. Ubiquitin-proteasome pathway is indispensable in inducing MHC class I-restricted CD8⁺T cells. In the present study, we applied this strategy for vaccination against *C.trachomatis*. We constructed a DNA vaccine encoding chlamydia antigen fused with an ubiquitin at its N-terminus for inducing MHC class I-restricted CD8⁺ T cells. Mice immunized with the chimeric DNA developed potent protective immunity against *C.trachomatis* mediated by antigen-specific CD8⁺T cells. The enhanced immunity was dependent on the ubiquitination of antigen that enabled it to be efficiently processed by the proteasome pathway resulting in efficient induction of specific CD8⁺T cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			

年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：微生物、免疫学、感染症、ワクチン、T細胞

1. 研究開始当初の背景

国内外的にもクラミジア感染症に対するワクチン開発研究は行われているが、未だに実効性のある抗クラミジアワクチンの展望は開けていない。DNA ワクチンは、抗原あるいは単にエピトープをコードする遺伝子を発現プラスミドに組み込む事で、安全かつ簡便に細胞性免疫を誘導するワクチン法として開発された。しかし、従来の DNA ワクチンでは、抗原特異的 T 細胞が効率よく誘導されず、また誘導されても長期に維持される防御免疫も成立しにくい。近年、ペプチド抗原をユビキチン化することによりその抗原がプロテアソームでプロセッシングを受け、必然的に MHC クラス I 分子に提示され、抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導されることが証明された。この経路はユビキチンプロテアソームシステムと呼称されている。そのため、研究代表者らは抗原候補遺伝子とユビキチン遺伝子を融合し、DNA ワクチンとして生体内に導入することで、効率よく抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導できるユビキチン融合 DNA ワクチンを開発した(Ishii, K. et al. *Microbes Infect.* 8, 特許特開 2006-151813 姫野國祐、石井一成平成 18 年公開)。これまでクラミジア感染における T 細胞の役割については、CD4 陽性 T 細胞の機能解析を中心に行われてきており、CD8 陽性 T 細胞のクラミジア感染防御機構における役割等について細胞感染防御における役割を検討することを発想した。

近年、クラミジア感染におけるメモリー CD8 陽性 T 細胞機能の破綻が報告され、クラミジアの免疫回避機能の存在が明らかとなったが、現在までの所どのような機構によってメモリー CD8 陽性 T 細胞機能の破綻が起るかは不明である。一方、PD-1 は T 細胞の細胞死誘導時に発現が増強される遺伝子として単離・同定された。その後の PD-1 欠損マウスの解析から、PD-1 は生体内で免疫反応を負に制御することが明らかになってきた。さらに、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞が PD-1 による免疫抑制を悪用し、免疫監視からの回避に利用していることも明らかになってきた。しかし、現在までのところクラ

ミジア感染における PD-1 の関与については報告が無く、本研究によって、クラミジアの CD8 陽性 T 細胞機能の破綻誘導の新たな機序が明らかになる可能性を持つと考えられた。

2. 研究の目的

クラミジアは細胞内寄生菌であり、失明につながるトラコーマ、肺炎やオウム病など呼吸器の疾患や不妊症の原因となる卵管閉塞などを起こす感染症である。また、最近ではアテローム性動脈硬化との関連も注目されている。これらのクラミジア感染症の中で最も多いのはクラミジア・トラコマティスによる性器クラミジア感染症である。全世界では毎年 9 千万人の新規患者が発生し、それらのほとんどが無症状であるため感染が次から次へと拡大する(Brunham RC et al. *Nat Rev Immuno* 5:149,2005)。また、クラミジア感染症は HIV 感染症、卵巣癌等のリスクファクターである。従って、実効性のあるクラミジア感染対策、即ち、抗クラミジアワクチン開発は緊急の課題である。

細胞内寄生性細菌であるクラミジアは、上皮細胞などの感染細胞内で封入体を形成しリゾソームによる殺菌機構からエスケープする。また、IFN- γ や抗菌剤により非定型的な網状体となり、宿主細胞内で遷延性、持続性感染症を呈するようになる。従ってクラミジア感染症の排除には、MHC クラス I 拘束性の CD8 キラー T 細胞の誘導が極めて重要と考えられる。そこで、本研究では、クラミジア蛋白特異的 CD8 陽性 T 細胞を誘導するために、申請者らが近年確立した CD8 陽性 T 細胞を効率よく誘導するユビキチン融合 DNA ワクチンを行い、マウスクラミジア感染症に対するこの CD8 陽性 T 細胞を標的としたワクチン戦略を確立し、その有効性を検証することを目的とした。また、ワクチン開発において、寄生体の病原性あるいは免疫回避機構と宿主側の応答系を統合的にとらえた研究が非常に重要である。本申請研究では、クラミジア感染における CD8 陽性 T 細胞について解析を行うことで、寄生体の免疫回避機構を明らかにし、宿主防御機構からのエス

ケープ機構に即したワクチン開発を目指した。

3. 研究の方法

MHC class I 依存性キラーCD8 陽性 T 細胞の誘導を目的とし、クラミジア抗原をコードする遺伝子とユビキチン遺伝子のフュージョン DNA ワクチンベクターを構築した。構築後のベクターを COS7 細胞にトランスフェクトし、抗原タンパクの発現を確認した。次にしたベクターがユビキチンプロテアソームシステムによってプロセッシングされているかについてプロテアソームインヒビターを用いた *in vitro* 培養系にて明らかにした。これらのワクチンベクターについて、遺伝子銃を用いた DNA ワクチンを施した C57BL/6 マウスにクラミジア・トラコマティスを経気道的に感染させ、体重減少又は感染菌体数を指標としてワクチン効果の検討を行い、至適なワクチン法を確立した。

その際、ワクチン効果のエフェクター解析を行うため、CD8 陽性 T 細胞について *in vitro* および *in vivo* 細胞傷害活性について解析を行った。また同時に、CD8 陽性 T 細胞のインターフェロンガンマ産生についてフローサイトメーターを用いた細胞内サイトカイン染色を行った。

効果的なワクチン開発を行う目的で、寄生体の免疫回避機構を明らかにするため、クラミジア感染における PD-1 及びそのリガンドである PD-L1, PD-L2 の発現について、感染後経時的な解析をフローサイトメトリーにより行った。

4. 研究成果

(1) クラミジアワクチンベクターの開発

ユビキチン融合クラミジア抗原ベクターを構築し、哺乳細胞由来培養細胞にトランスフェクトし、目的抗原の発現をウエスタンブロット法により確認した。構築後のベクターを COS7 細胞にトランスフェクトし、抗原タンパクの発現を確認した。次に COS7 細胞にトランスフェクトを行う際、プロテアソームインヒビター MG132 と共培養を行うと、ユビキチン融合クラミジア抗原ベクターのタンパク発現は増大した。よってユビキチン融合クラミジア抗原ベクターによって発現する抗原タンパクはユビキチンプロテアソームシステムによって分解されている事が確認され、効率よく MHC クラス I に抗原を提示し、CD8 陽性 T 細胞を活性化している可能性が示唆された。

(2) マウスにおけるクラミジアワクチン法の開発

構築したユビキチン融合クラミジア抗原ベクターのマウスにおけるワクチン法につ

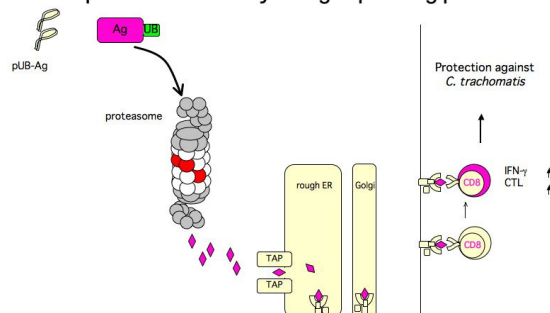
いて検討を行った。C57BL/6 マウスに遺伝子銃を用いた DNA ワクチンを行い、その後 *Chlamydia muridarum* の経鼻感染を行うことでワクチン効果を検討した。その結果、1 週間間隔で 4 回の DNA ワクチンにより、対照群に対して有為に体重減少の減少が認められた。またその際の、臓器内の菌数について解析を行った結果においても、感染 7 日目の肺あるいは感染 11 日目の肝臓において有為に菌数の減少が認められた。以上からユビキチン融合 DNA ワクチンによるクラミジアに対するワクチン効果が認められた。

(3) マウスにおけるクラミジアワクチン法のエフェクター解析

次に誘導されるワクチン効果について解析を行った結果、CD8 陽性 T 細胞によるクラミジア抗原特異的な細胞傷害活性の誘導が *in vitro* 及び *in vivo* 共に認められた。また、ワクチン群においては感染後、早期に CD8 陽性 T 細胞がインターフェロンガンマを産生していることが認められた。

よってユビキチン融合 DNA ワクチンにより、クラミジア特異的な CD8 陽性 T 細胞の活性化が認められ、そのことによってクラミジアに対する防御免疫が賦与されたと考えられる。

Hypothetical schema of successful vaccination with Ubiquitin-fusion Chlamydia Ag expressing plasmid



以上の結果から、ユビキチン融合クラミジア抗原ベクターによるワクチンによって、マウス内でクラミジア抗原が発現し、発現した抗原はユビキチンプロテアソーム経路を介して効率よく MHC クラス I 拘束性の CD8 陽性 T 細胞を活性化し、活性化した CD8 陽性 T 細胞が抗原特異的な細胞傷害活性、インターフェロンガンマを産生し、宿主であるマウスにクラミジア感染抵抗性を賦与することが示唆され、これら CD8 T 細胞を誘導する事でクラミジアの予防・治療に有効である可能性が示された。

(4) PD-1/PDL-1 を介したクラミジア免疫回避機構の解析

ワクチン開発において、寄生体の病原性あるいは免疫回避機構と宿主側の応答系を統合的にとらえた研究が非常に重要である。クラミジア感染における CD8 陽性 T 細胞につ

て解析を行うことで、寄生体の免疫回避機構を明らかにし、宿主防御機構からのエスケープ機構に即したワクチン開発が行えると考える。近年、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞が免疫応答を負に制御する PD-1 による免疫抑制を悪用し、免疫監視からの回避に利用していることが明らかになってきた。クラミジア感染における PD-1 及びそのリガンドである PD-L1, PD-L2 の発現について、感染後経時的な解析をフローサイトメトリーにより行った。その結果、感染により T 細胞上の PD-1 の発現は上昇していた。抗原提示細胞上にも PD-Ls は発現が確認され、クラミジアによる PD-1/PD-Ls を用いた免疫制御の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

1. 仇 斌、石井一成、伊藤竜太、副島利紀、廣松賢治、Neutrophils induce Th1 type immunity in lung infection with *Chlamydia muridarum*, 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 28 日、横浜
2. Ishii Kazunari, Chou Bin, Itoh Ryota, Soejima Toshinori, Himeno Kunisuke, Hiromatsu Kenji. Induction of CD8+ T cell protective immunity against *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis strain by ubiquitin-fusion DNA vaccine. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 4 日、大阪
3. Ohnishi Yoshiki, Itoh Ryota, Soejima Toshinori, Ishii Kazunari, Hiromatsu Kenji. Chlamydia 生殖器感染における iNKT 細胞の役割、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 4 日、大阪
4. 仇 斌、廣松賢治、岡野慎士、石井一成、伊藤竜太、姫野國祐、Development of a new DNA immunization therapy targeting tumor angiogenesis、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 3 日、大阪
5. 大西克樹、伊藤竜太、石井一成、副島利紀、仇 斌、廣松賢治、Innate and adaptive immune responses during genital tract infection with *C. trachomatis*, 第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 13 日、名古屋
6. 濱田利徳、石井一成、伊藤竜太、大西克樹、仇 斌、副島利紀、廣松賢治、Role of NKT cells during *Chlamydia trachomatis* mouse Pneumonitis lung infection in mice、第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 13 日、名古屋
7. Ohnishi Yoshiki, Ishii Kazunari, Chou Bin, Hamada Toshinori, Dantsuji Yurika, Soejima Toshinori, Hiromatsu Kenji. Role of NKT cells in the genital tract of mice infected by *Chlamydia trachomatis*, 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2 日、京都
8. Hamada Toshinori, Ishii Kazunari, Ohnishi Yoshiki, Chou Bin, Itoh Ryota, Soejima Toshinori, Hiromatsu Kenji. Role of NKT cells during *Chlamydia trachomatis* mouse Pneumonitis lung infection in mice、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2 日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 一成 (ISHII KAZUNARI)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：70380954

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：