

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12518

研究課題名(和文)新しい子宮頸ガン予防法の開発

研究課題名(英文)Development of novel therapeutics for the preventions of cervical cancer

研究代表者

塚本 康浩 (Tsukamoto, Yasuhiro)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：90305657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ダチョウ抗体作製技術で抗HPV中和抗体の作製を試みた。HPVはヒトの子宮頸がんの発症に關与するパピローマウイルスである。HPVのウイルス様粒子(virus-like particle: VLP)を作製し産卵ダチョウに免疫することにより卵黄よりIgYを精製した。得られたIgYはVLPに特異的に高感度で反応することが判明した。また培養細胞での感染実験で中和活性を有することが判明した。子宮頸粘膜上皮細胞へ感染する際にウイルス表面にダチョウIgYが結合し細胞への吸着・感染を抑制出来ると考えられ、ローション等への適応によりHPV感染予防、結果として子宮頸がんの予防に貢献できると期待された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have developed ostrich IgY against HPV proteins. The IgY could bind specifically to HPV proteins and neutralize the viral infections to culture cells even in the lower dosages. These results suggested that IgY against HPV proteins blocked the viral adsorptions onto cell surface of culture cells and inhibited the viral infections. The IgY might have a potential to inhibit and prevention of HPV infections in humans by applying in lotions etc, leading to prevention of cervical cancers. We need further in vivo and clinical studies to clarify this point.

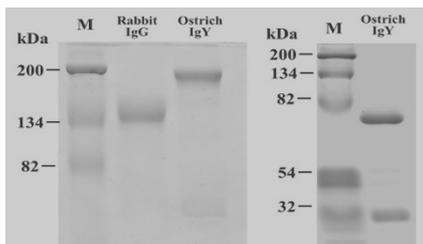
研究分野：免疫学 ウイルス学

キーワード：子宮頸がん 抗体 HPV ダチョウ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 私たちは、世界で初めて超大型鳥類“ダチョウ”を用いて高感度で高精度の抗体（卵黄抗体 IgY）を低コスト（ウサギやマウス抗体の4000分の1）で大量（1羽のダチョウ半年間でウサギ800匹）に作製する技術開発に成功した。さらに、ダチョウ抗体は病原体や毒素の中和活性が高く、熱（120℃、20分）や酸（pH3）にも強いことを見だし、過酷な加工や生産ラインに投入できるため、様々な大量消費型の製品への応用化を実現させた。



ダチョウ IgY の電気泳動像 (SDS-PAGE, 右は還元下) ダチョウ IgY の分子量 (200kDa) はウサギ IgG より大きい。H および L 鎖で構成されている。

(2) 子宮頸ガンは罹患数・死亡数において女性の癌で第2位を占めている。ヒトパピローマウイルス (HPV) の感染により子宮頸ガンが発症されることから、思春期女子への HPV ワクチン (能動免疫) により予防が可能とされている。しかしながら、その予防効果が明確でない点、および、ワクチンが極めて高価であることからその有用性と利用性が疑問視されている。HPV は性交により子宮頸粘膜

の基底細胞に感染し、癌化を引き起こすことが証明されているが、すでに感染している場合はワクチンが無効とされているため、接種のタイミングと有用性の判断が困難である。

(3) 抗体投与は所謂「受動免疫」であり、オンデマンド (性交時) な使用で即効性が期待できる。多数の人への汎用適応には、安価な抗体の大量生産が必要となる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ダチョウ抗体を用いて、ヒトの子宮頸ガンの誘発因子として知られているヒトパピローマウイルス (HPV) に対する中和抗体をダチョウ卵黄を用いることにより大量作製する。

(2) 次に、このダチョウ抗体をジェルやコンドーム等へ混和させることで性交による HPV の生殖器への感染を防御する方法を開発する。これにより、受動免疫による新規の子宮頸ガン予防法を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

子宮頸ガン関連ヒトパピローマウイルス (HPV) とされている HPV のウイルス様粒子 (virus-like particle: VLP) をバキュロウイルス発現系を用いて作製した。精製した VLP を抗原として産卵雌ダチョウ (5歳齢) に免疫し、卵黄抗体 (IgY) を高精度でかつ大量、さらに均一的に回収することを試みた。次に、培養細胞系の感染実験により、作製した抗 HPV ダチョウ抗体 (IgY) の HPV に対する中和活性 (感染抑制性) を検証した。将来的には、ローションやコンドーム表面への適応 (性交時のウイルス感染予防) を謀るため、抗体原料としての安全性試験 (GLP に準じる) および安定性試験を実施した。

(1) 抗 HPV ダチョウ抗体 (IgY) の作製: プラスミドの構築、培養細胞への導入、培養細胞の上清または細胞ライセートから L1 タンパク質の回収・精製、ウエスタンブロッティングおよび透過型電子顕微鏡による確認、L1 タン

パク質の大量作製と精製を行った。最終的に完成度の高いHPVのVLPを産卵雌ダチョウに接種した。経時的に採血し、ELISAにより抗体価が最大値に達した時点で、ダチョウ卵黄より抗体 (IgY) を精製した。HPVに対するIgY価をELISAにて評価し、卵黄からの精製純度および回収率が最大になるように、免疫抗原量および免疫プログラムを最適化した。



抗体研究用のダチョウ
(京都府立大学連携牧場にて)



(2) HPV に対するダチョウ IgY の感染中和能の

検証: HPV pseudovirion (PsV) の作製のため、pYSEAP を用いたアルカリフォスファターゼ発現 psV16 と psV18 プラスミドを構築した。これらを培養細胞に導入し、PsV を回収・精製した。ダチョウ IgY と PsV を混和し、培養細胞に感染させ、アルカリフォスファターゼ発現量により感染力価を測定し、ダチョウ IgY の中和活性価を算出した。

(3) 抗 HPV ダチョウ IgY の安全性および安定性試験:

将来的には、抗 HPV ダチョウ IgY を性交時に使用するローションやコンドーム表面に適応させるため、急性毒性試験、皮膚刺激性試験、変異原性試験、ヒトパッチテスト、眼刺激性試験を行った。また、将来的には医薬部外品などへの応用化が期待できるため、抗体原料およびローション配合物とし

ての安定性試験を実施した。恒温恒湿 (例: 50°C, 70%) 条件下で一定期間保存し、ELISA にて各 HPV 抗原に対するダチョウ IgY の反応性を検証した。

4. 研究成果

HPV の VLP を作製し、産卵ダチョウに免疫することにより卵黄より IgY を精製した。1 個のダチョウ卵黄より精製された総 IgY 量は約 4g であった。得られた IgY は HPV (VLP) に特異的に高感度で反応することが判明した。また培養細胞での感染実験で中和活性を有することが判明した。実験動物を用いた安全性試験においても、IgY の暴露による異常は認められないことが判明した。さらに、安定化剤との混和によりローション内での IgY 活性が常温で 1 年間以上維持しうる条件設定に成功した。子宮頸粘膜上皮細胞へ感染する際にウイルス表面にダチョウ IgY が結合し細胞への吸着・感染を抑制出来ると期待され、ローションや避妊具への適応により HPV 感染予防、つまり結果として子宮頸がんの予防に貢献できると期待された。今後、*in vivo* および臨床試験により、その応用性を確立する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/animal_hyg/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 康浩 (TSUKAMOTO Yasuhiro)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：90305657

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし