

称号及び氏名 博士（獣医学）上村明子

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 31 日

論文名 「Studies on the development of vaccine against *Trypanosoma brucei* infection: Induction of protective immune response to glycosphingolipid antigens expressed on the surface of the parasite.」

（*Trypanosoma brucei* に対する防御ワクチンの開発に関する研究：原虫表面の糖脂質抗原に対する免疫応答の誘導）

## 論文要旨

### 第 1 章 緒言

*Trypanosoma brucei* は宿主の血液中に寄生する原虫で、熱帯アフリカに分布する。感染した家畜はナガナ病を引き起こし、貧血、浮腫などの症状を呈し 2-3 週間で死亡する。宿主は牛、馬、めん羊、犬など多岐にわたり、その経済的損失は大きい。*Trypanosoma* 病に対する有効な予防法としてワクチンが検討されている。*Trypanosoma* 原虫は細胞表面に変異表面糖蛋白（VSG）を持っており、VSG を抗原変異させることにより宿主の免疫応答から逃れることができる。これまで VSG など蛋白抗原を標的とするワクチン開発が行われてきたが、上記の理由により有効なワクチンは開発されていない。

ワクチン開発の戦略としては、変異を起こさないあるいは変異しにくい抗原に対する免疫応答を誘導することが重要であると考えられる。細胞表面に存在する糖脂質は、細胞のマーカ―や抗原物質としての生物学的機能を有する。糖脂質抗原は遺伝子による直接支配を受けないため、抗原変異は起こりにくいと考えられる。そのため、現在ワクチンへの応用も進められている。マラリア原虫においても、原虫の糖脂質が抗原性や免疫原性において重要であることが報

告されている。

本研究では、*T. brucei*の糖脂質抗原を標的とした免疫応答を感染防御に応用するため、原虫糖脂質抗原の解析ならびにその免疫原性を検討し、糖脂質抗原に対する免疫応答の誘導法を確立することを目的とした。

## 第2章 *Trypanosoma brucei* 表面の糖脂質抗原の解析

これまで原虫においては、マラリア原虫、*Theileria sergenti*、*Trypanosoma cruzi*などで糖脂質抗原の解析が行われてきたが、*T. brucei*においてはその性状は不明である。本章では、*T. brucei*から糖脂質を分離・精製し、*T. brucei*の糖脂質抗原の解析を行うことを目的とした。

*T. brucei*感染ラットの血液から原虫を分離した。原虫から総脂質を抽出し、アルカリ処理ならびにアセチル化を行った後、中性糖脂質と酸性糖脂質（ガングリオシド）に分け、薄層クロマトグラフィー（TLC）により分析した。*T. brucei*の中性糖脂質は、3つの主要な糖脂質、N-1、N-2、N-3から成っていた。TLC上でN-1は glucosylceramide (GlcCer) と、N-2は lactosylceramide (LacCer) とよく似た移動度を示し、N-3は Gb4 よりも低い移動度を示した。一方、ガングリオシドは4つの成分、(G-1、G-2、G-3およびG-4)から成っていた。TLC上で、G-1は GM3 と、G-2は GM1 と、G-3は GD1a と、また G-4は GD1b とそれぞれ同程度の移動度を示した。中性糖脂質については、secondary ion mass spectrometry (SIMS) と liposome immune lysis assay (LILA) による解析を行った。SIMSにより N-1からは GlcCer に特異的なフラグメントイオンが、N-2からは LacCer に特異的なフラグメントイオンが検出された。さらに、LILAにより免疫学的に確認を行った結果、N-1は GlcCer、N-2は LacCer と同定された。N-3についてはこれら2つの方法のいずれを用いてもその構造と同定された。N-3についてはこれらの2つの方法のいずれを用いてもその構造を明らかに

することはできなかった。一方、ガングリオシドについては、モノクローナル抗体を用いて TLC 免疫染色により同定した。その結果、G-1 は GM3、G-2 は GM1、G-3 は GD1a、G-4 は GD1b であることが明らかとなった。

さらに、原虫表面におけるこれらの糖脂質抗原の発現を間接蛍光抗体法を用いて調べた。その結果、同定された糖脂質抗原が原虫表面に発現していることが確認された。

### 第 3 章 *Trypanosoma brucei* 表面の糖脂質抗原の免疫原性の解析ならびに免疫応答の誘導

本章では *Trypanosoma* 原虫表面に発現している糖脂質抗原を *Trypanosoma* 病のワクチンに応用する目的でその免疫原性について調べた。また、糖脂質抗原に対する免疫応答を効率よく誘導できる方法について検討した。

不活化した *Trypanosoma* 原虫あるいは糖脂質抗原 (GlcCer、LacCer、GM3 ならびに GM1) を単独で BALB/c マウスの腹腔内に免疫し、7 日目に血清を採取した。それぞれの糖脂質に対する抗体価を LILA により調べた場合、いずれに対する抗体価も上昇していなかった。

糖脂質抗原に免疫原性を獲得させるために、リポソームを応用した。GlcCer、LacCer、GM3 ならびに GM1 を脂質組成の異なる 3 種類のリポソームに再構成させ、BALB/c マウスに免疫した後、免疫応答について解析した。糖脂質抗原に対する抗体価を LILA により測定した。抗原を dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) ( $0.5 \mu\text{mol}$ )、cholesterol ( $0.5 \mu\text{mol}$ )、および *Salmonella minnesota* R595 LPS ( $10 \mu\text{g}$ ) の脂質組成から成るリポソーム (DPPC-リポソーム) に再構成させて免疫した場合、いずれの糖脂質に対しても抗体価が上昇した。特に、GM1 に対する抗体価は、他の糖脂質に比べ高値を示した。

#### 第4章 *Trypanosoma brucei* 表面糖脂質抗原に対する免疫誘導による感染防御

本章では DPPC-リポソームにより誘導される免疫応答の解析ならびに糖脂質抗原に対する免疫応答誘導マウスにおける *T. brucei* 感染防御について検討を行った。DPPC-リポソームに GM1 あるいはウシ脳ガングリオシド (GM1、GD1a、GD1b、GT1b を含む) を再構成させ、BALB/c マウスの腹腔内に1週間おきに4回免疫した。最終免疫から7日後に血清を採取し、enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) により IgM ならびに IgG 抗体価と IgG のサブクラスを調べた。その結果、GM1 あるいはウシ脳ガングリオシドに特異的な IgM ならびに IgG の誘導が認められた。IgG のサブクラスについては、Th2 type のサブクラスである IgG1 以外に Th1 type のサブクラスである IgG2a ならびに IgG3 の誘導が認められた。さらに、脾臓細胞におけるサイトカイン (IFN- $\gamma$  および IL-4) 特異的 mRNA を RT-PCR 法を用いて調べた結果、両者の発現が認められた。GM1 ならびにウシ脳ガングリオシドに対する免疫応答の *T. brucei* 感染に対する有効性を検討するため、最終免疫から4日後に *T. brucei* 100 隻を感染させ、マウスの生存率ならびに血液中の原虫数について調べた。抗原を含まないリポソームを免疫したマウスは7日目までに全てが死亡したのに対し、GM1 あるいはウシ脳ガングリオシド再構成リポソーム免疫マウスはそれぞれ60%と100%が生存した。また、生存マウスの血液中には原虫は認められなかった。

#### 第5章 総括

1. *Trypanosoma brucei* の糖脂質として GlcCer、LacCer、GM3、GM1、GD1a、GD1b が同定され、これらは原虫表面に発現していることが確認された。
2. 不活化 *T. brucei* あるいは糖脂質のみを免疫した場合、糖脂質抗原に対する免疫応答は誘導されなかったのに対し、抗原を DPPC-リポソームに再構成させ

た場合、高い免疫応答が誘導された。

3. GM1 あるいはウシ脳ガングリオシドを DPPC-リポソームに再構成して免疫すると、Th2 type のサブクラスである IgG1 のみならず、Th1 type のサブクラスである IgG2a ならびに IgG3 が誘導された。また、免疫マウスの脾臓リンパ球において、IL-4 および IFN- $\gamma$  特異的 mRNA の発現が認められた。

4. GM1 あるいはウシ脳ガングリオシド免疫マウスにおける *T. brucei* 感染に対する生存率は、それぞれ 60%と 100%であり、一方、リポソーム単独免疫マウスは全て死亡した。生存マウスの血液中に原虫は観察されなかった。

これらの実験結果から、糖脂質を DPPC-リポソームに再構成することにより糖脂質抗原に対する免疫応答が効率よく誘導されることが示された。また、液性免疫応答だけでなく細胞性免疫応答も誘導されることが示唆された。さらに、*T. brucei* 表面糖脂質抗原に対する免疫応答の誘導が *T. brucei* 感染防御に有効であることが明らかとなった。

## 審査結果の要旨

*Trypanosoma brucei* は宿主の血液中に寄生する原虫で、熱帯アフリカに分布する。本原虫の感染を受けた家畜は貧血、浮腫などの症状を呈して死亡し、その経済的損失は大きい。*Trypanosoma* 原虫は細胞表面に変異表面糖蛋白(VSG)を有し、VSG の蛋白部分を抗原変異させることにより宿主の免疫応答から逃れる。これまで VSG 蛋白抗原を標的としてワクチン開発が行われてきたが、上の理由により有効なワクチンの開発には成功していない。ワクチン開発の戦略としては、変異を起こさない、あるいは変異しにくい抗原に対する免疫応答を誘導することが重要である。糖脂質抗原は遺伝子による直接支配を受けないため、抗原変異は起こりにくいと考えられる。本研究において、申請者は *T. brucei* の糖脂質に着目し、糖脂質抗原に対する免疫応答を感染防御に応用するため、原虫糖脂質抗原ならびにその免疫原性を検討し、その結果をもとに糖脂質抗原に対する有効な免疫応答誘導の確立に成功した。

第2章で、まず *T. brucei* 表面の糖脂質抗原の解析を行った。*T. brucei* 感染ラットの血液から原虫を分離し、分離・精製した中性糖脂質ならびに酸性糖脂質(ガングリオシド)を薄層クロマトグラフィー(TLC)により分析した。*T. brucei* の中性糖脂質は、3種の主要な糖脂質から成り、一方、ガングリオシドは4つの成分から成っていた。secondary ion mass spectrometry, liposome immune lysis assay(LILA)およびモノクローナル抗体を用いる TLC 免疫染色により、中性糖脂質として GlcCer および LacCer を、また、ガングリオシドについては、GM3, GM1, GD1a, および GD1b を同定した。さらに、原虫表面における糖脂質抗原の発現を間接蛍光抗体法を用いて調べ、同定された糖脂質抗原が原虫表面に発現していることを証明した。このように、申請者は *Trypanosoma* 原虫が有する糖脂質抗原を初めて明らかにし、ワクチン開発に必要な基礎データを提供した。

続いて第3章において、申請者は原虫表面に発現している糖脂質抗原をワクチンに応用する目的で、*T. brucei* 糖脂質抗原の免疫原性を解析し、糖脂質に対する免疫応答の誘導を試みた。ホルマリン不活化原虫、あるいは糖脂質抗原を脂質二重膜であるリポソームに再構成させ、マウスの腹腔内に免疫した。免疫後、GlcCer, LacCer, GM3 および GM1 それぞれに対する抗体価を LILA により測定した結果、いずれの糖脂質に対しても抗体価が上昇し、特に、GM1 に対する抗体価は、他の糖脂質に比べ高値を示すことを明らかにした。このように、申請者は *Trypanosoma* 糖脂質に対する抗体産生を誘導することに初めて成功し、実用的ワクチン開発への方向性を示した。

第4章において、*T. brucei* 表面糖脂質抗原に対する免疫誘導による感染防御を試みた。GM1 あるいはウシ脳ガングリオシドを再構成したリポソームをマウス腹腔内に免疫することにより、両者に特異的な IgM ならびに IgG の誘導に成功した。IgG サブクラスについては、Th2 type のサブクラスである IgG1 以外に、Th1 type の IgG2a ならびに IgG3 の誘導を認めた。さらに、脾臓細胞におけるインターフェロン(IFN)- $\gamma$  およびインターロイキン(IL)-4 特異的 mRNA 発現を RT-ポリメラーゼ連鎖反応を用いて調べ、両者の発現を確認した。最後に、GM1 ならびにウシ脳ガングリオシドに対する免疫応答の *T. brucei* 感染に対する有効性を実証するため、免疫マウスに *T. brucei* を感染させ、マウスの原虫抵抗性ならびに血液中の原虫数を調べた。抗原を含まないリポソームを免疫したマウスは、7日目までに全てが死亡したのに対し、GM1 あるいはウシ脳ガングリオシド

再構成リポソーム免疫マウスはそれぞれ 60%, 100%が生存した。また, 生存マウスの血液中に原虫を認めなかった。このように申請者は, 糖脂質を抗原とするリポソームワクチンにより, *Trypanosoma* 病に対する効果的な防御免疫を誘導することに初めて成功した。

本研究において, *Trypanosoma*原虫糖脂質をリポソームに再構成して免疫することにより, 糖脂質抗原に対する免疫応答を効率よく誘導し, さらに, 液性免疫応答のみならず細胞性免疫応答も誘導することに成功した。このように申請者は, *T. brucei*表面糖脂質抗原に対する免疫応答が, *T. brucei*感染防御にきわめて有効であることを世界に先がけて明らかにした。今回の実験結果は, 動物の原虫病に対する糖脂質ワクチンの有効性を実証したもので, その成果は獣医伝染病学ならびに獣医免疫学の発展に大きく貢献するものである。よって, 最終試験の結果と併せて, 博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。