

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14986

研究課題名（和文）臨床応用のための抗TNF-alpha抗体を用いた猫伝染性腹膜炎治療薬の開発研究

研究課題名（英文）The development of drug for feline infectious peritonitis using anti-TNF-alpha antibody

研究代表者

土岐 朋義（DOKI, Tomoyoshi）

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：40792396

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：猫伝染性腹膜炎（FIP）はウイルス感染症であると同時にTNF-alphaが病態に強く関与する免疫介在性炎症性疾患である。本研究は抗ネコTNF-alpha抗体を用いたFIPに対する治療法の確立を目的とし、抗ネコTNF-alpha抗体の発現系の改良と、治療法が確立されるまでの応急策としてヒト型抗TNF-alpha製剤をFIPの治療に応用するドラッグリポジショニングの可能性を検討した。本研究課題で我々はネコTNF-alphaに中和活性を有するヒト型抗TNF-alpha製剤を選抜するとともに抗ネコTNF-alpha抗体の発現系を改良することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、猫伝染性腹膜炎（FIP）に対する治療法研究はFIPの原因となるネココロナウイルスに対する抗ウイルス薬開発が主である。しかし、FIPの病態の一つである強い炎症に対しては、対症療法として免疫抑制剤や抗炎症薬の投与が検討されているに過ぎない。本研究成果は獣医師がFIPの治療薬として抗TNF-alpha製剤を用いるために有用である。また、FIPだけでなく病態形成にTNF-alphaが関与するヒトのウイルス感染症も報告されている。TNF-alphaの抑制を目的としたFIPの治療法を確立すれば、これらのヒトにおけるウイルス性疾患に対する新しい治療法の開発に新たな方向性を見出すものと思われる。

研究成果の概要（英文）：Feline infectious peritonitis (FIP) is a viral infection and an immune-mediated inflammatory disease. TNF-alpha plays a critical role in progression of FIP. In this study, we aimed to investigate the possibility of drug repositioning of anti-human TNF-alpha drugs for treatment of FIP and improve the expression system of anti-feline TNF-alpha antibodies. We found human anti-TNF-alpha drugs with neutralizing activity against feline TNF-alpha and successfully improved the expression system of anti-feline TNF-alpha antibodies.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：ネココロナウイルス 猫伝染性腹膜炎 ネコ 抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

猫伝染性腹膜炎 (FIP) はネココロナウイルスに属する FIP ウイルス (FIPV) によって引き起こされるイネネコおよびネコ科動物の致死性ウイルス感染症であり、FIP は飼いネコの死亡原因の第 3 位、感染症としては第 1 位の死亡原因である。1963 年に FIP が報告されて以来、未だに獣医臨床現場における有効なワクチンおよび治療方法は確立されていない。FIP に対する治療として、輸液をはじめとした支持療法に加え、ネコインターフェロン や炎症の緩和を目的として免疫抑制剤が投与される (Ishida et al., 2004, J Feline Med Surg., 6:107-109)。しかし、これらの対処療法は FIP に対して有意な治療効果を示さず、FIP を発症したネコのほとんどが死に至る (Ritz et al., 2007, J Vet Intern Med., 21:1993-1997)。

近年、FIPV の増殖を抑制する抗ウイルス薬の研究が盛んにおこなわれている (表 1)。このうち GC376 および GS-441524 は野外の FIP 発症ネコに対する治療実験でも治療効果を示しており、FIP の治療薬として期待されている。一方で、これらの抗ウイルス薬による治療に反応しない個体や、治療後に再び FIP を発症する個体も報告されており、さらに治療効果を向上させる必要がある。

FIP はウイルス感染症であると同時に免疫介在性炎症性疾患である。FIP の病態形成には FIPV に感染した単球およびマクロファージから過剰に産生される tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) が強く関与している (図 1)。即ち、FIPV 感染単球/マクロファージから産生された TNF-alpha は全身に炎症を惹起すると同時に、好中球増多症、リンパ球減少症、単球/マクロファージにおけるウイルス感受性の増加、胸・腹水の貯留に関わる。これらを踏まえると、TNF-alpha を抑制することで FIP の病態を改善できると考えられる。以前、応募者はネコ TNF-alpha を中和するモノクローナル抗体 (抗ネコ TNF-alpha 抗体) を作出し、この抗ネコ TNF-alpha 抗体が in vitro および in vivo において FIP の治療に有効であることを証明した (Doki et al, 2013, Res Vet Sci. 95:1248-1254, Doki et al., 2016, Res Vet Sci. 104:17-23)。抗ネコ TNF-alpha 抗体は FIP の治療薬の候補として応用が期待される。しかしながら、抗体製剤は高分子であり、化学合成法による大量生産が不可能である。現在、治療法として確立する上で抗ネコ TNF-alpha 抗体の安定供給にどのような発現系が必要なのかは明らかになっていない。

表1 FIPVに対する抗ウイルス薬の候補

薬剤名 (Reference)	作用点
FIPV S protein 由来ペプチド (Doki et al., 2015)	ウイルス吸着
ヘキサメチレンアミロライド (Takano et al., 2015)	FIPV E protein
GC-376 (Kim et al., 2016)	3C-like protease
GS-441524 (Murphy et al., 2018)	RNA-dependent RNA polymerase
シクロスポリン A (Tanaka et al., 2012)	Cyclophilin PPlase
クロロキン (Takano et al., 2013)	ウイルス侵入 (エンドソーム酸性化阻害)
ジフィリン (Hu et al., 2017)	ウイルス侵入 (エンドソーム酸性化阻害)
U18666A (Takano et al., 2017)	ウイルス侵入 (コレステロール輸送阻害)
イトラコナゾール (Takano et al., 2019)	ウイルス侵入 (コレステロール輸送阻害)

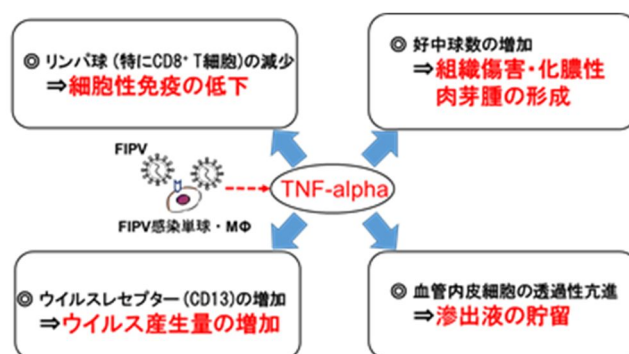


図1. FIPにおける病態悪化因子としてのTNF-alphaの役割

2. 研究の目的

現在、国内外で FIP に対する治療薬として抗ウイルス薬が研究されている。しかし、FIP の病態の一つである強い炎症に対しては、対症療法として免疫抑制剤や抗炎症薬の投与が検討されているに過ぎない。本研究の目的は抗ネコ TNF-alpha 抗体を用いた FIP に対する治療法の確立である。この目的のために本研究では抗ネコ TNF-alpha 抗体の発現系の改良と、治療法が確立されるまでの応急策としてヒト型抗 TNF-alpha 製剤を FIP の治療に応用するドラッグリポジショニングの有用性の検証を行うことを目標とする。

### 3. 研究の方法

#### ネコ TNF- $\alpha$ を中和するヒト型抗 TNF- $\alpha$ 製剤の選抜

現在、ヒト型抗 TNF- $\alpha$  製剤として 5 種の製剤が認可されており、それぞれ抗原性、認識エピトープ、分子量、薬物動態が異なっている。これらのヒト型抗 TNF- $\alpha$  製剤がネコ TNF- $\alpha$  に対して中和活性を示すか否かを調べる。

#### ネコ化抗ネコ TNF- $\alpha$ 抗体の高発現系の構築

応募者は動物用医薬品へ応用するために、マウス抗体である抗ネコ TNF- $\alpha$  抗体をネコ化したネコ型抗 TNF- $\alpha$  抗体を作出した (Doki et al., 2016, J Vet Med Sci. 78:1447-1455)。この発現系はマウスミエロマ細胞を用いており、収量は 1~2mg/L である。ネコへの抗体投与量が 10~50mg であることを踏まえると、安定的にネコへの投与を行うためにはさらなる収量の改善が必要である。そこで、高い発現量が期待できる細胞株を用いた発現系を構築するとともに、高収量の培養方法および条件を検討する。

### 4. 研究成果

#### ネコ TNF- $\alpha$ を中和するヒト型抗 TNF- $\alpha$ 製剤の選抜

ネコ TNF- $\alpha$  を中和するヒト型抗 TNF- $\alpha$  製剤の選抜を行った。ヒト型抗 TNF- $\alpha$  製剤のうち、ヒト型抗体であるアダリムマブ、マウス-ヒトキメラ化抗体であるインフリキシマブ、ヒト化抗体 Fab' フラグメントであるセルトリズマブペゴル<sup>®</sup>のネコ TNF- $\alpha$  に対する中和活性を調べた。その結果、アダリムマブおよびセルトリズマブペゴルもネコ TNF- $\alpha$  に対する中和活性を有する可能性が示唆された。一方、インフリキシマブはネコ TNF- $\alpha$  に対して中和活性を示さなかった (図 2)。このことは、インフリキシマブがネコ伝染性腹膜炎の治療薬として適さないことを強く示唆する。

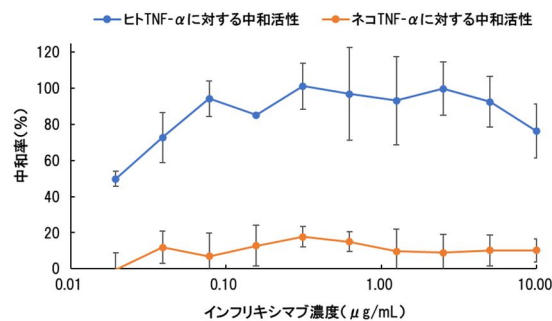


図2. インフリキシマブのヒトおよびネコTNF- $\alpha$ に対する中和活性

#### ネコ化抗ネコ TNF- $\alpha$ 抗体の高発現系の構築

既報の抗ネコ TNF- $\alpha$  抗体は H 鎖発現ベクターおよび L 鎖発現ベクターを cotransfection し、2 種類の抗生物質を用いて安定発現細胞を選抜している。遺伝子導入効率および選抜効率を増加させるため、L 鎖発現カセットを H 鎖発現ベクターに挿入した H 鎖および L 鎖発現ベクターを再構築した。また、この再構築した発現ベクターを用いて抗ネコ TNF- $\alpha$  抗体を安定発現する細胞の樹立を再度試みたところ、過去に樹立した安定発現細胞よりも高発現する細胞を 2 クローン樹立することに成功した。また、この新たに樹立した細胞の培養上清から精製した抗ネコ TNF- $\alpha$  抗体は過去に樹立したものよりも中和活性が高い可能性が示唆された。既報の発現ベクターの改良に加えて、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)遺伝子欠失 CHO 細胞(CHO dhfr-細胞)を用いた発現系に対応した発現ベクターを構築した。現在、この発現ベクターを用いた安定発現細胞を選抜中である。

研究期間を通じてネコ TNF- $\alpha$  に中和活性を有するヒト型抗 TNF- $\alpha$  製剤を選抜するとともに抗ネコ TNF- $\alpha$  抗体の発現系を改良することに成功した。特に、20 年以上にわたってヒト型抗 TNF- $\alpha$  製剤としてヒト医学領域で使用されてきたインフリキシマブがネコ伝染性腹膜炎の治療薬として適さないことは重要である。本研究で得られた知見は猫伝染性腹膜炎の新たな治療薬開発に有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Doki, T., Takahashi, K., Hasegawa, N. and Takano, T.	4. 巻 144
2. 論文標題 In vitro antiviral effects of GS-441524 and itraconazole combination against feline infectious peritonitis virus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Res. Vet. Sci.	6. 最初と最後の頁 27-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 土岐 朋義, 高野 友美	4. 巻 36
2. 論文標題 イトラコナゾールおよび抗ヒトTNF- $\alpha$ 製剤を用いた猫伝染性腹膜炎の治療の試み	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CAP: Companion Animal Practice	6. 最初と最後の頁 113-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠原 一輝, 土岐 朋義, 高野 友美
2. 発表標題 アルファコロナウイルス1に対するモルヌピラビルの抗ウイルス活性
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高野 友美  (TAKANO Tomomi)	北里大学・獣医学部・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------