

氏名（本籍） 中尾 砂理（鹿児島県）
 学位の種類 博士（医学）
 学位記番号 博甲第 6734 号
 学位授与年月 平成 25 年 1 月 30 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 審査研究科 人間総合科学研究科
 学位論文題目 Monoclonal antibodies recognizing cross-neutralization epitopes in human papillomavirus 16 minor capsid protein L2 (ヒトパピローマウイルス L2 キャプシドタンパク質にある交差性中和エピトープを認識するモノクローナル抗体の解析)

主	査	筑波大学教授	博士（理学）	入江 賢児
副	査	筑波大学教授	医学博士	野口 雅之
副	査	筑波大学准教授	博士（医学）	工藤 豊一郎
副	査	筑波大学助教	博士（医学）	加藤 広介

論文の内容の要旨

（目的）

ヒトパピローマウイルス（human papillomavirus, HPV）の感染は子宮頸がん発症の必要条件である。HPV は環状 2 本鎖 DNA ゲノムをもちエンベロープのない小型のウイルスで、キャプシドは 360 分子の L1 タンパク質と 12 分子の L2 タンパク質からなる。L1 遺伝子の塩基配列の相同性に基づいて遺伝子型に分類され、これまでに 100 以上の型がみつまっている。そのうち少なくとも 15 の型が高リスク型と呼ばれ、子宮頸がんの原因となる。現行の HPV 感染予防ワクチンは L1 のみからなるウイルス様粒子（virus-like particle, VLP）を抗原としている。抗 L1 抗体による中和は型特異的であり、現行ワクチンは、高リスク型では、HPV16, HPV18 にしか効果がないため、すべての高リスク型に有効な次世代ワクチンの開発が求められている。一方、L2 タンパク質に複数の交差性中和エピトープが見出され、ワクチン抗原として開発が進められている。これまでに、HPV16 L2 タンパク質のアミノ酸（amino acid, aa）56 から aa75 の配列を持つ合成ペプチド（P56/75）で免疫したウサギの抗血清が、最も幅広い型の HPV を中和することがわかっている。本研究では、HPV16 L2 タンパク質の aa56～aa75 領域にある交差性中和エピトープの詳細を調べ、幅広い HPV 型に有効な次世代ワクチン抗原として応用することを目的として研究が行われた。HPV16 L2 タンパク質の aa56～aa75 領域に結合するモノクローナル抗体（monoclonal antibody, MAb）が分離され、MAb が認識

するアミノ酸配列や MAb による高リスク型 HPV の中和が調べられた。

(対象と方法)

P56/75 で免疫した Balb/c マウスから脾臓細胞を回収し、マウス骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマが作製された。P56/75、及び、HPV16 の L1/L2 タンパク質からなるウイルス様粒子 (Virus-like particle, VLP) (L1/L2-VLP) に結合する抗体を産生するクローンが選択され、抗 P56/75MAb が得られた。ハイブリドーマから RNA を抽出し、イムノグロブリン cDNA 塩基配列が調べられ、MAb の可変領域のアミノ酸配列が推定された。HPV16 L2 タンパク質の aa53 から aa75 の配列に欠失やアラニン置換を導入した変異ペプチドを抗原とする ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) で、MAb が認識するエピトープが調べられた。MAb の高リスク型 (HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV51, HPV52, HPV58) L1/L2-VLP への結合を ELISA で調べられた。MAb の高リスク型 HPV に対する中和活性を、各型の感染性偽ウイルス (Pseudovirion, PsV) [分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 発現プラスミドを L1/L2-VLP にパッケージした PsV] の細胞への感染阻害により調べられた。3次元表皮培養 (Raft culture) を用いて HPV16, HPV31 を作製し、MAb による中和を調べられた。

(結果)

P56/75、及び、HPV16 L1/L2-VLP に結合する MAb13B と MAb24B が得られた。MAb13B と MAb24B のエピトープは、それぞれ、aa64~aa73 領域と aa58~aa64 領域に存在した。MAb13B は HPV16, HPV18, HPV51 L1/L2-VLP に結合し、HPV31, HPV33, HPV58 L1/L2-VLP への結合は弱かった。HPV35, HPV52 L1/L2-VLP には結合しなかった。MAb24B は調べた全ての高リスク型 L1/L2-VLP に結合した。MAb13B は HPV16, HPV18, HPV51 PsV を、MAb24B は調べた全ての高リスク型 PsV を中和した。MAb13B と MAb24B を等量ずつ混合した場合、各 MAb 単独よりも効率的に HPV16, HPV18, HPV51PsV を中和した。MAb13B、及び、MAb24B は、raft culture 由来の HPV16, HPV31 を中和した。

(考察)

MAb13B、及び、MAb24B が認識するエピトープのアミノ酸配列は、HPV 型間でよく保存されていることから、これらの MAb は幅広い型の HPV を中和できると推測された。2つの MAb による相乗作用があったことから、2つの抗体が同時に結合した L2 タンパク質は感染に不可欠な機能が著しく低下すると考えられた。MAb13B、及び、MAb24B は、ラフトカルチャー由来 HPV も中和したことから、PsV だけでなく本来の HPV も中和できると考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究では、ヒトパピローマウイルスにおいて、少なくとも 2つの交差性中和エピトープが HPV16L2 タンパク質の aa56~aa75 領域に存在することが明らかにされた。これらエピトープのアミノ酸配列は HPV の型間でよく保存されていた。HPV16L2 タンパク質の aa56~aa75 含む抗原は、幅広い型の HPV 感染を予防できる次世代ワクチンとして有用であると考えられた。これらの本研究成果は、幅広い HPV 型に有効な次世代ワクチン抗原を開発する上で重要な知見であり、高く評価される。

平成25年9月26日、博士(医学)学位論文審査専門委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明をもとめ、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委

審査様式 2 - 1

員全員によって合格と判定された。

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