

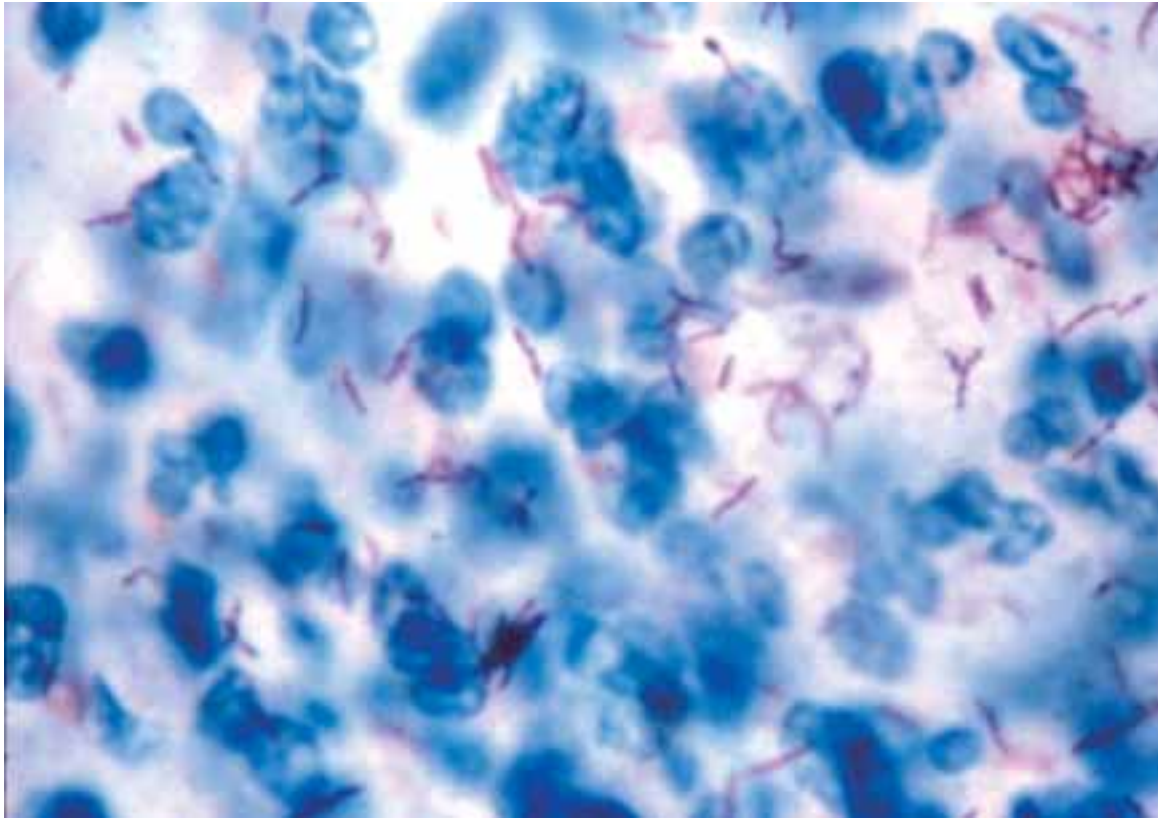
結核菌特異的T細胞エピトープを利用 した同菌特異的T細胞検出試薬

研究者： 浜松医科大学医学部看護学科 教授 永田 年
浜松医科大学理事 小出幸夫

本プレゼンテーションの構成

1. 結核菌に対する免疫応答
2. T細胞エピトープの同定法
3. MPT51（急性期抗原）のT細胞エピトープ（抗原ペプチド）の同定
4. MDP1（休眠期抗原）のT細胞エピトープ（抗原ペプチド）の同定
5. まとめ（研究の意義・今後の展開）

1. 免疫応答

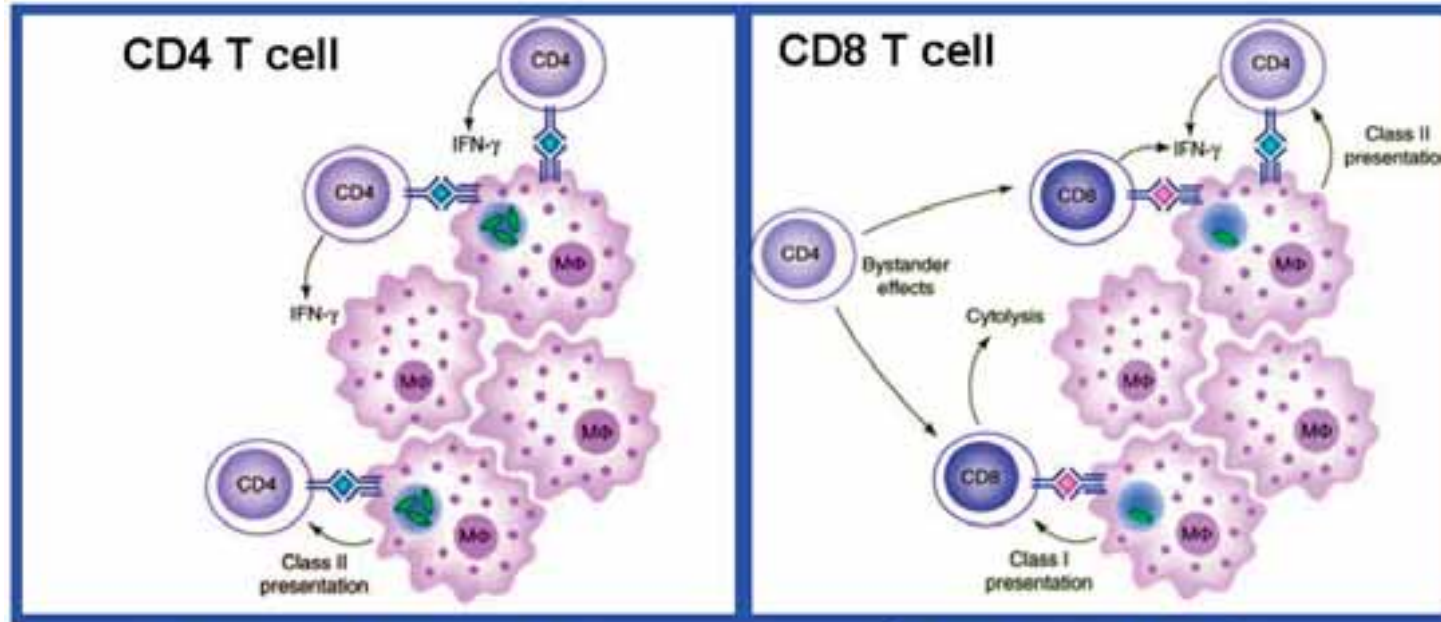


喀痰中の結核菌(チールネルゼン染色)

結核: 結核は代表的な再興感染症であり今なお世界で年間900万人近くが発病し、200万人近くが死亡しており、世界最大の細菌感染症です。結核の病原菌は結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)という抗酸菌という仲間に属する細菌で、ヒトの肺胞マクロファージ細胞等の中で生きる細胞内寄生細菌です。

結核菌に対する免疫応答

1. 免疫応答



1型ヘルパーT細胞 (Th1)

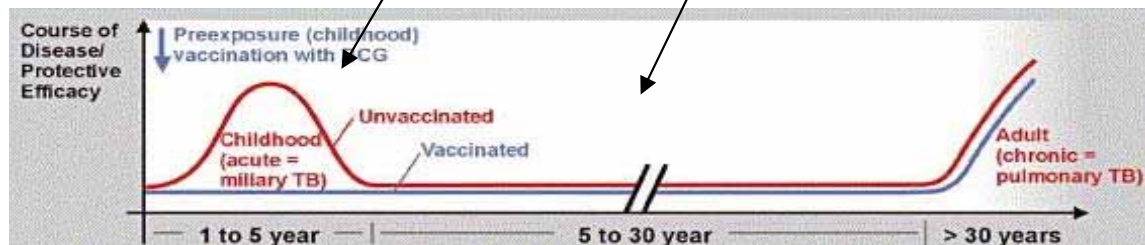
キラーT細胞 (CTL)

結核菌感染症に対する理想的なワクチン → CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞の両者を活性化させる必要がある

結核に対する免疫応答: 結核菌に対する感染防御には、抗体は効果がありません。その代わりに、細胞性免疫が必須です。その主なエフェクターは、キラーT細胞 (CD8 T細胞) とヘルパーT細胞 (CD4 T細胞) です。これらの結核特異的T細胞は、結核菌の抗原ペプチドを認識して誘導されます。

1. 免疫応答

急性期では、MPT51等の結核菌抗原が発現し、
休眠期では、MDP1等の結核菌抗原が発現します。



感染（1次結核）

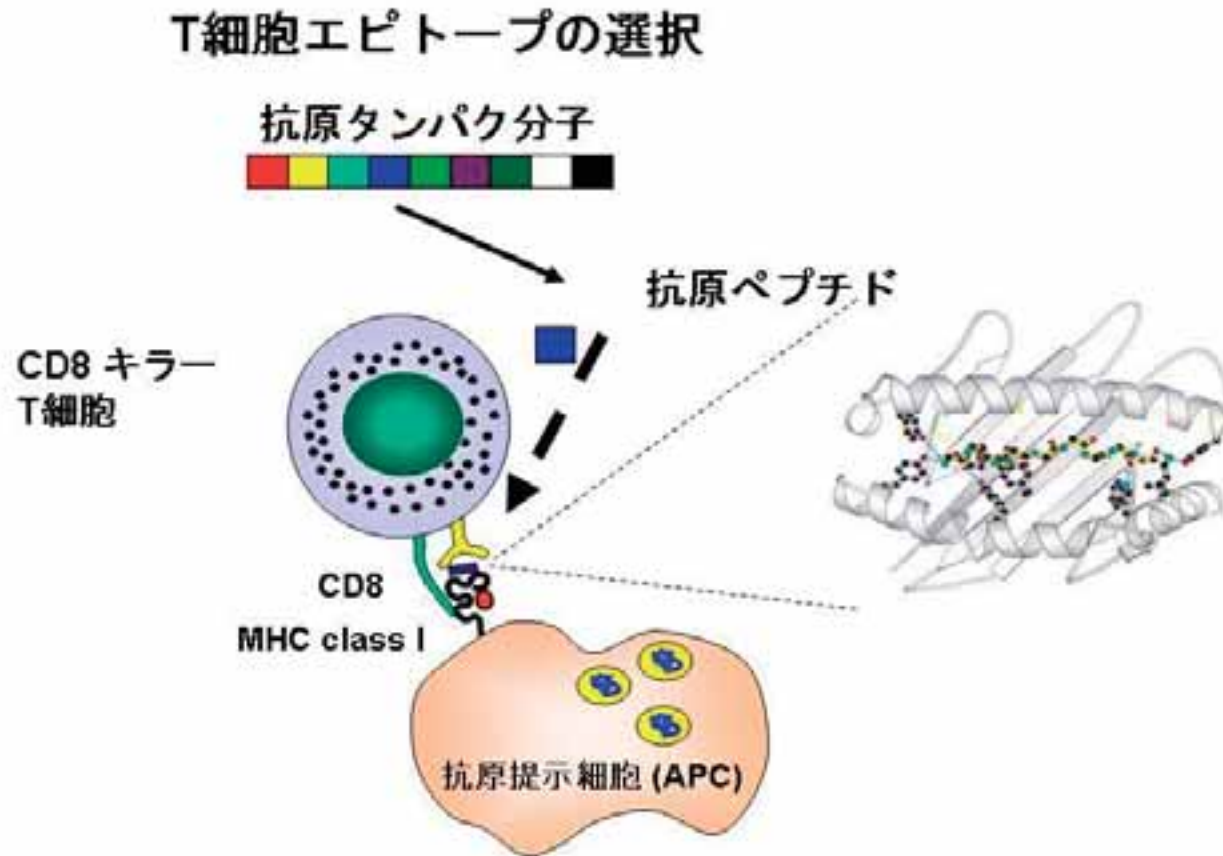
再燃（2次結核）

Eddine, AN and Kaufmann SHE, Microbes infect, 7:939,
2005

結核の経過：結核菌感染時の急性期（1次結核）を経た後、細菌が宿主の細胞内で潜んでいる休眠期（dormant stage）に至ります。そのまま再発しない場合もありますが、宿主の体力が落ちる高齢者等では結核の（内因性）再燃（2次結核）が起こることがあります。

標的抗原分子内の抗原ペプチド（CTLエピトープ）の同定

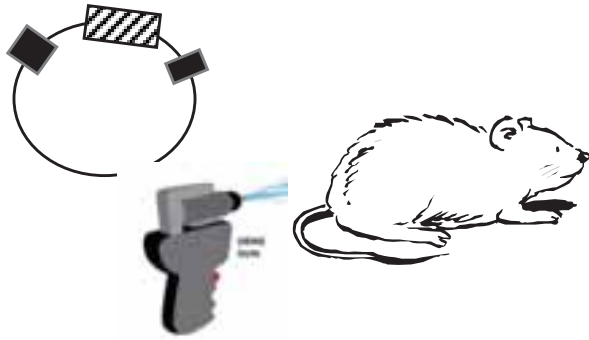
1. 免疫応答



結核に対するキラー 細胞応答: 結核の主要な感染防御エフェクター細胞が、キラーT細胞です。キラーT細胞は、CD8 をその表面に持つT細胞でCD8 T細胞ともいわれます。キラーT細胞は、結核菌抗原の中の短いペプチド(T細胞エピトープ、抗原ペプチド)を認識して誘導されます。したがって、このペプチドの情報が、結核菌特異的キラーT細胞の誘導や検出に重要となります。

結核菌抗原 遺伝子による免疫

結核菌抗原遺伝子をマウスに免疫する。



結核菌抗原遺伝子
発現プラスミド

結核菌抗原のT細胞エピトープの同定

2. T細胞 エピトープ

結核菌抗原オーバーラッピングペプチド



コンピューターアルゴリズム
(SYFPEITHI, BIMAS)

免疫マウス脾細胞の各ペプチドに対する免疫応答を解析しT細胞エピトープを同定する。(ELISA, Eispot, 細胞内IFN- γ 染色)



結核菌抗原の 細胞エピトープの同定: 結核菌抗原のDNAワクチンを遺伝子銃で免疫した免疫マウス脾細胞をこれらの抗原蛋白全体を網羅するオーバーラッピングペプチドの約20merの各ペプチドで刺激しIFN- γ の産生を指標にしてELISA法、ELISPOT法を用いて抗原ペプチドを検索しました。またコンピューターアルゴリズムによりT細胞エピトープの最小単位を推定しました。

遺伝子銃

2. T細胞 エピトープ



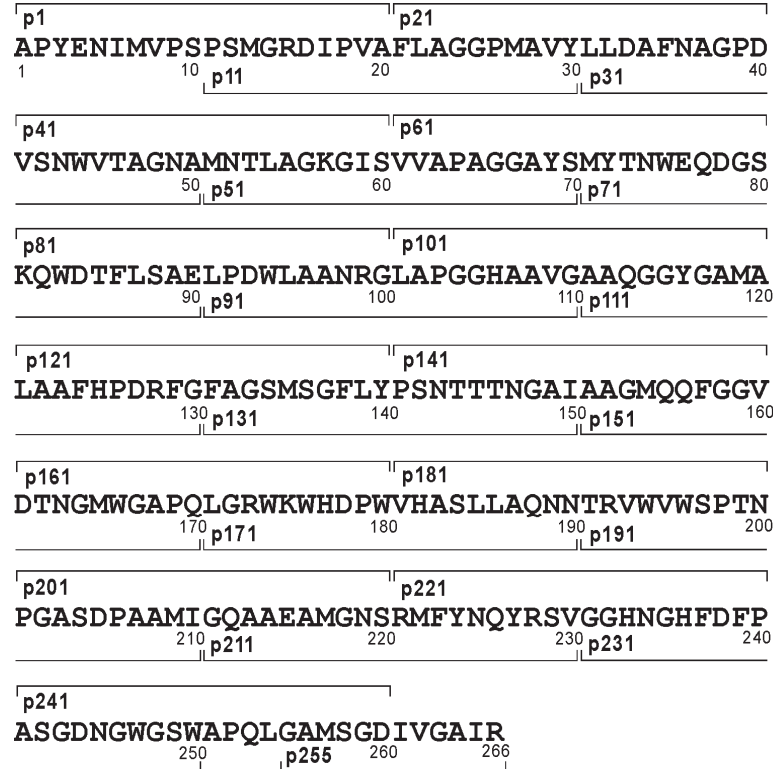
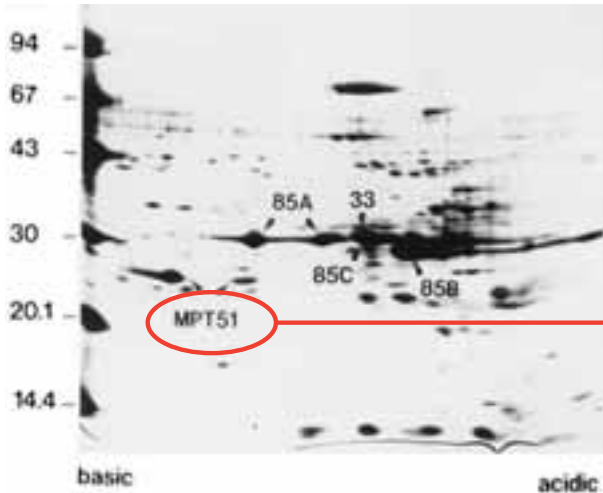
遺伝子銃とは：免疫に用いたのは、Bio-Rad Laboratories社製の Helios型遺伝子銃というものです。

これは、結核菌抗原遺伝子を金粒子上にコートしておいて、それをヘリウムガスの圧力で一気に宿主の細胞内に導入するものです。結核菌抗原遺伝子さえ入手すれば、それをこの方法で宿主に導入し、抗原に対する細胞性免疫を誘導させることができます。

結核菌MPT51タンパク(急性期抗原)のT細胞エピトープの同定

3. MPT51

k D
a

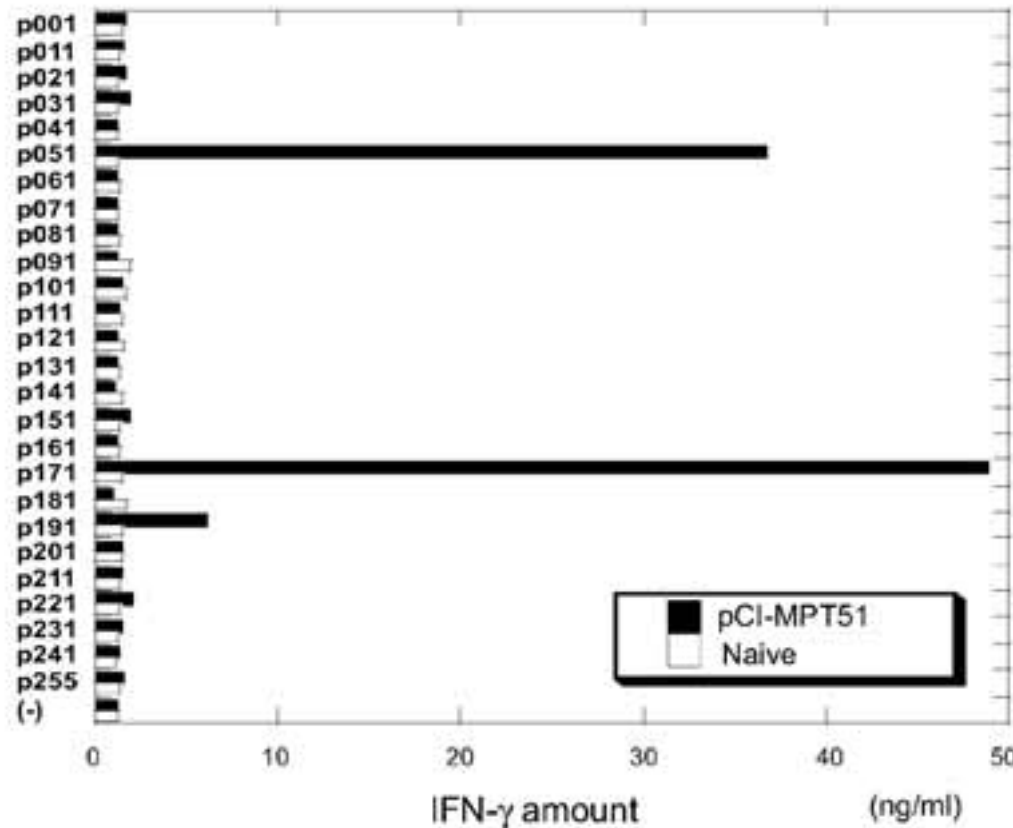


結核菌培養上清中の分泌タンパク
(Ohara et al., Infect Immun, 1997)

MPT51タンパクのオーバーラッピング・ペプチド・ライブラリー:
MPT51タンパクの全体を網羅する20merからなる26個のペプチドを合成しました。それぞれのペプチドは10アミノ酸分重なるように作製しました。

MPT51 DNAワクチン免疫HHDマウス脾細胞 におけるペプチド特異的IFN- γ 産生

3. MPT51



pCI-MPT51プラスミドを遺伝子銃で4回免疫したHHDマウス(HLA-A*0201トランスジェニックマウス)脾細胞をMPT51オーバーラッピングペプチドライブラリーの各ペプチド存在下で1日培養した後の培養上清中のIFN- γ 量をELISAで定量しました。

Epitope prediction

This page allows you to find out the ligation strength to a defined HLA type for a sequence of aminoacids. The algorithmus used are based on the book "MHC Ligands and Peptide Motifs" by H.G.Rammensee, J.Bachmann and S.Stevanovic. The probability of being processed and presented is given in order to predict T-cell epitopes.



1. Select MHC type

If you chose "all", max. sequence length is 100 aminoacids (letters)!

all
H2-Ad
H2-Ak
H2-Db
H2-Ed

Hold down ctrl key when clicking to select multiple items

2. Choose a mer

octamers (8 aa)
nonamers (9 aa)
decamers (10 aa)
endecamers (11 aa)
15 - mers (15 aa) for MHC Type II only
all mers

3. Paste your sequence here:

Max. input 2048 aminoacids (letters)!

Letters only, no numbers or non-ASCII-symbols please.

You may use 'SYFPEITHI' with H2-Kd to see an example.

SYFPEITHI

4. Choose Run to start analysis

Run Reset Home

T細胞エピトープ予測アルゴリズム

BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)



T細胞エピトープ予測アルゴリズム

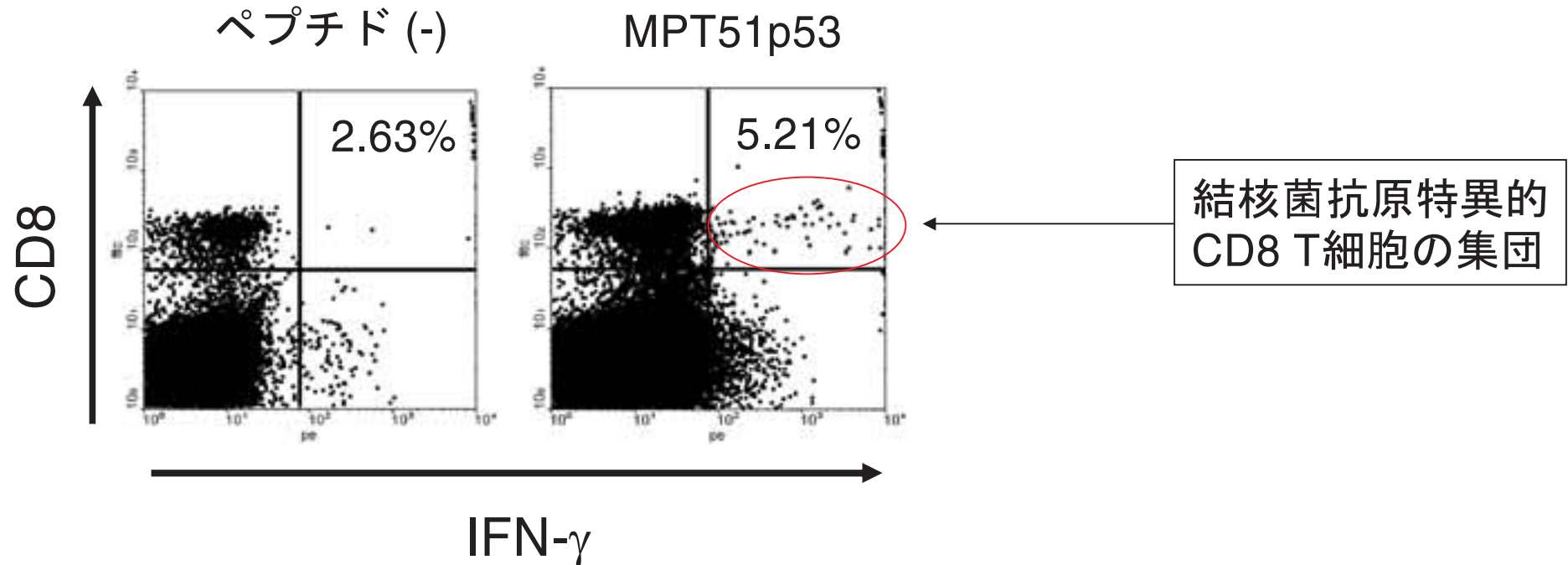
BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) の結果

HLA-A*0201: 10-mer

Scoring Results			
Rank	Start Position	Subsequence Residue Listing	Score (Estimate of Half Time of Disassociation of a Molecule Containing This Subsequence)
1	86	FLSAeLPDWL	264.830
2	184	SLLAqNNTRV	257.342
3	100	GLAPgGHAAV	69.552
4	53	TLAGkGISVV	65.588
5	221	RMFYnQYRSV	55.758
6	194	WVWSpTNPg	16.597
7	253	QLGAmSGDIV	13.973
8	186	LAQNnTRVWV	9.032
9	28	AVYLIDAFNA	8.068
10	50	AMNTIAGKGI	7.535
11	153	GMQQfGGVDT	5.382
12	36	NAGPdVSNWV	5.313
13	30	YLLDaFNAGP	3.952
14	216	AMGNsRMFYn	3.949
15	52	NTLAgKGISV	3.574
16	44	WVTAgNAMN	2.999
17	159	TGVDTnGMWG	2.999
18	22	EAGGpHAVYL	2.774
19	256	AMSGdIVGAI	2.253
20	112	AQGGyGAMA	2.166

MPT51 DNA免疫HHDマウスにおけるMPT51p53ペプチド特異的CD8⁺ T細胞によるIFN- γ 産生

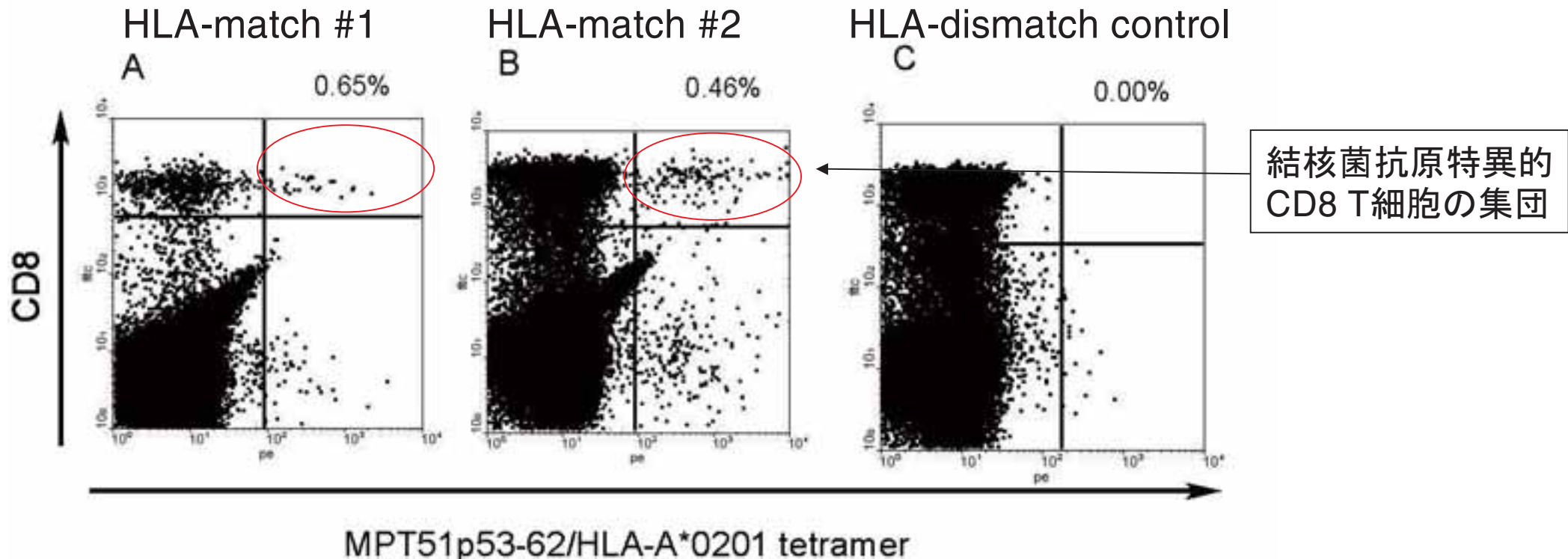
3. MPT51



MPT51 DNA免疫マウス脾細胞にMPT51p53ペプチドを加えた後、CD8⁺ T細胞でのIFN- γ 産生を細胞内IFN- γ 染色法で検討しました。 naïブマウスに比べMPT51 DNA免疫マウスではMPT51p53ペプチド存在下でIFN- γ を産生した。またそのIFN- γ 産生はMPT51p53ペプチドに先立って抗HLA-A*0201抗体を加えておくと抑制されました。

3. MPT51

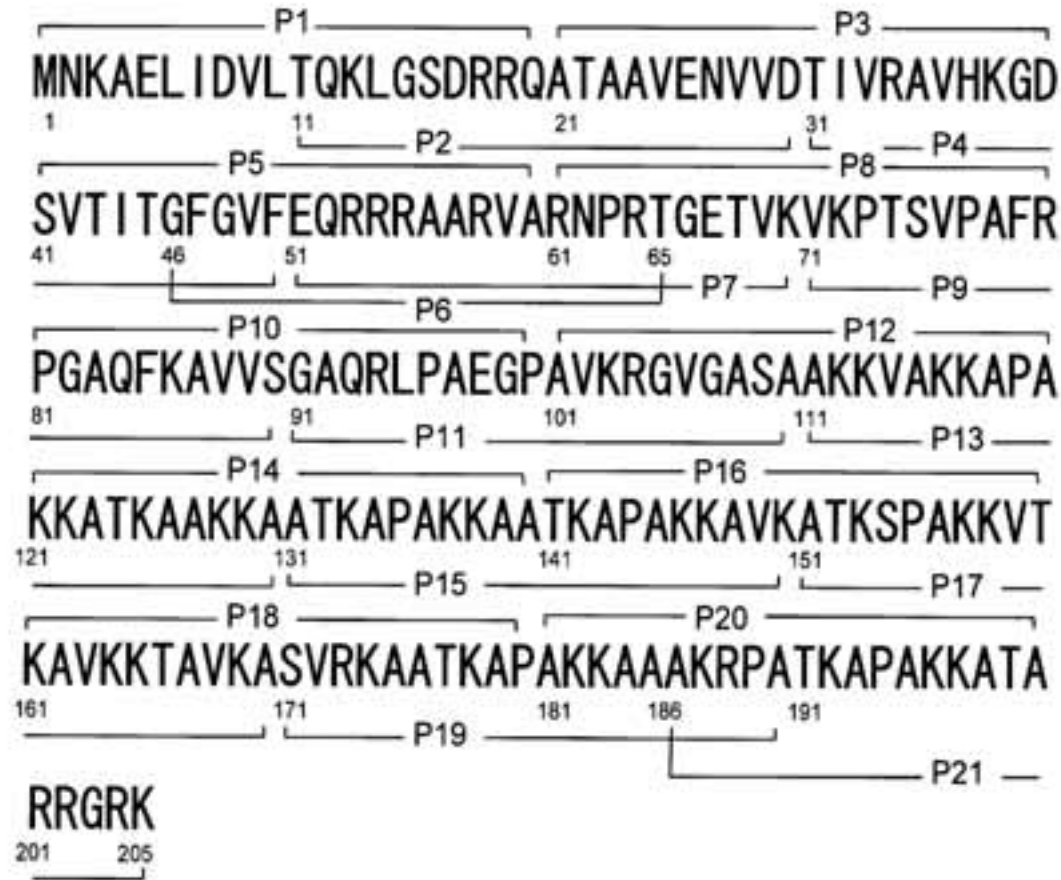
HLA-A*0201+ ツベルクリン陽性健常者における MPT51p53特異的CD8+ メモリーT細胞の存在



HLA-A*0201+のツベルクリン陽性健常者末梢血を採取し、溶血後MPT51p53ペプチドパルス自己末梢血単核球存在下で培養しました。1週間の培養後、新たに自己末梢血単核球を調製しMPT51p53ペプチドをパルスし、再刺激した後、MPT51/HLA-A*0201テトラマーで染色し、特異的CD8+ T細胞の誘導を検討しました。

結核菌MDP1タンパク(休眠期抗原) のT細胞エピトープの同定

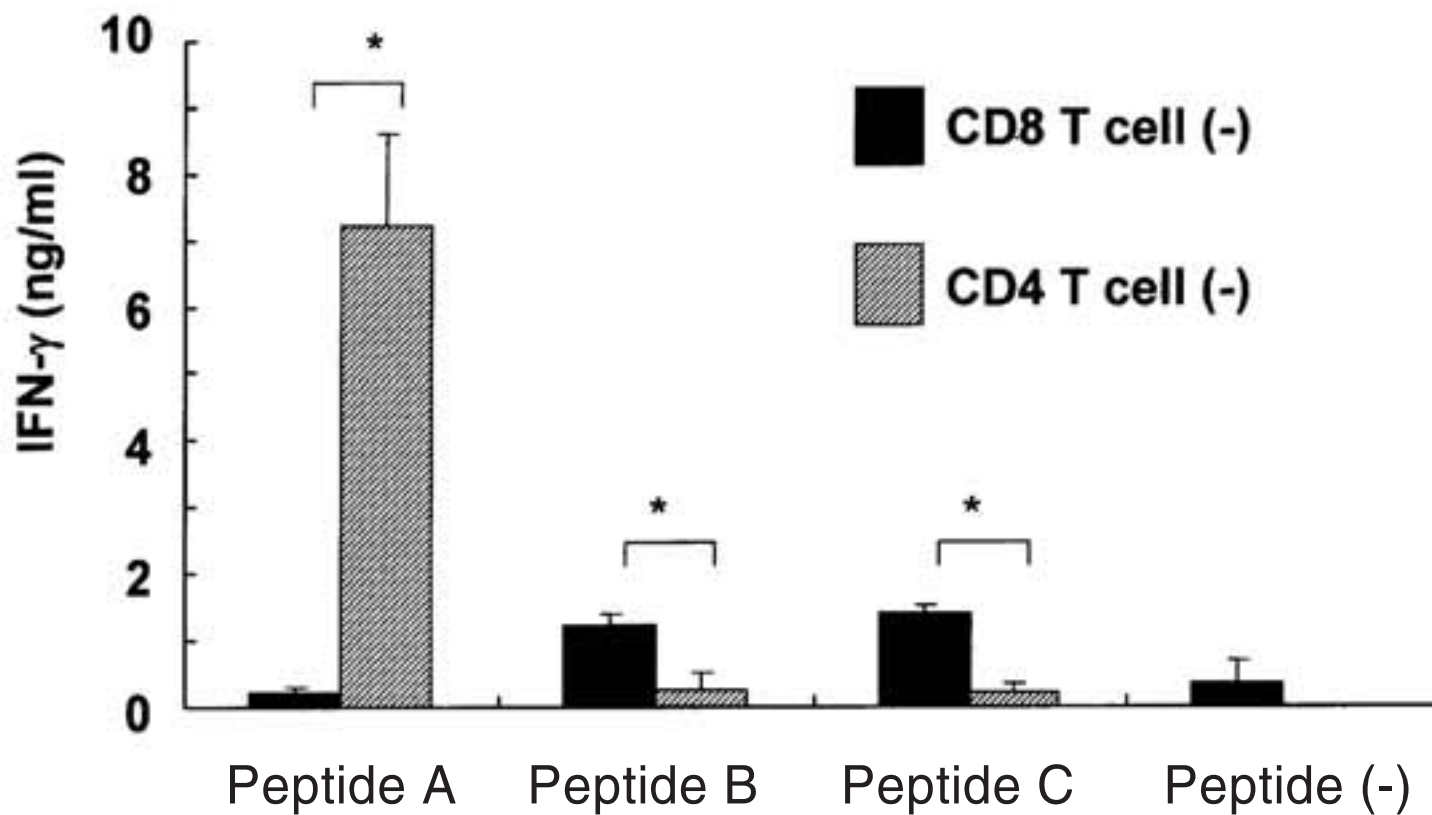
4. MDP1



MDP1タンパクのオーバーラッピング・ペプチド・ライブラリー: MDP1タンパクの全体を網羅する20merからなる21個のペプチドを合成した。それぞれのペプチドは10アミノ酸分重なるように作製した。

4. MDP1

MDP1 DNA免疫マウスにおけるペプチド特異的CD8⁺ T細胞によるIFN- γ 産生



まとめ

1. 今回明らかにになった結核菌特異的T細胞エピトープ（抗原ペプチド）は、結核菌特異的キラーT細胞（CD8 T細胞）の認識するペプチドです。
2. 結核菌抗原MPT51（急性期に発現している抗原）のヒトT細胞エピトープ（抗原ペプチド）を同定しました。
3. 結核菌抗原MDP1（休眠期に発現している抗原）のマウスT細胞エピトープ（抗原ペプチド）を同定しました。

1. 今回明らかにになった結核菌特異的T細胞エピトープ（抗原ペプチド）は、結核菌特異的T細胞感染検出、ワクチン開発に有用な試薬です。
2. ヒト結核ワクチン、診断法の開発には実験動物を用いた詳細な解析が不可欠でありマウスに対する試薬はヒトに対する試薬以上に有用であると考えます。
3. 結核菌特異的T細胞検出用試薬としては、T細胞テトラマーの作製が有効です。
4. 結核菌ワクチンとしては、複数のT細胞エピトープ（抗原ペプチド）を用いたサブユニットDNAワクチンが有効です。

上記の展開に関し、共同研究・開発を推進するパートナーを募集しています。

従来技術に対する新規性・優位性

急性期の結核菌感染に対する試薬とともに、休眠期 (dormant stage) の結核菌感染に対するワクチンおよび診断法開発の有用な試薬を開発した点です。

今回のペプチドは結核菌特異的T細胞検出およびワクチン作製に有用な試薬です。ペプチドによってマウスで有効なもの(特願2009-120975(未公開))とヒトで有効なもの(特開2005-13087)があり適宜使い分ける必要があります。

本技術に関する知的財産権

発明の名称： 新規ペプチド及びこのペプチドから成る
抗結核ワクチン

出願日： 2003年10月31日

特許番号： 特開 2005-13087

出願人： 科学技術振興機構

発明者： 小出幸夫、鈴木美奈
青枝大貴、永田 年

御清聴ありがとうございました。

—本件に関する御問い合わせは下記までお願い致します—

連絡先：

国立大学法人浜松医科大学知材活用推進本部

知材活用コーディネーター

小野寺雄一郎、四本喬介、狩野 保

email: chizai@hama-med.ac.jp

Tel: 053-435-2681; Fax: 053-435-2179