

氏名(本籍)	近藤一成(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第2420号		
学位授与年月日	平成21年2月28日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Modification of Human Papillomavirus-Like Particle Vaccine by Insertion of the Cross-Reactive L2-Epitopes</b> (交差性L2-中和エピトープの挿入によるヒトパピローマウイルス様粒子ワクチンの改良)		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	澁谷彰
副査	筑波大学教授	薬学博士	永田恭介
副査	筑波大学准教授	医学博士	鳥居徹
副査	筑波大学講師	博士(医学)	工藤豊一郎

## 論文の内容の要旨

### (目的)

子宮頸癌発症の最大リスク因子は15種の高リスクHPVの感染である。16型(HPV16)がほぼ半数の子宮頸癌に関わる。現在欧米やアフリカ諸国等85カ国で販売されているHPVワクチンは、HPV16, 18のL1蛋白質で形成されるウイルス様粒子(L1 VLP)を抗原としている。このワクチンはHPV16, 18の感染を特異的に予防するが、その他の高リスクHPVに対する有効性は低いと推測されていて、これらの感染予防が残された課題である。本研究では、交差性抗体のエピトープ(HPV16L2蛋白質のアミノ酸18-38, 56-75, 96-115領域に存在)をHPV16L1に挿入した融合蛋白質によるキメラVLPを作製し、高リスクHPV群の感染を幅広く予防するための次世代ワクチン抗原となる可能性を検討した。

### (対象と方法)

16L1またはキメラ16L1蛋白質を組換えバキュロウイルス・昆虫細胞系で発現させ、核内に形成されたVLPを塩化セシウム密度平衡遠心で精製した。精製したVLPを電子顕微鏡にて粒子形成の有無を観察した。ウサギに16L1 VLP, 各キメラVLPを免疫し抗血清を得た。抗血清とVLPないしペプチド抗原との結合は、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で解析した。

HPV16, 18, 31, 52, 58のコドン変異L1及びL2遺伝子を293FT細胞で発現させ、生じた各L1/L2 VLPに分泌性アルカリフォスファターゼ発現プラスミドをパッケージさせて感染性偽ウイルス(pseudovirion: PV)を作製した。感染価は培養上清中のアルカリフォスファターゼ活性を指標とした。PVと抗血清を混合し、PVの感染価を半減させる血清希釈の逆数を中和抗体価とした。

### (結果)

HPV16L1蛋白質のアミノ酸430と433の間にHPV16L2蛋白質のアミノ酸18-38, 56-75, 96-115(101L, 112S)領域を挿入したキメラL1蛋白質(ch18/38, ch56/75, ch96/115)は、形態がやや不均一であるもののVLPを形成した。

挿入した L2 ペプチドに対する抗体はキメラ VLP と結合し、抗キメラ VLP 抗体は HPV16L1 VLP 及び L2 ペプチドと結合した。挿入したエピトープがキメラ VLP 表面にあって、抗原として認識されることがわかった。

3 種の抗キメラ VLP 抗体はすべて 16 型 PV を極めて効率よく中和した。抗 ch56/75VLP 抗体は 18, 31, 52, 58 型 PV も効率よく中和した。

(考察)

過去の報告 (Kondo et al. Virology 358, 266-272, 2007) において、ウイルス粒子表面に出ている L2 蛋白質の N 末端領域に抗体が結合すると感染が阻害される事が示されている。この領域のアミノ酸配列は高リスク HPV 群に極めて良く保存されているが、特に HPV16L2 のアミノ酸 56-75 領域に結合する抗体は HPV16, 18, 31, 58 に対する中和抗体を誘導し、高リスク HPV 群共通の中和エピトープを含むことが強く示唆されている。

L1 VLP は樹状細胞などの免疫担当細胞に認識されやすく、抗原提示能力に優れているので、型共通中和エピトープを現行ワクチン抗原の HPV16L1 VLP に挿入した新規ワクチン抗原の作製を試みた。試行錯誤を繰り返し、HPV16L1 のアミノ酸 430 と 433 の間に型共通中和エピトープを挿入したキメラ L1 蛋白質による VLP は、粒子構造を維持し、HPV16L1 VLP の抗 L1 中和抗体誘導能を保持したまま挿入エピトープも抗原提示することを見いだした。

欧米の研究グループは、ワタノオウサギパピローマウイルスをウサギに接種して病変を形成する実験系を使い、L2 蛋白質やその一部の免疫による感染阻止を示している。免疫された動物の抗 L2 中和抗体価は検出感度以下から 256 程度と報告されている。ch56/75VLP がウサギに誘導した抗 HPV18, 31, 52, 58 中和抗体価は 50-6400 程度で、ヒトにも同様の抗原性を持てば、幅広い型に対する HPV 感染を限界できると考えられた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は HPV16L1 に挿入した融合蛋白質によるキメラ VLP が、HPV に対する新規の強力なワクチン抗原となりうることを示したきわめて質の高い研究成果である。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。