

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292183

研究課題名(和文)猫伝染性腹膜炎の予防薬および治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of therapeutic agents and vaccines against feline infectious peritonitis

研究代表者

宝達 勉 (Hohdatsu, Tsutomu)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：00129264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：猫伝染性腹膜炎(FIP)はネコ科動物の致死性ウイルス感染症である。臨床応用が可能な治療薬およびワクチンは未だ存在しない。我々は、FIPの治療薬およびワクチンの開発を試みた。我々は、FIPVの構造蛋白質に由来するペプチドの中からTh1活性を強く誘導するものを選抜した。これらのうちN蛋白質に由来するペプチドを接種した猫にFIPVを攻撃したところ、FIP発症が抑制される傾向を示した。我々は猫TNF- $\alpha$ を中和する抗体(MAb2-4)を作製した。MAb2-4を投与した3頭のFIP発症猫のうち2頭において症状が改善された。これらの結果は、FIPに対する治療薬およびワクチンの開発に有用となり得る。

研究成果の概要(英文)：Feline infectious peritonitis (FIP) is a virus-induced fatal disease in cats. There have been no reports on agents that have exhibited therapeutic or preventive effects. On the basis of these facts, we have tried to develop therapeutic agents and vaccines against FIP. We selected peptides that strongly induced Th1 activity from the peptides derived from FIPV structural proteins. Prevention against FIPV-induced FIP was slightly better in SPF cats treated with peptides derived from the structural protein of FIPV. We have prepared monoclonal antibodies (MAb) that neutralize feline TNF- $\alpha$  (MAb 2-4). Progression to FIP was prevented in 2 out of 3 cats treated with MAb 2-4. These results may provide important information for the development of therapeutic agents and vaccines against FIP.

研究分野：獣医感染症学、獣医ウイルス学

キーワード：猫伝染性腹膜炎 ワクチン 抗ウイルス薬 TNF- $\alpha$  コロナウイルス

1. 研究開始当初の背景

2002年、致死性コロナウイルス感染症である SARS ウイルスの流行により東アジアを中心に約 800 人が死亡した。猫伝染性腹膜炎(FIP)はネコ科動物の致死性コロナウイルス感染症である。FIP では、感染および発症の防御に有効なワクチンは存在せず、治療法も確立していない。FIPV 感染では、ウイルスが抗体と共にマクロファージに取り込まれることでウイルス感染の増強および TNF- の過剰な産生が起こる。この現象は抗体介在性感染増強 (ADE) と呼ばれる。FIPV 感染猫において液性免疫が誘導された場合、ADE が誘発されて重篤な症状に陥る (図 1)

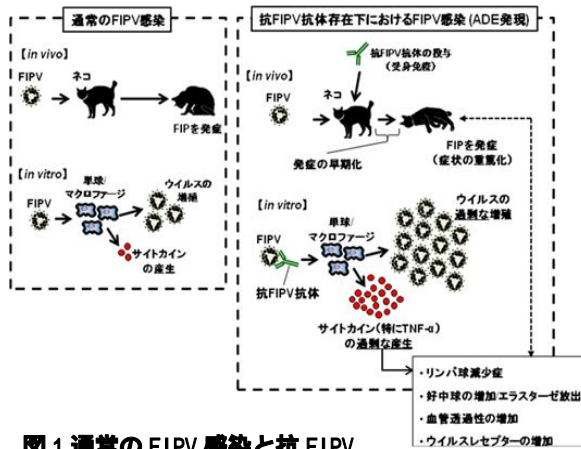


図 1 通常の FIPV 感染と抗 FIPV 抗体存在下における FIPV 感染(ADE 発現)の比較

我々は、FIPV のワクチンおよび FIP の治療薬の開発を目指して、約 20 年間に渡って研究し続けてきた (Hohdatsu et al., 1991 Arch. Virol. 120: 207-217; Takano et al., 2011 Virus Res. 158:161-168.他 24 報)。これらの結果を踏まえると、FIP の発症を抑制するためには、液性免疫ではなく細胞性免疫を誘導する物質、TNF- を抑制する物質 が有効であることが明らかとなった。本研究では、ADE 作用を誘導しない細胞性免疫誘導型ワクチンを開発するため、ウイルスに存在する細胞性免疫誘導エピトープを同定する。また、抗 TNF- 製剤が治療に応用できるか否かについても併せて検討する。

2. 研究の目的

(1) 細胞性免疫を誘導するワクチン抗原の同定 我々は、FIPV の Nucleocapsid (N) 蛋白質において、液性免疫をほとんど誘導せずに細胞性免疫を誘導するエピトープ (Th1 エピトープ) を複数同定した (Sato et al., 2011 Vaccine 29:1791-1800.他 3 報)。本研究では、FIPV において Th1 エピトープが同定されていない部分、即ち Membrane (M) 蛋白質の全領域および Spike (S) 蛋白質の S1 領域に存在する Th1 エピトープを同定する。さらに、Th1 エピトープを含む peptide および組換え蛋白質を猫に投与することで細胞性免疫を誘導できるか否かを明らかにする。

(2) 細胞性免疫誘導型ワクチンによる FIP 発症防御効果の検討 我々は、猫の細胞性免疫を誘導する CpG-oligo nucleotides (ネコ型 CpG-ODNs) を作製した (Sato et al., 2011 Microbiol. Immunol. 55:184-190)。このネコ型 CpG-ODNs をアジュバントとして、Th1 エピトープを含む peptide または組換え蛋白質を猫に免疫する。その後、FIPV を攻撃して FIP 発症防御効果について確認する。

(3) 抗猫 TNF 製剤の FIP 治療効果の検討 我々は、猫 TNF- を中和するマウスモノクローナル抗体 (抗 TNF 抗体) を作製した (高野ら. 2011. 第 151 回日本獣医学会学術集会要旨集 p230、他 2 報)。本研究では、抗 TNF 抗体を FIP 発症猫に投与して、その治療効果について確認する。

3. 研究の方法

(1) ワクチン抗原としての peptide のスクリーニング 細胞性免疫誘導型ワクチンを開発するため、FIPV に実験感染した猫のうち、FIP 発症を免れた猫 (FIPV 感染耐過猫) を使用して Th1 活性を持つ peptide を選択する (図 2)。本法は Th1 活性を持つ peptide のスクリーニングには最適な手法である (Sato et al., 2011 Vaccine

29:1791-1800)。本研究では、FIPV S 蛋白質および M 蛋白質由来の peptide (各 20mer) から Th1 活性を有するものを選び出す。

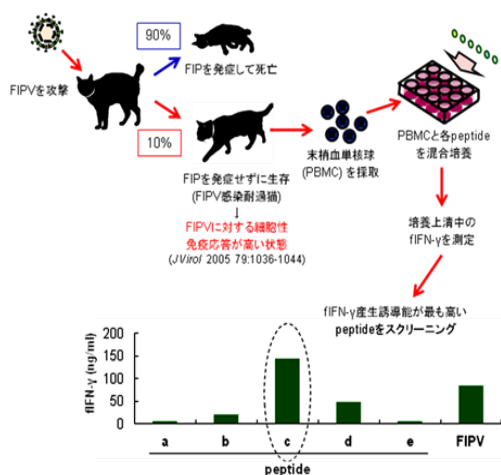


図2 Th1 活性を持つエピトープのスクリーニング法(Satoh et al. 2011 Vaccine を参照)

(2) FIPV 感染猫を用いたワクチン防御効果の検討 1)の実験において得られた、細胞性免疫誘導活性が高い peptide を使用して、実際に猫に投与する。その後、投与した猫において細胞性免疫が誘導されたか否かを測定する。その後、FIPV を攻撃することで、投与した peptide が本当に FIP 発症防御に有効なワクチンとして応用できるか否かを検討する。なお、peptide 単独では猫に対する免疫誘導能に乏しい可能性が考えられるので、その場合はワクチンアジュバントとして、CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODNs)を使用する。本アジュバントは猫に対して高い細胞性免疫誘導能を保有することが明らかになっている (Satoh et al., 2011. Microbiol. Immunol. 55:184-190)。

(3) 抗FIP発症猫を用いた抗TNF製剤の効果の検討 実験的に作出したFIP発症猫に、作製した抗TNF抗体を投与して、その治療効果を検討する。抗TNF製剤の投与時期については、FIP発症の指標となる血液中のリンパ球(CD8陽性T細胞およびsIg陽性CD21陰性B細胞)の変動、A/G比、血清1-急性糖蛋白質およびVEGF量を定期

的に測定することで判断する。

(4) ネコ化抗TNF抗体の作製 3)で使用した抗TNF製剤(抗猫TNF抗体)はマウス由来の抗体であるため、猫に複数回投与した場合、副作用を生じることが懸念される。そこで、梅橋らの方法(2002. J. Jpn. Vet. Med. Assoc. 55:293-297)を参照に猫IgG定常領域遺伝子を含むプラスミドベクターを作製する。そのベクターに、抗体産生ハイブリドーマのmRNAから作製したMab 2-4の可変領域cDNAを連結させ、これをミエローマ細胞に形質転換して、副作用を軽減させた猫化抗TNF抗体を産生させる。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞性免疫を誘導するワクチン抗原の同定 我々はFIPVのM蛋白質の全領域およびS蛋白質のS1領域のアミノ酸配列を基に20merのペプチドを88個作製した。なお、M蛋白質のN末端側の一部およびS1領域についてはFIPVの血清型それぞれに対してペプチドを作製した。これらのpeptideをFIPV感染耐過猫のPBMCと共培養後、培養上清中のIFN- $\gamma$ 産生量を測定してTh1 epitopeの検索を行った。I型FIPV感染耐過猫のPBMCでは、M蛋白質由来のpeptideであるM6、M9およびM12が特に強いIFN- $\gamma$ 誘導能を示した。II型FIPV感染耐過猫のPBMCでは、M6、M9およびS1由来のII-S1-24が特に強いIFN- $\gamma$ 誘導能を示した。次に、今回および以前の結果を踏まえて計13種類のpeptideを選抜してTh1活性誘導能を比較したところ、I型FIPV感染耐過猫ではI-S2-15およびM9が、II型FIPV感染耐過猫ではII-S1-24、M6およびM9が強いTh1活性誘導能を示した。最後に、SPF猫にI-S2-15、II-S1-24およびM9をCpG-ODNと混合後、liposomeに包括して皮下投与した。2回目免疫2週間後のTh-1活性を測定したところII-S1-24

およびM9に対するTh-1活性の有意な上昇が認められた。

- (2) 細胞性免疫誘導型ワクチンによるFIP発症防御効果の検討 以前、我々はI型FIPV KU-2株N蛋白質由来のpeptideのうち、Th-1 epitopeを有するpeptide (NP7およびNP8)およびTh-1活性を誘導する猫特異的CpG-ODNs (fCpG-ODNs)を同定した (Sato et al., 2011. Microbiol. Immunol. 55:184-190, 他1報)。fCpG-ODNsをアジュバントとしたpeptide ワクチン (NP7 and NP8 with fCpG-ODNs)をSPF猫に三回免疫した後、II型FIPV 79-1146株を攻撃して、FIP発症に対する抑制効果を検討した。NP7 and NP8 with fCpG-ODNsを投与したSPF猫ではII型FIPV 79-1146株攻撃後にFIPの発症を阻止できなかったものの、NP7およびNP8に対するTh-1活性の誘導が認められた。また、FIPの症状が緩和される傾向が認められた。また、NP7 and NP8 with fCpG-ODNsの濃度および投与回数が多い場合、immune toleranceが誘導されてFIP発症が抑制されない可能性も示唆された。

- (3) 抗猫TNF製剤のFIP治療効果の検討 我々は、実験的に作出したFIP発症猫に抗猫TNF-抗体(マウスモノクローナル抗体)を投与することでFIPの病態が改善されるか否かを検討した。FIPの初期症状が出現すると想定されるFIPV攻撃後14日目に、精製マウス抗猫TNF-抗体(0.9mg/mL)を猫3頭に10mL/頭で静脈内に投与した。対照群として溶媒(PBS)10mL/頭を猫3頭に投与した。その結果、FIPV攻撃後に減少したリンパ球およびCD8陽性T細胞数が、投与群において正常値まで回復した。また、血中1-

酸性糖蛋白質(AGP)は、抗体投与前には増加傾向が認められたものの、抗体投与7日目では投与群においてAGPの産生が抑制される傾向を示した。また、投与群および対照群における生存率は、対照群で0/3頭(0%)であったのに対して、投与群は2/3頭(66.7%)であった。さらに、実験に供試した猫の体温、体重および臨床症状から算出したカルノフスキースコアは、投与群では対照群より有意に高いスコアが得られた。即ち、抗猫TNF-抗体を投与することでFIP発症猫の臨床症状が改善することが示された。

#### 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)

[雑誌論文](計11件)

Doki, T., Takano, T. and Hohdatsu, T. 2016. Development of a mouse-feline chimeric antibody against feline tumor necrosis factor-alpha. J. Vet. Med. Sci. In press. doi.org/10.1292/jvms.16-0020 (査読有)

Doki, T., Takano, T., Kawagoe, K., Kito A. and Hohdatsu T. 2016. Therapeutic effect of anti-feline TNF-alpha monoclonal antibody for feline infectious peritonitis. Res. Vet. Sci. 104: 17-23. (査読有)

Takano, T., Satomi, Y., Oyama, Y., Doki, T. and Hohdatsu, T. 2016. Differential effect of cholesterol on types I and II feline coronavirus infection. Arch. Virol. 161: 125-133. (査読有)

Takano, T., Nakano, K., Doki, T. and Hohdatsu, T. 2015. Differential effects of viroporin inhibitors against feline infectious peritonitis serotypes

I and II. Arch. Virol. 160: 1163-1170.  
(査読有)

Takano, T. and Hohdatsu, T. 2015.  
Serological diagnosis of feline  
coronavirus infection by immunochro-  
matographic test. Methods Mol. Biol.  
1282: 33-39. (査読有)

Doki, T., Takano, T., Koyama, Y.  
and Hohdatsu, T. 2015. Identification of  
the peptide derived from S1 domain that  
inhibits type I and type II feline  
infectious peritonitis virus infection.  
Virus Res. 204: 13-20. (査読有)

Takano, T., Tomizawa, K., Morioka,  
H., Doki, T. and Hohdatsu, T. 2014.  
Evaluation of protective efficacy of the  
synthetic peptide vaccine containing the  
T-helper 1 epitope with CpG oligodeoxy-  
nucleotide against feline infectious  
peritonitis virus infection in cats.  
Antivir. Ther. 19: 645-650. (査読有)

Takano, T., Ishihara, Y.,  
Matsuoka, M., Yokota, S., Matsuoka-  
Kobayashi, Y., Doki, T. and Hohdatsu, T.  
2014. Use of recombinant nucleocapsid  
proteins for serological diagnosis of  
feline coronavirus infection by three  
immunochromatographic tests. J. Virol.  
Methods 196: 1-6. (査読有)

Takano, T., Morioka, H., Gomi, K.,  
Tomizawa, K., Doki, T. and Hohdatsu, T.  
2014. Screening and identification of T  
helper 1 and linear immunodominant  
antibody-binding epitopes in spike 1  
domain and membrane protein of feline  
infectious peritonitis virus. Vaccine  
32: 1834-1840. (査読有)

Takano, T., Katoh, Y., Doki, T.  
and Hohdatsu, T. 2013. Effect of

chloroquine on feline infectious  
peritonitis virus infection in vitro and  
in vivo. Antiviral Res. 99: 100-107. (査  
読有)

Doki, T., Takano, T., Nishiyama,  
Y., Nakamura, M. and Hohdatsu, T. 2013.  
Generation, characterization and  
therapeutic potential of anti-feline  
TNF-alpha MAbs for feline infectious  
peritonitis. Res. Vet. Sci. 95:  
1248-1254. (査読有)

[学会発表](計4件)

土岐 朋義, 川越 浩平, 高野 友美,  
宝達 勉. 2015. ネコ TNF- $\alpha$  を中和するマウ  
スモノクローナル抗体のネコ伝染性腹膜炎  
(FIP) に対する治療効果とマウス-ネコキメ  
ラ化抗体の作製. 第 11 回日本獣医内科学ア  
カデミー学術集会 パシフィコ横浜 (神奈  
川県 横浜市). 2015 年 2 月 21 日. 講演要旨  
集 p242.

土岐 朋義, 盛岡 寛行, 小山 祐介,  
高野 友美, 宝達 勉. 2014. I 型 feline  
infectious peritonitis virus (FIPV) S 蛋白質  
(S1 ドメイン) 由来 peptide の coronavirus に  
対する感染抑制効果. 第 157 回日本獣医学  
会学術集会 北海道大学(北海道 札幌市).  
2014 年 9 月 10 日. 講演要旨集 p413.

土岐 朋義, 高野 友美, 富沢圭祐,  
盛岡 寛行, 佐藤 亮一, 宝達 勉. 2013. I 型  
猫伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV) KU-2 株 N  
蛋白質由来 peptide(NP)の FIP 発症予防効果  
の検討. 第 156 回日本獣医学会学術集会  
岐阜大学(岐阜県 岐阜市). 2013 年 9 月 21  
日. 講演要旨集 p279.

高野 友美, 盛岡 寛行, 富沢圭祐,  
五味 宏二, 土岐 朋義, 宝達 勉. 2013.  
猫伝染性腹膜炎ウイルスの構造蛋白質(M  
および S1 domain)における Th1 epitope の検  
索と Th1 活性誘導能について. 第 156 回日

本獣医学会学術集会 岐阜大学(岐阜県 岐阜市) 2013年9月21日. 講演要旨集 p280.

〔その他〕

ホームページ等

北里大学獣医学部ホームページ

獣医学科「研究成果トピックス」

猫伝染性腹膜炎(FIP)に対するクロロキンの治療効果

([http://www.kitasato-u.ac.jp/vmas/faculty/vm/topix\\_index.html](http://www.kitasato-u.ac.jp/vmas/faculty/vm/topix_index.html))

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宝達 勉(Hohdatsu Tsutomu)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：00129264

### (2) 研究分担者

高野 友美(Takano Tomomi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：20525018