

令和元年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10740

研究課題名(和文) 幅広い型のHPVを標的とする粘膜ワクチン及び受動免疫ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of passive immunization vaccines against a broad-spectrum of human papillomavirus genotypes.

研究代表者

森 清一郎 (Mori, Seiichiro)

国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官

研究者番号：80342898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：15の型のヒトパピローマウイルス(HPV)が子宮頸癌の原因となる。現行のHPVワクチンは、型特異的な中和抗体を誘導するL1タンパク質を抗原とし、2つの型に有効である。我々が分離したL2タンパク質に対するモノクローナル抗体(MAb24B)は、少なくとも8つの発癌性HPVを中和できる。本研究では、MAb24Bを使用した受動免疫ワクチンの有効性を調べた。アデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子導入によりMAb24Bをマウス体内で発現させた。1年以上に渡って血清中にMAb24Bが検出され、経膣接種した16、18、58型に対する感染防御効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ての発癌性HPVに有効なワクチンが求められているが、そのためには15種類のL1抗原を混ぜる必要があり、技術的、コスト的な問題が指摘されている。本研究では発想を転換し、広域中和抗体を体内で発現させることで幅広い型の発癌性HPVの感染を防ぐ受動免疫ワクチンの可能性を調べた。AAVベクターを用いた遺伝子導入によりマウス体内で広域中和抗体が持続発現し、ベクター接種から1年以上経過した時点でも、複数の発癌性HPVに対する感染防御効果が認められた。これらの結果は、広域中和抗体を発現するAAVベクターが幅広い型のHPV感染を防ぐ受動免疫ワクチンとなり得ることを示すとともに開発のための基盤となる。

研究成果の概要(英文)：At least 15 oncogenic types of human papillomavirus (HPV) cause cervical cancer. The licensed HPV vaccines consist of the major capsid protein L1 of two oncogenic HPV types and elicit type-specific neutralizing antibodies. We have previously isolated a monoclonal antibody, MAb24B, that recognizes the minor capsid protein L2. MAb24B is capable of neutralizing at least eight oncogenic HPVs in vitro. In this study, we examined the feasibility of a passive immunization vaccine using this broadly neutralizing antibody by employing adeno-associated virus (AAV)-mediated gene transfer. A single intramuscular injection of the AAV vector expressing MAb24B into mice resulted in persistent expression of MAb24B in the sera over one year. The vector-injected mice were partially protected from vaginal challenges with HPV16, HPV18, and HPV58 pseudovirions. These results provide a foundation for the development of passive immunization vaccines for a broad-spectrum of HPVs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HPVワクチン 受動免疫ワクチン 広域中和抗体 AAVベクター

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現行の HPV ワクチンは、L1 キャプシドタンパク質からなるウイルス様粒子 (VLP) を抗原としており、子宮頸癌の原因となる 16、18 型及び尖圭コンジローマの原因となる 6、11 型に有効である。誘導される抗 L1 抗体の中和活性は型特異的であるため、それぞれの型の VLP を製造して混ぜる必要があり、また、上記の 4 つの型以外には効果がないか低い。子宮頸癌の原因となる HPV には少なくとも 15 の型があり、全ての発癌性 HPV に有効なワクチンが求められている。もう一つのキャプシドタンパク質である L2 タンパク質には型共通の交叉性中和エпитープが存在し、抗 L2 抗体は複数の型の HPV を中和できる。L2 タンパク質を抗原とするワクチンの開発が進められているが、L1 タンパク質に比べ抗原性が低く、実用化には至っていない。我々が分離した抗 16 型 L2 モノクローナル抗体 (MAb24B) は、少なくとも 8 つの発癌性 HPV を中和できる。MAb24B は、そのエピトープのアミノ酸配列から、全ての発癌性 HPV を中和できると推測される。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入により抗 L2 広域中和抗体を体内で安定に発現させて幅広い型の HPV 感染を防ぐ、新たな受動免疫ワクチンを開発する。

3. 研究の方法

ヒトでの使用を念頭に、マウス由来の広域中和抗体 (MAb24B) の可変領域とヒト IgG の定常領域を融合したキメラ抗体をコードする人工遺伝子を合成する。このキメラ抗体遺伝子を培養細胞に導入し、分離精製したキメラ抗体の中和活性を確認する。中和活性が確認できれば、キメラ抗体を発現する AAV ベクターを作成し、マウス骨格筋に接種する。血中のキメラ抗体濃度を ELISA により経時的に測定する。ルシフェラーゼを発現する発癌性 HPV のシールドウイルス (PsV) をマウスの膺に感染させ、膺洗浄液のルシフェラーゼ活性を測定することにより、ベクター接種による感染防御の効果を調べる。

4. 研究成果

マウス由来の広域中和抗体 (MAb24B) の可変領域とヒト IgG 定常領域を融合したキメラ抗体 (chMAb24B) をデザインした。細胞外分泌シグナルを付加した chMAb24B の重鎖と軽鎖をプロテアーゼ認識配列を挟んで融合したタンパク質を発現する人工遺伝子を作成した。293FT 細胞に導入し、培養上清から chMAb24B を分離精製した。精製した chMAb24B は、調べた 8 つの発癌性 HPV を全て中和した (表 1)。続いて、chMAb24B 遺伝子をパッケージした AAV ベクター (AAV/chMAb24B) を作成した。精製した AAV/chMAb24B を、3 段階の接種量 (2×10^9 , 2×10^{10} , 2×10^{11} ゲノムコピー [gc]) で 5 匹ずつのマウス前脛骨筋に接種した。経時的に採血し、血清中のキメラ抗体濃度を ELISA で測定した。その結果、接種量に比例して chMAb24B が血清中に検出された (図 1)。 2×10^{11} gc のベクターを接種して 6 週間後、血清中の chMAb24B は平均約 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に達し、その後徐々に減少したが、接種 62 週間においても平均約 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の chMAb24B が検出された (図 1)。

MAb	Cell	PNGase	Type of pseudovirion							
			HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV51	HPV52	HPV58
MAb24B	hybridoma	-	5.51 (± 1.29)	8.92 (± 3.05)	24.71 (± 23.53)	11.12 (± 2.30)	28.93 (± 13.70)	59.33 (± 46.99)	10.42 (± 7.21)	8.27 (± 2.91)
chMAb24B	293FT	-	0.09 (± 0.08)	0.29 (± 0.18)	0.98 (± 0.91)	0.59 (± 0.32)	0.81 (± 0.27)	0.91 (± 0.56)	1.02 (± 0.68)	0.28 (± 0.15)
chMAb24B	RD	-	0.03 (± 0.01)	0.05 (± 0.01)						
MAb24B	hybridoma	+	0.67 (± 0.23)	0.82 (± 0.69)						
chMAb24B	293FT	+	0.03 (± 0.01)	0.06 (± 0.05)						

ルシフェラーゼを発現する 16、18、または 58 型の PsV をマウスの膺内に接種し、3 日後に膺洗浄液のルシフェラーゼ活性を測定することにより、発癌性 HPV に対する感染防御効果を調べた。 2×10^{11} gc の AAV/chMAb24B を接種して 62 週間後、EGFP を発現する AAV ベクター (AAV/EGFP) を接種したコントロール群に比較して、16 型 PsV に対する有意な ($p=0.02$) 感染防御効果が認められた (図 2A)。18 型および 58 型 PsV を接種したマウスでは、AAV/chMAb24B 接種群のルシフェラーゼ活性の中央値は、AAV/EGFP 接種群の約 1/10 であったが、個体間のばらつきが大きく、有意差は得られなかった (図 2B、C)。AAV/EGFP 接種群のルシフェラーゼ活性の平均値に対する個々の AAV/chMAb24B 接種マウスのルシフェラーゼ活性 (%) から、感染が抑制された割合 (%) を計算し図 2D に示した。AAV/chMAb24B を接種した 8 匹のうち全てのマウスで、16 型 PsV に対する 90% 以上の感染抑制が認められた。18 型 PsV

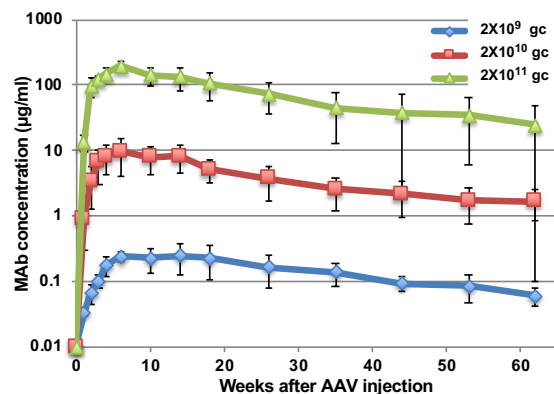


図1. ベクター接種後のマウス血中におけるキメラ抗体濃度

に対しては 8 匹中 6 匹、58 型 PsV に対しては 8 匹中 5 匹のマウスで、90%以上の感染が抑制された。

ヒト細胞株 293FT や RD で発現させた chMAb24B は、ハイブリドーマ由来のマウスモノクローナル抗体 MAb24B に比べ、*in vitro* の中和活性が 10~60 倍高いという予期しない結果が得られた (表 1)。精製した抗体をマウスの腹腔に接種し、16 型 PsV に対する感染防御効果を調べた結果、*in vivo* でも、293FT で発現させた chMAb24B は MAb24B より高い感染防御効果を示した。AAV ベクターによりマウス体内で発現させた chMAb24B の *in vitro* の中和活性は、MAb24B と同程度であったことから、中和活性の上昇はキメラ化に起因するものではなく、抗体を発現する細胞の違いによるものと考えられた。MAb24B から酵素 (PNGaseF) 処理により糖鎖を除去すると中和活性が有意に上昇したことから (表 1)、抗体に結合する糖鎖が MAb24B の中和活性を阻害することがわかった。293FT 細胞で発現させた chMAb24B から同様に糖鎖を除去すると、中和活性の上昇が若干認められたが (表 1)、有意ではなかったことから、発現する細胞によって抗体に結合する糖鎖のパターンが異なり、中和阻害の程度も異なることが示唆された。標識したレクチンを用いて、抗体に結合する糖鎖の種類と量を調べた結果、ハイブリドーマ由来の MAb24B には、293FT 細胞や RD 細胞で発現させた chMAb24B に比べ、より多くの N-アセチルガラクトサミンが結合していることがわかった (図 3)。

以上の結果から、AAV ベクターを用いて、生体内で抗 HPV 広域中和抗体を長期間、安定して発現させることが可能であることがわかった。ベクター接種から 1 年以上経過した時点でも、複数の発癌性 HPV に対する感染防御効果が認められた。従って、広域中和抗体を発現する AAV ベクターは、幅広い型の HPV 感染を防ぐ受動免疫ワクチンとなり得る。18 及び 58 型に対する感染防御効果が十分ではなかったため、16 型以外の型に対する感染防御効果を高めることが今後の課題である。我々の以前の研究により、異なるエピトープを認識する 2 つの中和抗体を混ぜると、中和活性が相乗的に増加することがわかっている (Virology, 434, 110-, 2012)。chMAb24B に加え、他の抗 L2 広域中和抗体を発現する AAV ベクターを混合接種することで、16 型以外に対する感染防御効果も高まると期待できる。また、抗体に結合する糖鎖が、chMAb24B の中和活性を阻害する可能性があることがわかった。MAb24B の抗原結合領域 (Fab) には、糖鎖結合配列が予測されないことから、保存された Fc 領域へ結合する糖鎖が関係すると思われる。Fc 領域に糖鎖が付加されないアグリコシル型の chMAb24B をデザインすることで、糖鎖の影響を受けることなく、より効果の高い受動免疫ワクチンになると考えられる。

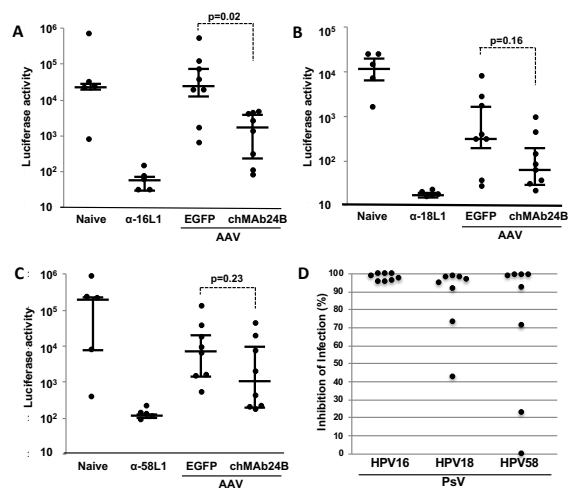


図2. キメラ抗体 (chMAb24B) 発現 AAV ベクターを接種したマウスにおける発癌性 HPV の偽ウイルス (PsV) に対する感染防御効果。(A) HPV16 PsV, (B) HPV18 PsV, (C) HPV58 PsV, (D) 各型に対する個々のマウスでの感染防御率。

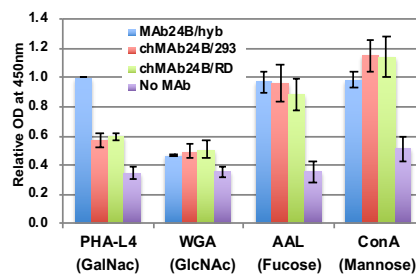


図3. 抗体に結合した糖鎖の標識レクチンによる検出

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- Hirose Y, Onuki M, Tenjimbayashi Y, Yamaguchi-Naka M, Mori S, Tasaka N, Satoh T, Morisada T, Iwata T, Kiyono T, Mimura T, Sekizawa A, Matsumoto K, Kukimoto I. Whole-Genome Analysis of Human Papillomavirus Type 16 Prevalent in Japanese Women with or without Cervical Lesions. *Viruses*. 2019 Apr 16;11(4). pii: E350.
- Takeuchi F, Kukimoto I, Li Z, Li S, Li N, Hu Z, Takahashi A, Inoue S, Yokoi S, Chen J, Hang D, Kuroda M, Matsuda F, Mizuno M, Mori S, Wu P, Tanaka N, Matsuo K, Kamatani Y, Kubo M, Ma D, Shi Y. Genome-wide association study of cervical cancer suggests a role for ARRDC3 gene in human papillomavirus infection. *Hum Mol Genet*. 2018 Nov 9.
- Hirose Y, Onuki M, Tenjimbayashi Y, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Tasaka N, Satoh T, Morisada T, Iwata T, Miyamoto S, Matsumoto K, Sekizawa A, Kukimoto I. Within-Host Variations of Human Papillomavirus Reveal APOBEC-Signature Mutagenesis in the Viral Genome. *Journal of Virology*. 2018, 92(12). pii: e00017-18.
- Tenjimbayashi Y, Onuki M, Hirose Y, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Tasaka N, Satoh T,

- Morisada T, Iwata T, Miyamoto S, Matsumoto K, Sekizawa A, Kukimoto I. Whole-genome analysis of human papillomavirus genotypes 52 and 58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer*. 2017 12: 44.
5. Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Yugawa T, Kiyono T, Nishina H, Kukimoto I. Human Papillomavirus 16 E6 Up-regulates APOBEC3B via the TEAD Transcription Factor. *J Virol*. 2017. 91, e02413-16.
 6. Kukimoto I, Mori S, Aoyama S, Wakae K, Muramatsu M, Kondo K. Hypermutation in the E2 gene of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol*. 87(10):1754-60, 2015
 7. Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I. Identification of APOBEC3B Promoter Elements Responsible for Activation by Human Papillomavirus Type 16 E6. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015, 460(3):555-60.
 8. Ahasan MM, Wakae K, Wang Z, Kitamura K, Liu G, Koura M, Imayasu M, Sakamoto N, Hanaoka K, Nakamura M, Kyo S, Kondo S, Fujiwara H, Yoshizaki T, Mori S, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 13;457(3):295-9.

〔学会発表〕（計 10 件）

1. Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I. TRANSCRIPTIONAL COFACTOR VGLL1 IS REQUIRED FOR TEAD-MEDIATED TRANSCRIPTION OF HPV EARLY GENES. 第 66 回日本ウイルス学会学術総会. 2018.
2. Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I. TRANSCRIPTIONAL COFACTOR VGLL1 IS REQUIRED FOR TEAD-MEDIATED TRANSCRIPTION OF HPV EARLY GENES. 30th International Papillomavirus Conference. 2018.
3. Mori S, Kotani O, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I. Persistent expression of a broadly neutralizing monoclonal antibody against HPVs by AAV-mediated gene transfer. 第 65 回日本ウイルス学会学術総会. 2017.
4. Kukimoto I, Tenjimbayashi Y, Hirose Y, Onuki M, Matsumoto K, Mori S. Upregulation of APOBEC3B Cytidine Deaminase by HPV E6 and E7 via the TEAD Transcription Factor. DNA Tumour Virus Meeting. 2017.
5. Mori S, Kiyono T, Nishina H, Kukimoto I. Activation of human APOBEC3B promoter by HPV16 E6 through TEAD transcription factors. 第 64 回日本ウイルス学会学術総会. 2016.
6. Mori S, Nishina H, Kukimoto I. TEAD-dependent, YAP/TAZ-independent activation of human APOBEC3B promoter by HPV16 E6. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016.
7. Kukimoto I, Kondo K, Muramatsu M, Mori S. Hypermutation in the E2 gene of HPV16 in cervical intraepithelial neoplasia. DNA tumor virus meeting. 2015.
8. Mori S, Takeuchi T, Ishii Y, Kukimoto I. Mechanisms of APOBEC3B promoter activation by HPV16 E6. 28th International Papillomavirus Conference. 2015.
9. Kukimoto I, Mori S, Kondo K. Hypermutation in the E2 gene of HPV16 in cervical intraepithelial neoplasia. 第 74 回日本癌学会学術総会. 2015.
10. Ishii Y, Mori S, Takeuchi T, Kukimoto I. The L2 capsid protein of HPV16 promotes viral uncoating by inhibiting virus entry into the Golgi body through the L2-TRAPPC8 interaction. 第 63 回日本ウイルス学会学術総会. 2015.

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。