

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780285

研究課題名（和文）猫 TNF- $\alpha$  に対する抗体を用いた猫伝染性腹膜炎の治療法の確立研究課題名（英文）Development of a feline TNF- $\alpha$  monoclonal antibody with therapeutic potential against feline infectious peritonitis.

研究代表者

高野 友美（TAKANO TOMOMI）

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：20525018

研究成果の概要（和文）：TNF- $\alpha$  は猫伝染性腹膜炎(FIP)発症猫におけるリンパ球減少、好中球増加およびウイルスレセプター(APN)の増加に関与することが示唆されている。即ち、TNF- $\alpha$  の作用を制御できれば、FIPの病態悪化も抑制できると考えられる。我々は、抗猫TNF- $\alpha$ モノクローナル抗体を作製した。その結果、作製したモノクローナル抗体の一つ(MAb 2-4)は組換え猫TNF- $\alpha$ のWEHI-164細胞に対する傷害活性を抑制した。また、本抗体はTNF- $\alpha$ による猫リンパ球のアポトーシスの抑制、好中球およびAPNの増加を抑制することも明らかになった。以上を踏まえると、我々が作出した抗体はFIPの治療に応用できる可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Feline infectious peritonitis virus (FIP virus: FIPV), a feline coronavirus (FCoV) of the family Coronaviridae, causes a fatal disease called FIP in wild and domestic cat species. We previously showed that virus replication in macrophages induced TNF- $\alpha$  production, and that the TNF- $\alpha$  produced was involved in aggravating the pathology of FIP: TNF- $\alpha$  produced by FIPV-infected macrophages was involved in lymphopenia and an increase in the level of the cellular receptor of type II FIPV, aminopeptidase N (APN). TNF- $\alpha$  reportedly inhibits neutrophil apoptosis, which suggests its involvement in neutrophilia in cats with FIP. These findings suggest that FIP symptoms may also be alleviated by administering a feline TNF- $\alpha$ -neutralizing antibody to cats with FIP. However, no feline TNF- $\alpha$ -neutralizing antibody has been developed. We attempted to prepare feline TNF- $\alpha$ -recognizing monoclonal antibodies (anti-feline TNF- $\alpha$  MAbs) and investigated whether these MAbs inhibited feline TNF- $\alpha$  activities. Furthermore, we investigated the application of an anti-feline TNF- $\alpha$  MAb as a therapeutic drug for FIP *in vitro*. Anti-feline TNF- $\alpha$  MAb 2-4 (MAb 2-4) exhibited high neutralizing activity against natural TNF- $\alpha$  derived from FIPV-infected macrophages, and was confirmed to inhibit the following feline TNF- $\alpha$ -induced conditions *in vitro*. It was suggested that MAb 2-4 inhibited FIP pathology by neutralizing the physiological activities of TNF- $\alpha$ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、臨床獣医学

キーワード：TNF- $\alpha$ 、コロナウイルス、抗体療法、猫伝染性腹膜炎

### 1. 研究開始当初の背景

2003年のSARSの発生以来、国内・国外ともに、SARSと同じコロナウイルスに起因するFIPの研究も飛躍的に進展しつつある。しかし、FIPの病態および治療法の研究は*in vitro*の実験が多く、FIP発症猫を用いた研究はほとんど行われていない。我々はFIP発症猫の病態についての研究を行っており、新たな発見をいくつか報告してきた(Takano et al., 2007. Virology 他3報)。本研究ではFIPの病態に関する研究をさらに発展させ、実験的にFIPを発症した猫を用いて臨床応用可能なFIPの治療法を開発する。

### 2. 研究の目的

本研究は猫伝染性腹膜炎(FIP)に対する有効な治療法の開発を目的としている。致死性のウイルス性疾患であるFIPの病態は複雑であり、未だ解明されていない部分が多い。本研究では実験的にFIP発症猫を作出し、炎症細胞、特に単球および好中球がFIPの病態に与える影響を確認する。また、FIP発症猫の病態悪化に関わるとされる炎症関連因子に対する抗体や阻害剤を用いてFIP治療への効果を検討する。

### 3. 研究の方法

**平成22年度** 初年度は、FIP治療に適した抗猫TNF- $\alpha$ 抗体の選択を行った。まず、当研究室所有の抗猫TNF- $\alpha$ 抗体産生ハイブリドーマを用いて、精製抗体を作製した。次に、猫TNF- $\alpha$ の感受性細胞(WEHI-164細胞)を用いて、強い中和活性を持つ抗猫TNF- $\alpha$ 抗体を選択した。

**平成23年度** 平成24年度に選別した抗体(MAb 2-4)がFIP発症猫の症状改善に効果があることを猫由来の細胞を用いて*in vitro*で検討した。具体的には猫TNF- $\alpha$ によるリンパ球へのapoptosis作用、好中球への抗apoptosis作用、FIPのウイルスレセプター(APN)の発

現および血管透過性の亢進を本抗体で抑制できるか否かを検討した。

**平成24年度** 平成23年度に引き続き、MAb 2-4がFIP発症猫の症状改善に効果があるか否かを検討した。また、TNF- $\alpha$ 産生を抑制する効果が報告されているクロロキンを用いて、実際にFIP発症猫に対して抗TNF- $\alpha$ 作用を目的とした治療が有効か否かを検討した。

### 4. 研究成果

今回、我々は猫TNF- $\alpha$ の活性を抑制するモノクローナル抗体(MAb)を作出した。作出した抗体について、WEHI-164細胞を用いて猫TNF- $\alpha$ に対する中和活性の有無を検討したところ、4つの抗体において強い中和活性が認められた。このうち、MAb 2-4は、TNF- $\alpha$ による猫リンパ球(T細胞由来株化細胞)のapoptosis作用および好中球の抗apoptosis作用を抑制し、さらにはFIPVのウイルスレセプターの発現を抑制することが確認された。さらに、MAb 2-4はTNF- $\alpha$ による血管内皮細胞の透過性亢進作用も抑制する可能性が示唆された。以上を踏まえると、我々が作出した抗体はFIPの治療に応用できる可能性が高いと考えられた。また、クロロキンを用いた実験により、抗TNF- $\alpha$ 療法はFIP治療に有効である可能性が強く示唆された。現在、実験的にFIPを発症させた猫を用いて本抗体の治療効果の有無を検討しているところである。

### 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2件)

① Takano T, Katoh Y, Doki T, Hohdatsu T, Effect of chloroquine on feline infectious peritonitis virus infection *in vitro* and *in vivo*, Antiviral Research, 査読有、2013、In press、doi: 10.1016/j.antiviral.2013.04.016.

② Takano T, Ohyama T, Kokumoto A, Satoh R, Hohdatsu T, Vascular endothelial growth factor (VEGF), produced by feline infectious peritonitis (FIP) virus-

infected monocytes and macrophages, induces vascular permeability and effusion in cats with FIP、Virus Research、査読有、158(1-2)巻、161-168、doi: 10.1016/j.virusres.2011.03.027

〔学会発表〕(計7件)

- ① 高野友美、加藤泰一郎、土岐朋義、宝達勉、猫伝染性腹膜炎(FIP)治療薬としてのクロロキンの有効性について、第154回日本獣医学会学術集会(岩手大学、盛岡)、2012年9月15日、講演要旨集 p254
- ② 高野友美、土岐朋義、宝達勉、猫伝染性腹膜炎(FIP)治療薬としてのクロロキンの有効性について、第15回北里微生物アカデミー(北里大学、東京)、2012年8月2日、講演要旨集 p69
- ③ 土岐朋義、高野友美、宝達勉、猫伝染性腹膜炎(FIP)の治療を目的とした抗猫 TNF- $\alpha$  製剤の開発、第15回北里微生物アカデミー(北里大学、東京)、2012年8月2日、講演要旨集 p70
- ④ 高野友美、土岐朋義、白石政憲、宝達勉、猫伝染性腹膜炎(FIP)の治療を目的とした抗猫 TNF- $\alpha$  製剤の開発、第152回日本獣医学会学術集会(大阪府立大学、大阪)、2011年9月21日、講演要旨集 p244
- ⑤ 高野友美、西山友理、佐藤美幸、早坂惇郎、東奈都子、中村美智代、佐藤亮一、宝達勉、猫伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)感染マクロファージから放出される TNF- $\alpha$  は好中球エラストラーゼの産生を促進する、第151回日本獣医学会学術集会(東京農工大学、府中)、2011年3月30日、講演要旨集 p230
- ⑥ 高野友美、大山拓、黒元愛子、佐藤亮一、宝達勉、猫伝染性腹膜炎(FIP)発症猫における滲出液貯留と血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の関係、第150回日本獣医学会学術集会(帯広畜産大学、帯広)、2010年9月16日、講演要旨集 p230
- ⑦ 高野友美、宝達勉、猫伝染性腹膜炎の病態悪化機構の解明、第13回北里微生物学アカデミー(北里大学、十和田)、2010年8月6日、講演要旨集 p90-91

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高野 友美 (TAKANO TOMOMI)  
北里大学・獣医学部・講師  
研究者番号：20525018