

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)

2 0 1 3

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

中尾 砂理

筑波大学

博士（医学）学位論文

## 目次

### 1. 緒言

### 2. 方法

- ① 合成ペプチドの作成
- ② マウス免疫と MAb の分離
- ③ ウサギ抗血清の作製
- ④ VLP と L1/L2-VLP の作製
- ⑤ 免疫グロブリン可変領域のクローニングとヌクレオチド配列の決定法
- ⑥ ELISA
- ⑦ PsV の作製
- ⑧ MAb による PsV の中和
- ⑨ Raft culture 由来 HPV の作製
- ⑩ MAb による Raft culture 由来 HPV の中和

### 3. 結果

- ① MAb の分離
- ② MAb のアイソタイプと可変領域のアミノ酸配列
- ③ MAb13B と MAb24B の認識するエピトープ
- ④ MAb13B, MAb24B の高リスク型 L1/L2-VLP への結合能
- ⑤ MAb13B, MAb24B による高リスク型 PsV の中和
- ⑥ MAb13B, MAb24B による raft culture 由来 HPV の中和
- ⑦ ウサギでの MAb13B と MAb24B エピトープの認識

4. 考察
5. 結論
6. 謝辭
7. 參考文獻

## 1. 緒言

ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus, HPV) の感染は、子宮頸がん発生の必要条件である<sup>1)</sup>。子宮頸がんの罹患数、死亡数は、女性のがんでは世界第二位であり、毎年約50万人が罹患し約27万人が死亡している<sup>2)</sup>。ワクチンでHPVの感染を予防することにより、子宮頸がんの発生を防ぐことができる。

HPVは約8Kbの環状二本鎖DNAゲノムをもちエンベロープのない小型のウイルスである<sup>3)</sup>。キャプシドは、360分子のL1タンパク質で形成される正二十面体の骨格に12分子またはそれ以上のL2タンパク質が組み込まれて構成されている(図1A)<sup>4), 5), 6)</sup>。HPVはL1遺伝子の塩基配列の相同性に基づいて分類されており、100以上の遺伝子型がみついている。大きく分けると、皮膚病変に検出される皮膚型と、粘膜病変に検出される粘膜型に分けられる。粘膜型は、さらに、尖圭コンジローマ等の良性病変に検出される「低リスク型」と子宮頸がん、肛門周囲がん等に検出される「高リスク型」に分けられる(図1B)。少なくとも15の遺伝子型 (HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66, HPV68, HPV73) が高リスク型とされる<sup>7)</sup>。

HPVは表皮の微小な傷から侵入し、表皮基底細胞に感染する。未分化な基底細胞では、HPVゲノムは核内エピソームとして維持され、細胞分裂に伴い小規模に複製して娘細胞に分配される。このような潜伏感染状態では、ウイルス遺伝子の発現は極力抑制されており、宿主免疫系を刺激することはない。感染細胞の分化に伴い、ゲノム複製とキャプシドタンパク質の発現がおこり、ウイルス粒子が形成され、表皮最外層の脱落とともに感染性ウイルスが放出される。キャプシドタンパク質は増殖過程で最も多いウイルス蛋白質であり抗原として認識されうるので、分化した角化細胞でのみ発現するよう制御されており、HPVが宿主の免疫機構から逃れやすくなるしくみの一つとなっている。

高リスク型HPV増殖の過程で、偶発的にウイルスゲノムが宿主染色体に組み込まれると、ウイルス遺伝子の一部欠失やDNAのメチル化などによって本来のウイルス遺伝子発現調節機構が失われる。高リスク型HPVのE6、及び、E7は、それぞれp53、及び、pRbの機能を阻害することにより、細胞のDNA合成を活性化するがんタンパク質である。

組み込みによりE6、E7の高発現が継続すると異常な増殖能をもつ細胞となる。E6、E7の高発現に加え、宿主遺伝子に様々な変異が蓄積すると細胞が悪性形質を獲得し、がん化に至ると考えられている。

HPVは通常の培養細胞では増殖しないため、抗HPV抗体の検出のための抗原には、培養細胞でキャプシドタンパク質を発現させ、精製したウイルス様粒子 (Virus-like particle, VLP) が用いられる。L1タンパク質、または、L1とL2タンパク質を同時に細胞で発現させると細胞内で自律的に集合して、L1タンパク質のみからなるVLP、または、L1/L2タンパク質からなるL1/L2-VLPができる<sup>8), 9)</sup>。L1/L2-VLPはELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) 抗原として抗体価測定に用いられる。L1/L2タンパク質発現プラスミドと同時にレポータープラスミドを細胞に導入すると、L1/L2-VLPにレポータープラスミドが組み込まれた感染性偽ウイルス (Pseudovirion: PsV) が形成される (図2A)<sup>10), 11), 12)</sup>。PsVを培養細胞に接種すると、接種量に応じてレポーターが発現する。PsVの構造と本来のHPV粒子の構造の同一性は示されていないが、抗体によるPsVの培養細胞への感染阻害 (レポーターの発現低下) を調べることで抗体の中和活性が測定されている (図2B)<sup>13), 14)</sup>。

HPVゲノムをエピソームとして維持するヒト表皮角化細胞を、3次元培養 (Raft culture) して分化誘導することにより、少量の感染性HPVを得ることができる (図3B)。Raft culture由来のHPVは、HPVゲノムをパッケージしており、また、分化した角化細胞での成熟過程を経ることから、本来のHPVと同等と考えられる<sup>15), 16)</sup>。

L1タンパク質のみからなるVLPは高い抗原性を示し、型特異的に中和抗体を誘導する<sup>17), 18), 19)</sup>。VLPを用いた感染予防ワクチンは、我が国を含む多くの国で認可されており、HPV16とHPV18のVLPを含む2価ワクチン (サーバリックス) とHPV6, HPV11, HPV16, HPV18のVLPを含む4価ワクチン (ガーダシル) がある。どちらのワクチンも効率よく型特異的に中和抗体を誘導し、ワクチンに含まれるHPV型の感染を予防する<sup>18), 19)</sup>。これら現行ワクチンの効果は型特異的であり、高リスク型では、HPV16, HPV18以外の型への効果はないか、極めて低い<sup>18)</sup>。そこで、広範囲のHPV型の感染を予防できる次世代ワクチンの開発が求められている。

HPVまたは動物のパピローマウイルス (papillomavirus, PV) のL2タンパク質は、複数

の型のPsVを*in vitro*において交差中和する抗体を動物に誘導することが報告されている<sup>20), 21), 22), 23), 24), 25), 26)</sup>。近藤ら(2007)は、473アミノ酸(amino acid, aa)からなるHPV16 L2タンパク質のうち、ウイルス粒子表面に露出していると考えられるN末端領域(aa14ーaa144)を、オーバーラップする約20aaの配列にわけて、ペプチドを合成してウサギに免疫し、抗血清を得た。抗血清のHPV PsVに対する中和活性を調べて、aa56からaa75領域の配列を持つ合成ペプチド(P56/75)で免疫されたウサギの抗血清がもっとも幅広い型(HPV16, HPV18, HPV31, HPV58)のPsVを中和することがわかった<sup>27)</sup>。さらに、この抗P56/75血清はraft culture由来のHPV16, HPV18, HPV31を中和することが報告された<sup>15), 16)</sup>。これらの結果は、HPV16 L2タンパク質のaa56からaa75領域が交差性中和エピトープを含んでいることを示している。

本研究の目的は、HPV16 L2タンパク質のaa56から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である。HPV16 L2タンパク質のaa56からaa75領域に結合するモノクローナル抗体(Monoclonal antibody, MAb)を分離し、MAbが認識するアミノ酸配列やMAbによる高リスク型HPVの中和を調べた。

## 2. 方法

### ① 合成ペプチドの作製

免疫、及び、エピトープマッピングのための抗原ペプチドは、SCRUM Inc (Tokyo, Japan) または BEX Co., LTD (Tokyo, Japan) にて Fmoc法を用いて合成した。P56/75, P53/73はそれぞれ HPV16 L2タンパク質の aa56～aa75, aa53～aa73のアミノ配列をもつペプチドを示している。P53/70Aはaa53～aa70のC末端に3つのアラニンを加えた。P53/67Aはaa53～aa67のC末端に6つのアラニンを加えた。P53/64Aはaa53～aa64のC末端に9つのアラニンを加えた。PA58/75はaa58～aa75のN末端に3つのアラニンを加えた。PA61/75はaa61～aa75のN末端に6つのアラニンを加えた。PA64/75はaa64～aa75のN末端に9つのアラニンを加えた。ネガティブコントロールとして用いたP14/27はaa14～aa27の配列を持つ。キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) またはウシ血清アルブミン (BSA) を結合させるために各ペプチドのN末端にシステインを付加した。

### ② マウス免疫とMAbの分離

6週齢のBALB/cマウス(3匹)を、KLHに結合させたP56/75 (50 $\mu$ g/animal) で、完全フロイントアジュバントを用いて、2週間ごと皮下に4回免疫した。4回目の接種の1週間後、25 $\mu$ gのP56/75を腹腔内にブースター接種した。1週間後にマウスから脾臓細胞を採取し、マウス骨髄腫細胞P3U1とポリエチレングリコール法を用いて融合させた。細胞をクローン化後、各クローンの培養上清に分泌されるMAbのP56/75への結合能を、BSAと結合させたP56/75を抗原としてELISAを用いて調べた。ハイブリドーマのクローン化とELISAによるスクリーニングを2回行い、抗P56/75抗体を分泌するハイブリドーマを選出した。さらにその中からHPV16 L1/L2-VLPに結合するMAbをELISAにより選出した。中和実験のコントロールとして使用したMAb25Iは、HPV16L 1-VLPで免疫されたBALB/cマウスから分離した抗HPV16 L1モノクローナル抗体であり、HPV16 PsVを中和する。

実験に使用したMAbは、経腹的にハイブリドーマを接種したマウスの腹水から AbRapid SPiN column (ProteNova, Takamatsu, Japan) を使って精製した。MAbのタンパク質濃度はSDS-PAGEゲルでBSAの標準溶液と比較して判定した。MAbのアイソタ



イプはマウスモノクローナル抗体アイソタイプ テストキット (AbD Secret, Oxford, UK) により調べた。

### ③ ウサギ抗血清の作製

ウサギ抗P56/75血清 (anti-P56/75#1) は既に報告されているものを使用した<sup>27)</sup>。KLHを結合させたP56/75を完全フロイントアジュバントとともに4回ウサギに皮下接種し、採取した血清である。

### ④ VLPとL1/L2-VLPの作製

HPVのL1またはL2遺伝子のopen reading frame (ORF) をCMVプロモーターなどの下流に繋いで、培養細胞にトランスフェクションしてもタンパク質の発現は検出されない。L1及びL2遺伝子のORF内には転写抑制配列があり、十分な発現を得るには、コドンをもと細胞に最適化する必要がある<sup>28)</sup>。コドンをも最適化した各型のL1, L2遺伝子をCMVプロモーター下流に繋いだ発現プラスミドを使用した。HPV16 L1タンパク質 (p16L1h), HPV16 L2タンパク質 (p16L2h), HPV18 L1タンパク質 (peL1fB), HPV18 L2タンパク質 (peL2bhb) の発現プラスミドはJ.T.Schiller博士 (NCI, USA) から提供された。HPV31 L1タンパク質 (p31L1h), HPV31 L2タンパク質 (p31L2h), HPV51 L1タンパク質 (p51L1h), HPV51 L2タンパク質 (p51L2h), HPV52 L1タンパク質 (p52L1h), HPV52 L2タンパク質 (p52L2h), HPV58 L1タンパク質 (p58L1h), HPV58 L2タンパク質 (p58L2h) の発現プラスミドは近藤らにより作製されたものを使用した<sup>27), 29), 30)</sup>。HPV33 L1タンパク質 (p33L1h), HPV33 L2タンパク質 (p33L2h), HPV35 L1タンパク質 (p35L1h), HPV35 L2タンパク質 (p53L2h) の発現プラスミドは本研究にて作製した。

SV40 T抗原を発現しているヒト腎臓細胞である293FT細胞 (Life Technologies Corp.) にL1タンパク質発現プラスミド (24.5 $\mu$ g) とL2タンパク質発現プラスミド (5.5 $\mu$ g) を混合したものをFuGENE HD (Rosch Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使ってトランスフェクションした。48時間後に細胞を0.5mlの融解バッファー (1mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.35% Brij58[Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO], 0.1% Benzonase

[Sigma-Aldrich Inc.], 0.1% Plasmid Safe ATP dependent-DNase [EPICENTRE Corp. Madison, WI]を含むPBS)に懸濁し、37°C、30時間ゆっくりと回転させ、L1/L2-VLPを抽出した。融解液を5分間氷上で冷却し、5M NaClを終濃度0.85Mになるように加え、10分間氷上で冷却した。5000×g、4°C、10分間遠心し、上清をPBSで希釈したオプチプレップ(上から順に27%, 33%, 39%)の上に重層し、SW55Ti ローター(Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA)を用いて、50,000回転、16°C、3.5時間遠心した。カラムの底に穴を開け、500μlずつフラクションを採取した。各フラクションの一部をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動し、L1/L2-VLPが含まれるフラクションを回収した。

## ⑤ 免疫グロブリン可変領域のクローニングとヌクレオチド配列の決定法

分離したMAbの可変領域のアミノ酸配列を調べるため、RNAをRNeasy Mint Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)を用いてハイブリドーマから抽出し、逆転写酵素とランダムプライマーを用いて、cDNAに変換した。免疫グロブリン軽鎖と重鎖の可変領域をコードするcDNA断片をIgG1, IgG2, kappa鎖の不変領域に対するプライマー<sup>31)</sup>を使ってSMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA)を用いて増幅させた。PCR産物をpGEM-T Easy Vector (Promega Corporation, Madison, WI)にクローン化し、ABI 3730 Genetic Analyzer (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA)でシーケンスした。PCRでのエラーを除外するため、8クローンの塩基配列を調べ、コンセンサス配列を採用した。アミノ酸配列はヌクレオチド配列から推測した。

## ⑥ ELISA

MAbのVLP、または、ペプチドへの結合をELISAによって調べた。PBSに懸濁したL1/L2-VLP(200μg)またはBSAを結合させた合成ペプチド(500ng)をELISAプレート(Thermo Lasystems, Franklin, MA)のwellに加え、4°Cで一晩固相化した。0.1% Tween-20を含有するPBS (PBS-T)で洗浄後、5% スキムミルクを含むPBS-Tをブロッキングバッファーとしてwellに加え室温で2時間ブロッキングした。ペルオキシダーゼで標識した抗マウスIgGヤギ血清(SC-2031, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa

Cruz, CA)をブロッキングバッファーで1/2000に希釈しwellに加え、室温で1時間静置した。PBS-Tで洗浄後、0.1Mクエン酸塩バッファー(pH4.7)中に0.01%過酸化水素とo-フェニレンジアミン(2mg/ml)を含有している基質溶液を加え、450nmの吸光度を測定した。

## ⑦ PsVの作製

高リスク型HPVのL1/L2を発現するプラスミドと分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)を発現するレポータープラスミドの2つのプラスミドを細胞に同時にトランスフェクションし、SEAP発現プラスミドをパッケージしたPsVを作成した(図2A)。

コドン最適化したHPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV51, HPV52, HPV58型のL1とL2遺伝子を、pIRESベクター(Clontech Laboratories, Inc.)のマルチクローニングサイトAとBにそれぞれ挿入し、pIRESL1/L2-16, -18, -31, -33, -35, -51, -52, -58プラスミドを作製した。これらの発現プラスミドは全長が約9Kbあるため、L1/L2-VLPにパッケージされにくい。その結果、全長約5.2Kbのレポータープラスミドが優先的にL1/L2-VLPにパッケージされ、ウイルス粒子あたりのレポーター発現が高いPsVが得られる。SEAPを発現するプラスミド(pYSEAP)はJ.T.Schiller博士(NCI, USA)から提供された。

293FT細胞にpIRESL1/L2プラスミド(16.5 $\mu$ g)とpYSEAP(13.5 $\mu$ g)をトランスフェクションし、2日後、セルスクレーパーで細胞を剥がし、15mlチューブへ回収した。3000rpm、5分間遠心した後、上清を除去し、細胞塊容積の1.5倍量の0.35% Brij58を含むDPBS(Invitrogen)を加え、懸濁した。37 $^{\circ}$ C、一晚インキュベートした後、氷上に5分間置いた。10,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10分遠心し、上清を新しいシリコン処理チューブへ移した。残ったペレットを500 $\mu$ lのPBSに懸濁後、10,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10分遠心し、上清を最初の上清に加えた。VLPの場合と同様に、オプチプレップ密度勾配遠心を用いてPsVを精製、回収した。

## ⑧ MAbによるPsVの中和

PsVの293FT細胞への感染阻害を調べることにより、抗体の中和活性を測定した(図

2B)。レポータープラスミドであるpYSEAPは、SV40の複製開始点をもつため、T抗原を発現する293FT細胞内で複製し、高いSEAP発現が得られる。

MABを段階希釈した溶液とPsV懸濁液の混合物を1時間、4°Cでインキュベートし、予め96wellプレートに撒いた293FT細胞 ( $1 \times 10^4$ 個/well)に加えた。3日後、培養液と基質を反応させ、SEAP活性を405nmでの吸光度により測定した。非感染細胞の培養上清から得られる吸光度をそれぞれの測定値から引いて、SEAP活性を算出した。PsVのみを接種した細胞の培養液から得られる吸光度に対する割合を計算し、プロットした。プロットされたグラフから、抗体の50%阻害濃度 (IC50) を算出した。

### ⑨ Raft culture由来HPVの作製

HPV16、または、HPV31のゲノムをエピソームとして維持するヒト表皮角化細胞を3次元培養 (raft culture) し、感染性HPV16、または、HPV31を得た。HPV16ゲノムを維持する角化細胞 (HFk-16) は図3Aのように作成した。pHPV16-loxは、直鎖状にしたHPV16ゲノムの両端にloxP配列を付加したものをベクターにクローニングしたプラスミドで、G418耐性遺伝子を持つ<sup>32)</sup>。M.A. Ozbun博士 (University of New Mexico, USA) より提供された。pBS185はCre組み換え酵素発現ベクターである。これらのプラスミドを細胞にコトランスフェクションすると、細胞内でCre組み換え酵素によりベクター配列が除かれ環状化したHPVゲノムができる。loxP配列は、L1遺伝子の3'非翻訳領域に挿入されているため、HPVの遺伝子発現や感染性に影響を与えない。細胞の分裂に伴い、HPVゲノムも複製され、娘細胞に分配される。 $1 \times 10^6$ 個の初代角化細胞に8 µgのpHPV16-loxと2 µgのpBS185をNucleofector kit (Lonza, Basel, Switzerland) を用いてトランスフェクションした。500 µg/mlのG418を含むF培地 (F12培地とDMEMを3:1の割合で混ぜたものに10% FBS、0.4 µg/ml hydrocortisone、5 µg/mlコレラ毒素、24 µg/ml アデニン、10 ng/ml epidermal growth factorを含む) で3日間培養し、トランスフェクションされた細胞を選択した。その後、マイトマイシンCで処理したフィーダー細胞 (3T3m) を加え、G418を含まないF培地で培養した。増殖した細胞の一部からDNAを抽出し、環状HPV16ゲノムが維持されていることをサザンブロットで確認した。HPV31ゲノムを持つ角化細胞として、子宮頸部生検から樹立された細胞株CIN612を用いた。

ヒト初代線維芽細胞とコラーゲンを含む固形培地上で、F培地を使用して、HFK-16、または、CIN612細胞を培養した(図3B)。コンフルエントになった後、細胞が空気に触れるようトランスウェルプレートに移し、1.88 mMのCaCl<sub>2</sub>を含むF培地で20日間培養し、分化誘導した。分化し層状になった細胞を培地(DMEM)中に回収し、ミキサーミル(QIAGEN GmbH)を用いてホモジナイズした後、RNase処理した。15000 rpm、10分遠心後、上清を回収し、ウイルスストックとした。

#### ⑩ MAbによるRaft culture由来HPVの中和

MAbの濃度が50 µg/mlになるようにウイルス溶液と混ぜ、1時間、4°Cでインキュベートし、予め96wellプレートに撒いたHaCaT細胞(1 X 10<sup>4</sup>個/well)に感染させた。中和活性のない抗体として、抗FLAG-MAb(M2)を対照に用いた。3日後、細胞からRNAをRNeasy Mint Kit(QIAGEN GmbH)を用いて抽出し、逆転写酵素とランダムプライマーを用いて、cDNAに変換した。HPVのE1<sup>+</sup>E4遺伝子のcDNAをPCRにより検出し、感染を調べた。HPV16、及び、HPV31のE1<sup>+</sup>E4遺伝子発現検出には以下のプライマーを用いた; HPV16-F: 5'-GCTGATCCTGCAAGCAACGAAGTATC, HPV16-R: 5'-TTCTTCGGTGCCCAAGGC, HPV31-F: 5'-TGGCTGATCCAGCAAGTGAC, HPV31-R: 5'-AGGCGCAGGTTTTGGAATTC。 内在性のβ-アクチン遺伝子のcDNAの検出には以下のプライマーを用いた; Actin-F: 5'-GATGACCCAGATCATGTTTG, Actin-R: 5'-AACACCCCAGCCATGTACGTTG。 PCR産物を2%アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により検出した。

### 3. 結果

#### ① MAbの分離

P56/75で免疫したBALB/cマウスから脾臓細胞を採取し、ハイブリドーマを作成した。細胞をクローン化後、培養上清に含まれる抗体のP56/75への結合能をELISAで調べ、抗P56/75抗体を分泌する24のハイブリドーマクローンを得た。そのうちMAb13B、及び、MAb24Bと名づけた2つのMAbがELISAにてHPV16 L1/L2-VLPに結合した(図4)。ペプチド抗原(P56/75)には結合するが、HPV16 L1/L2-VLPには結合しなかったものの代表としてMAb21Aの結果を図4に示している。HPV16 L1/L2-VLPに結合するMAb13B、及び、MAb24Bについて以後解析した。

#### ② MAbのアイソタイプと可変領域のアミノ酸配列

マウス腹水から精製したMAbを用いて、アイソタイプを調べた。MAb13BはIgG1、MAb24BはIgG2bであった。

ハイブリドーマからRNAを抽出し、cDNAに変換後、イムノグロブリン定常領域に対するプライマーを用いた5'-RACEにより、可変領域の塩基配列を調べた。図5に塩基配列から推測されるMAb13BとMAb24Bの重鎖と軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を示した。MAb13B、及び、MAb24Bのアイソタイプ、及び、可変領域のアミノ酸配列は互いに異なることから、それぞれ異なるクローンであることがわかった。

#### ③ MAb13BとMAb24Bの認識するエピトープ

MAb13BとMAb24Bが認識するエピトープを、HPV16 L2のaa53～aa75領域に欠失やアラニン変異をもつ持つ合成ペプチドを抗原として、ELISAにより調べた(図6)。

MAb13BはP56/75, P53/73, PA58/75, PA61/75, PA64/75と結合し、P53/75AとP53/65Aとは結合しなかった。MAb13BのエピトープはHPV16 L2のaa64～aa73領域に

存在することが示された。

MAb24BはP56/75, P53/73, P53/70A, P53/67A, P53/64A, PA58/75と結合し、PA61/75とPA64/75には結合しなかった。MAb24BのエピトープはHPV16 L2のaa58～aa64領域に存在することが示された。

#### ④ MAb13B, MAb24Bの高リスク型L1/L2-VLPへの結合能

ELISAにより、MAbの高リスク型HPVのL1/L2-VLPへの結合を調べた(図7)。MAb13BはHPV16, HPV31, HPV33, HPV18, HPV51, HPV58 L1/L2-VLPに結合し、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のHPV31, HPV33, HPV58 L1/L2-VLPへの結合は、MAb24Bに比べ弱かった。MAb13BとMAb24BはいずれもL1タンパク質のみからなるVLPには結合しなかったため、これらのMAbはL1/L2VLPの表面上に位置するL2タンパク質領域に結合すると考えられた。

#### ⑤ MAb13B, MAb24Bによる高リスク型PsVの中和

MAb13B, MAb24Bの高リスク型PsVに対する中和活性を調べた(図8、表1)。HPV16PsVを効果的に中和する抗HPV16 L1モノクローナル抗体であるMAb25Iをポジティブコントロールとして用いた。MAb(240μg/mlから0.47μg/mlまで段階的に希釈)とPsV溶液を等量ずつ混合しインキュベートした後、293FT細胞に接種し、3日後に培養上清のSEAP活性を測定した。

MAb13BはHPV16, HPV18, HPV51 PsVを、MAb24Bは調べた全ての高リスク型HPVのPsVを中和した。抗体濃度ごとの感染価(SEAP活性)をグラフに表した(図8)。グラフから、MAbのPsVに対する中和のIC50を計算し、表1に示した。MAb13Bと

MAb24Bを等量ずつ混合した場合、各々のMAb単独よりも効率的にHPV16, HPV18, HPV51 PsVを中和した。HPV16, HPV18, HPV51 PsVの中和において、MAb13BとMAb24Bを混合したときのIC50は各MAb単独のときよりも2から5倍低く、2つのMAbを混ぜることにより相乗作用が認められた。

## ⑥ MAb13B, MAb24Bによるraft culture由来HPVの中和

MAb13B, MAb24Bによるraft culture由来HPV16, HPV31の中和を調べた(図9)。MAb濃度が50 µg/mlになるようにraft culture由来HPVと混ぜてインキュベートした後、表皮角化細胞株であるHaCaT細胞に感染させた。中和活性のないネガティブコントロールとして、抗FLAG-MAb(M2)を用いた。HPVのE1^E4遺伝子の発現をRT-PCRによって検出し、感染をモニターした。

HPV16, HPV31それぞれ2回の実験結果を図に示した。いずれの実験でも、MAb13B, MAb24B、または、MAb13BとMAb24Bを等量ずつ混合したものと反応させた場合、E1^E4遺伝子発現の減少が認められた(図9)。MAb13B、及び、MAb24Bは、raft culture由来のHPV16, HPV31も中和することがわかった。

## ⑦ ウサギでのMAb13BとMAb24Bエпитープの認識

P56/75で免疫したウサギの抗血清(anti-P56/75#1)は、HPV16, HPV18, HPV31, HPV58 PsVを中和する<sup>27)</sup>。また、このウサギ抗血清は、raft culture由来のHPV16, HPV18, HPV31も中和することがわかっている<sup>16)</sup>。そこで、MAb13B, MAb24Bが認識するエпитープが、ウサギでもエпитープとして認識されるか調べる目的で、anti-P56/75#1に、これらエпитープを認識する抗体が含まれるかどうかを競合ELISAによって調べた(図10)。



ELISAプレートに固相化したHPV16 L1/L2-VLPと、段階希釈したanti-P56/75#1を反応させ、その後、MAb13BまたはMAb24Bを反応させた。Anti-P56/75#1は、MAb13BまたはMAb24BのHPV16 L1/L2-VLPへの結合を濃度依存的に阻害した(図10)。この結果から、anti-P56/75#1はMAb13B, MAb24Bのエピトープと重複する領域を認識する抗体を含んでおり、これら交差性中和エピトープはウサギにおいても同様に認識されると考えられる。

## 4. 考察

本研究により、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分かった。MAb13Bが認識するエピトープはaa64～aa73領域内に存在し、MAb24Bが認識するエピトープはaa58～aa64領域内に存在する(図6、図11)。

MAb13BはHPV16, HPV18, HPV51型のL1/L2-VLPに結合し、これらの型のPsVを中和した。HPV18 L2タンパク質のMAb13Bエピトープのアミノ酸配列は、HPV16と同じである(図11)。HPV51 L2タンパク質は、SGSGGRTGYIのアミノ酸配列を持つことから(図11)、T (HPV16L2タンパク質のaa66)のSへの置換はMAb13Bの結合に影響を及ぼさないことが分かった。

MAb13BのHPV31, HPV33, HPV58のL1/L2-VLPへの結合効率はMAb24Bに比べ低く、MAb13Bはこれらの型のPsVを中和しなかった(図7、図8)。これらの型のL2タンパク質はSG (TまたはS)GGRTGYVのアミノ酸配列を持つことから(図11)、I (HPV16 L2タンパク質のaa73)のVへの置換はMAb13Bとの結合親和性を弱めることを示している。

MAb13BはHPV35, HPV52のL1/L2-VLPとは結合しなかった(図7)。これらの型のL2タンパク質はSG(TまたはS)GGR(SまたはA)GYVのアミノ酸配列を持つことから(図11)、T (HPV16L2タンパク質のaa70)のSまたはAへの置換によりMAb13Bの結合能が失われることを示している。従って、TとI (HPV16 L2タンパク質のaa70とaa73)はMAb13BがL2タンパク質に結合しPsVを中和するために必要である。

MAb24Bは調べた全ての高リスク型HPVのL1/L2-VLPに結合し、PsVを中和した(図7、図8)。HPV18, HPV33, HPV51, HPV58のL2タンパク質はMAb24Bのエピトープと同じアミノ酸配列を持つ(図11)。HPV31とHPV33のL2タンパク質はLGIGSGSのアミノ酸配列を、HPV52 L2タンパク質はLGIGTGAのアミノ酸配列を持つことから(図11)、

T (HPV16 L2タンパク質のaa62)のSへの置換とS (HPV16 L2タンパク質のaa64)のAへの置換はMAb24Bの結合に影響は及ぼさないことがわかった。

MAb13B、及び、MAb24Bが認識するエピトープのアミノ酸配列は、高リスク型だけでなく、尖圭コンジローマ等の原因となる低リスク型(HPV6, HPV11)や、皮膚病変に検出される皮膚型(HPV2, HPV27)でもよく保存されている(図11)。MAb13B、または、MAb24Bが結合できるアミノ酸配列から類推すると、これらのMAbは、高リスク型に加え、低リスク型や皮膚型も中和できる可能性がある。今後、MAb13B, MAb24Bによる低リスク型や皮膚型HPVの中和を調べる必要がある。

MAb13BとMAb24Bを半量ずつ混合した場合、各MAb単独(MAbの総量は同じ)に比べHPV16, HPV18, HPV51はより効果的に中和されたことから、2つのMAbによる相乗作用があることがわかった(表1)。エピトープの中心領域は重複していないため(図11)、MAb13BとMAb24Bは1分子のL2タンパク質に同時に結合することができると思われる。おそらく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る。HPV16 L2タンパク質のaa56～aa75領域をワクチン抗原とする場合、2つのエピトープに対する抗体を同時に誘導できることが重要である。

最近、HPV16 L2タンパク質のaa45～aa67領域にある3つのGXXXGモチーフが、HPV感染の際にtransmembraneドメインとして働き、L2タンパク質のエンドソーム膜貫通に重要であることが報告された<sup>33)</sup>。また、P56/75に対するポリクローナル抗体は、L1/L2-VLPにパッケージされたDNAの核への移行を阻害することがわかっている<sup>34)</sup>。これらのことから、MAb13B、及び、MAb24Bが認識するエピトープを含むL2領域は、HPV感染過程において、エンドソーム内のウイルスDNAが核へ移行するのに重要な役割を果たしており、抗体が結合することにより、ウイルスDNAの核への移行が阻害されると考えられる。

HPVはヒトにしか感染しないため、動物実験はできない。代替法として、ウシやワタ

オウサギに感染し、乳頭腫を作るPVを用いた動物実験が行われる。ウシやワタオウサギをL2タンパク質由来ペプチドで免疫すると、実験的なPV接種による乳頭腫の形成を完全に防ぐことができる<sup>22), 27), 35), 36), 37)</sup>。これらL2タンパク質ペプチドで免疫した動物の血清の中和活性を、培養細胞を用いて*in vitro*で測定した場合、中和活性は非常に低いか、ほとんど検出できない<sup>38)</sup>。従って、抗L2抗体による中和を*in vitro*で調べる良い実験系は無く、現在使用されている方法でわずかでも中和活性が認められれば、*in vivo*での感染予防効果があると考えられている。我々の*in vitro*中和実験でも、抗L2抗体(MAb13B, MAb24B)によるPsVの中和は、抗L1抗体(MAb25I)による中和に比べ、100～1000倍量の抗体が必要であったが(表1)、上記のような理由により、MAb13B、及び、MAb24Bは、*in vivo*でHPV感染を防ぐ事ができると期待される。

PsVとraft culture由来HPVで、抗L2抗体による中和への感受性が異なることが報告されている<sup>16)</sup>。詳細は不明であるが、PsVと本来のHPVで、ウイルス粒子上でのL2タンパク質の存在様式が異なる可能性がある。MAb13B、及び、MAb24Bはraft culture由来のHPV16, HPV31を中和した(図9)。ウサギ抗P56/75抗血清もraft culture由来のHPV16, HPV18, HPV31を中和することが報告されている<sup>15), 16)</sup>。従って、HPV16 L2タンパク質のaa56～aa75領域を認識する抗体は、PsVだけでなく本来のHPVも中和すると推測される。

ウサギ抗P56/75抗血清<sup>22)</sup>はMAb13BとMAb24BのHPV16 L1/L2-VLPへの結合を阻害したことから(図10)、このウサギ抗血清はこれらMAbのエピトープと重複する領域を認識する抗体を含むと考えられる。このことは、MAb13BとMAb24Bが認識する交差性中和エピトープは、マウスだけでなくウサギでも抗原性があり、エピトープとして認識されること示している。HPV16 L2タンパク質のaa56～aa75領域が、ヒトにおいてもエピトープとして認識され、MAb13BとMAb24Bと類似の抗体を誘導することが期待される。

抗P56/75MAb分離の過程で得られたMAb21Aなどは、ELISAでP56/75には結合す

るもののHPV16 L1/L2-VLPには結合しなかった(図4)。従って、KLHやBSAに結合したP56/75は、いくつかの異なる立体構造をとり、そのうち一部がウイルス粒子上でのL2タンパク質のaa56～aa75領域と同じ構造をとると思われる。この領域をワクチン抗原として利用する場合、立体構造として正しく提示する必要がある。

複数のHPV型に対する中和活性をもつ抗L2 MAbがいくつか報告されている。

HPV16 L2タンパク質のaa17～aa36領域を認識するMAb RG-1はHPV16とHPV18を中和する<sup>23)</sup>。HPV16 L2タンパク質のaa20～aa38領域を認識するMAbはHPV16, HPV18, HPV31, HPV45, HPV58, HPV57, HPV27のPsVを中和する<sup>39)</sup>。我々の結果と、これまでの結果を合わせると、HPV16 L2タンパク質のN末端領域aa17～aa75はHPV感染に必要不可欠であり、抗体が結合することによりその機能が妨げられると考えられる。高リスク型HPVの間でL2タンパク質のN末端領域のアミノ酸配列は比較的良好に保存されており、複数の交差性中和エпитープがある。このような交差性中和エпитープを含む抗原は、すべての高リスク型HPVに有効な次世代ワクチンになると期待される。

## 5. 結論

本研究により、少なくとも2つの交差性中和エピートプがHPV16 L2タンパク質のaa56～aa75領域に存在することが分かった。また、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、このような交差性中和エピートプを含んでいる抗原は、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る。

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、直接ご指導、ご鞭撻、ご助言を戴きました国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター元センター長 神田忠仁博士(現理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター チームリーダー)、森清一郎博士(国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター)に深謝いたします。

また、本論文を作成するにあたり、指導教官の吉川裕之教授(筑波大学医学医療系産科婦人科)、松本光司准教授(筑波大学医学医療系産科婦人科)から、丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。

## 7. 参考文献

1. Schiffman, M., Castle, P.E., Jeronimo, J., Rodriguez, A.C., Wacholder, S., 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370, 890-907.
2. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* 55, 74-108.
3. Howley, P.M., Lowy, D.R., 2001. Papillomaviruses and their replication, in: Lripe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology Vol. 2*, 4th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 2197–2229.
4. Buck, C.B., Cheng, N., Thompson, C.D., Lowy, D.R., Steven, A.C., Schiller, J.T., Trus, B.L., 2008. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. *J. Virol.* 82, 5190-5197.
5. Roden, R.B., Greenstone, H.L., Kirnbauer, R., Booy, F.P., Jessie, J., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1996. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.* 70, 5875-5883.
6. Volpers, C., Schirmacher, P., Streeck, R.E., Sapp, M., 1994. Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology* 200, 504-512.
7. Munoz, N., Bosch, F.X., Castellsague, X., Diaz, M., Sanjose, S., Hammouda, D., Shah, K.V., Meijer, C.J.L.M., 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int. J. Cancer* 111, 278–285.
8. Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 12180–12184.
9. Zhou, J., Sun, X.Y., Stenzel, D.J., Frazer, I.H., 1991. Expression of vaccinia recombinant HPV16L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like Particles. *Virology* 185, 251–257.
10. Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J. Virol.* 78, 751–757.
11. Stauffer, Y., Raj, K., Masternak, K., Beard, P., 1998. Infectious human papillomavirus type18 pseudovirions. *J. Mol. Biol.* 283, 529–536.



12. Unckell, F., Streeck, R.E., Sapp, M., 1997. Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J Virol.* 71, 2934-2939.
13. Bontkes, H.J., de Gruijl, T.D., Walboomers, J.M., Schiller, J.T., Dillner, J., Helmerhorst, T.J., Verheijen, R.H., Scheper, R.J., Meijer, C.J., 1999. Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. *J Gen. Virol.* 80, 409-417.
14. Buck, C.B., Pastrana, D.V., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2005. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. *Methods Mol. Med.* 119, 445-462.
15. Conway, M.J., Alam, S., Christensen, N.D., Meyers, C., 2009. Overlapping and independent structural roles for human papillomavirus type 16 L2 conserved cysteines. *Virology.* 393, 295-303.
16. Conway, M.J., Cruz, L., Alam, S., Christensen, N.D., Meyers, C., 2011. Cross-neutralization potential of native human papillomavirus N-terminal L2 epitopes. *PLoS One.* 6, e16405.
17. Giroglou, T., Sapp, M., Lane, C., Fligge, C., Christensen, N.D., Streeck, R.E., Rose, R.C., 2001. Immunological analyses of human papilloma virus capsids. *Vaccine* 19, 1783–1793.
18. Harper, D.M., Franco, D.M., Wheeler, C.M., Moscicki, A.B., Romanowski, B., Roteli-Martins, C.M., Jenkins, D., Schuind, A., Costa Clemens, S.A., Dubin, G., 2006. HPV vaccine study group. 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 367, 1247–1255.
19. Villa, L.L., Costa, R.L., Petta, C.A., Andrade, R.P., Ault, K.A., Giuliano, A.R., Wheeler, C.M., Koutsky, L.A., Malm, C., Lehtinen, M., Skjeldestad, F.F., Olsson, S.E., Steinwall, M., Brown, D.R., Kurman, R.J., Ronnett, B.M., Stoler, M.H., Ferenczy, A., Harper, D.M., Tamms, G.M., Yu, J., Lupinacci, L., Railkar, R., Taddeo, F.J., Jansen, K.U., Esser, M.T., Sings, H.L., Saah, A.J., Barr, E., 2005. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind

- placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6, 256–257.
20. Alphas, H.H., Gambhira, R., Karanam, B., Roberts, J.N., Jagu, S., Schiller, J.T., Zeng, W., Jackson, D.C., Roden, R.B., 2008. Protection against heterologous human papillomavirus challenge by a synthetic lipopeptide vaccine containing a broadly cross-neutralizing epitope of L2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5850-5855.
  21. Embers, M.E., Budgeon, L.R., Culp, T.D., Reed, C.A., Pickel, M.D., Christensen, N.D., 2004. Differential antibody responses to a distinct region of human papillomavirus minor capsid proteins. *Vaccine* 22, 670-680.
  22. Gambhira, R., Jagu, S., Karanam, B., Gravitt, P.E., Culp, T.D., Christensen, N.D., Roden, R.B., 2007a. Protection of rabbits against challenge with rabbit papillomaviruses by immunization with the N terminus of human papillomavirus type 16 minor capsid antigen L2. *J. Virol.* 81, 11585-11592.
  23. Gambhira, R., Karanam, B., Jagu, S., Roberts, J.N., Buck, C.B., Bossis, I., Alphas, H., Culp, T., Christensen, N.D., Roden, R.B., 2007b. A protective and broadly cross-neutralizing epitope of human papillomavirus L2. *J. Virol.* 81, 13927-13931.
  24. Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kanda, T., 1999. Common neutralizing epitope in minor capsid protein L2 of human papillomavirus Types 16 and 6. *J. Virol.* 73, 6188–6190.
  25. Pastrana, D.V., Gambhira, R., Buck, C.B., Pang, Y.Y.S., Thompson, C.D., Culp, T.D., Christensen, N.D., Lowy, D.R., Schiller, J.T., Roden, R.B.S., 2005. Cross-neutralization of cutaneous and mucosal papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology* 337, 365–372.
  26. Roden, R.B., Yutzy, W.H., Fallon, R., Inglis, S., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 2000. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* 270, 254–257.
  27. Lin, Y.L., Borenstein, L.A., Selvakumar, R., Ahmed, R., Wettstein, F.O., 1992. Effective vaccination against papilloma development by immunization with L1 or L2 structural protein of cottontail rabbit papillomavirus. *Virology* 187, 612–619.
  28. Mori, S., Ozaki, S., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Kanda, T., 2006.

- Inhibitory cis-element-mediated decay of human papillomavirus type 16 L1-transcript in undifferentiated cells. *Mol. Cell. Biochem.* 288, 47-57.
29. Kondo, K., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., Kanda, T., 2008. Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. *J. Med. Virol.* 80, 841-846.
30. Kondo, K., Ishii, Y., Mori, S., Shimabukuro, S., Yoshikawa, H., Kanda, T., 2009. Nuclear location of minor capsid protein L2 is required for expression of a reporter plasmid packaged in HPV51 pseudovirions. *Virology.* 394, 259-265.
31. Wang, Z., Raifu, M., Howard, M., Smith, L., Hansen, D., Goldsby, R., Ratner, D., 2000. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J. Immunol. Methods.* 233, 167-177.
32. Lee, J.H., Yi, S.M., Anderson, M.E., Berger, K.L., Welsh, M.J., Klingelutz, A.J., Ozbun, M.A., 2004. Propagation of infectious human papillomavirus type 16 by using an adenovirus and Cre/LoxP mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2094-2099.
33. Bronnimann, M.P., Chapman, J.A., Park, C.K., Campos, S.K., 2013. A transmembrane domain and GxxxG motifs within L2 are essential for papillomavirus infection. *J. Virol.* 87, 464-473.
34. Ishii, Y., Tanaka, K., Kondo, K., Takeuchi, T., Mori, S., Kanda, T., 2010. Inhibition of nuclear entry of HPV 16 pseudovirus-packaged DNA by an anti-HPV16 L2 neutralizing antibody. *Virology* 406, 181-188.
35. Campo, M.S., O'Neil, B.W., Grindlay, G.J., Curtis, F., Knowles, G., Chandrachud, L., 1997. A peptide encoding a B-cell epitope from the N-terminus of the capsid protein L2 of bovine papillomavirus-4 prevents disease. *Virology* 234, 261-266.
36. Christensen, N.D., Kreider, J.W., Kan, N.C., DiAngelo, S.L., 1991. The open reading frame L2 of cottontail rabbit papillomavirus contains antibody-inducing neutralizing epitopes. *Virology* 181, 572-579.
37. Embers, M.E., Budgeon, L.R., Pickel, M., Christensen, N.D., 2002. Protective immunity to rabbit oral and cutaneous papillomaviruses by immunization with

- short peptides of L2, the minor capsid protein. *J. Virol.* 76, 9798–9805.
38. Jagu, S., Malandro, N., Kwak, K., Yuan, H., Schlegel, R., Palmer, K.E., Huh, W.K., Campo, M.S., Roden, R.B., 2011. A multimeric L2 vaccine for prevention of animal papillomavirus infections. *Virology* 420, 43-50.
  39. Rubio, I., Seitz, H., Canali, E., Sehr, P., Bolchi, A., Tommasino, M., Ottonello, S., Müller, M., 2011. The N-terminal region of the human papillomavirus L2 protein contains overlapping binding sites for neutralizing, cross-neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Virology*. 409, 348-359.

表1. PsVを50%抑制するMAb濃度

表1. 50% inhibitory concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) of MAb against PsV infection.

MAb	Genotype of pseudovirion							
	16	18	31	33	35	51	52	58
13B	1.9	3.8	120<	120<	120<	40.5	120<	120<
24B	3.0	11.7	21.4	16.0	47.3	30.8	118.1	25.0
13B/24B <sup>a</sup>	0.8 <sup>b</sup>	1.8	24.4	14.4	120<	11.5	120<	26.1
25I <sup>c</sup>	0.006	10<	ND <sup>d</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

a: Mixture of equal amount of MAb13B and MAb24B.

b: Concentration of total MAb (combined MAb13B and MAb24B).

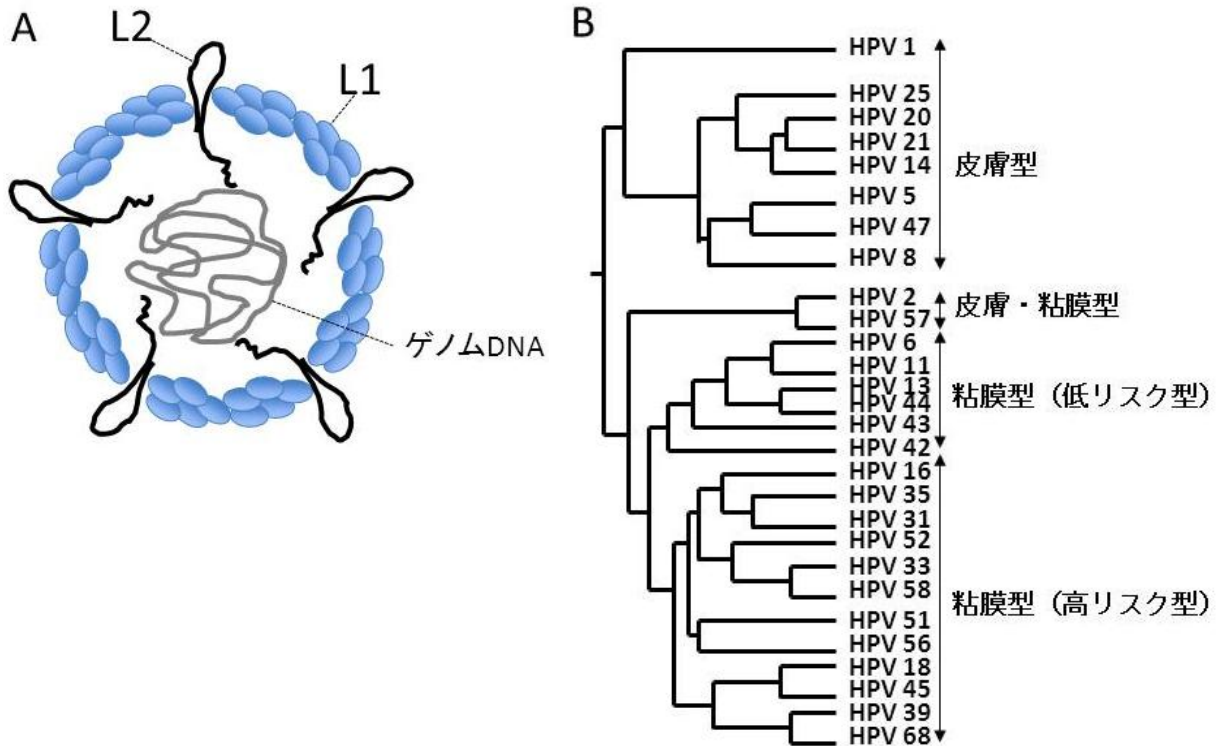
c: MAb25I is an anti-HPV16L1 monoclonal antibody.

d: Not done.

Nakao et al, Virology 2012より引用

図8のグラフから、MAbのPsVに対する中和のIC50を計算した。HPV16, HPV18, HPV51PsVの中和において、MAb13BとMAb24Bを混合したときのIC50は各MAb単独のときよりも2から5倍低く、相乗効果を認めた。

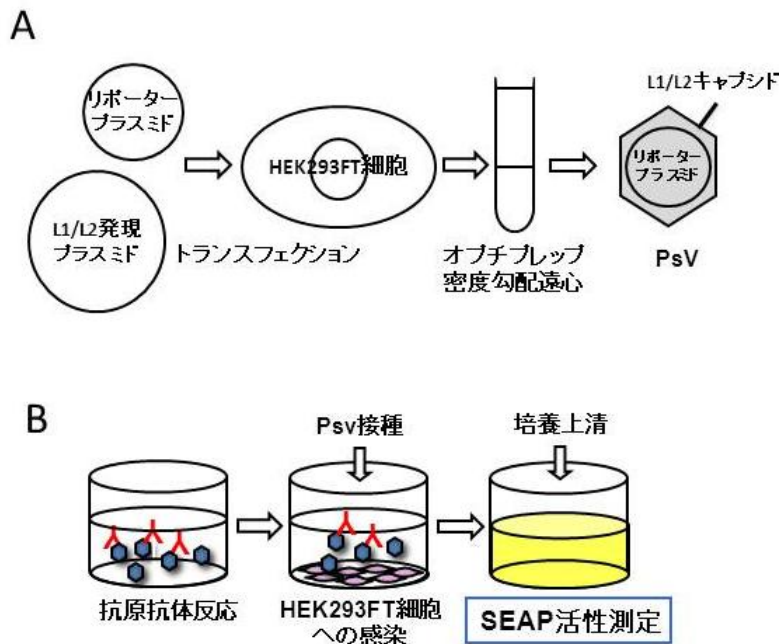
図1. HPVの構造と分類



A) 約8Kbの環状二本鎖DNAゲノムが正二十面体で直径約55nmのキャプシドに包まれている。キャプシドは、360分子のL1タンパク質と12分子またはそれ以上のL2タンパク質からなる。L2タンパク質のN末端領域の一部はウイルス粒子表面に露出していると考えられている。

B) HPVは皮膚病変に検出される皮膚型と、粘膜病変に検出される粘膜型に分けられる。粘膜型は、さらに、尖圭コンジローマ等の良性病変から分離される「低リスク型」と子宮頸がん、肛門周囲がん等から分離される「高リスク型」に分けられる(図1B)。少なくとも15の遺伝子型(HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66, HPV68, HPV73)が高リスク型とされる(Munoz et al., 2004)。

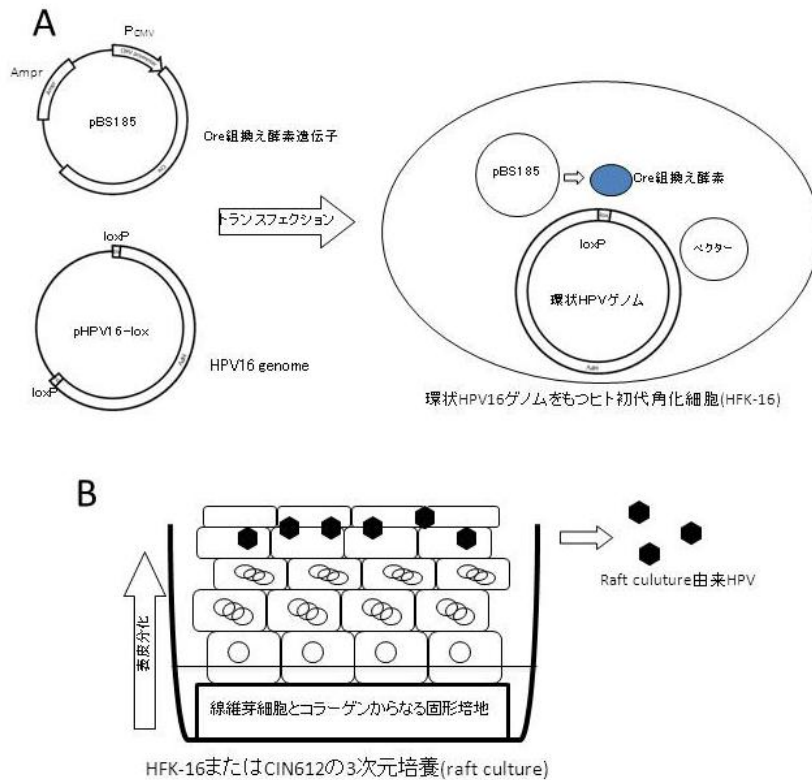
図2. PsVの作製と中和実験



A) PsVの作製方法。L1/L2タンパク質の発現プラスミドとリポータープラスミドを293FT細胞にトランスフェクションする。2日後に細胞を溶解し、37°Cで一晩、インキュベートした後、オプチプレップ密度勾配遠心で沈降し、PsVが含まれる分画を回収する。L1/L2キャプシドにリポータープラスミドがパッケージされたPsVが得られる。

B) PsVを使用した中和実験。抗体とPsVを混合し、4°Cで1時間インキュベート後、293FT細胞へ感染させる。3日後に培養上清を回収し、基質溶液と反応させ、リポーター(SEAP)の発現を測定する。

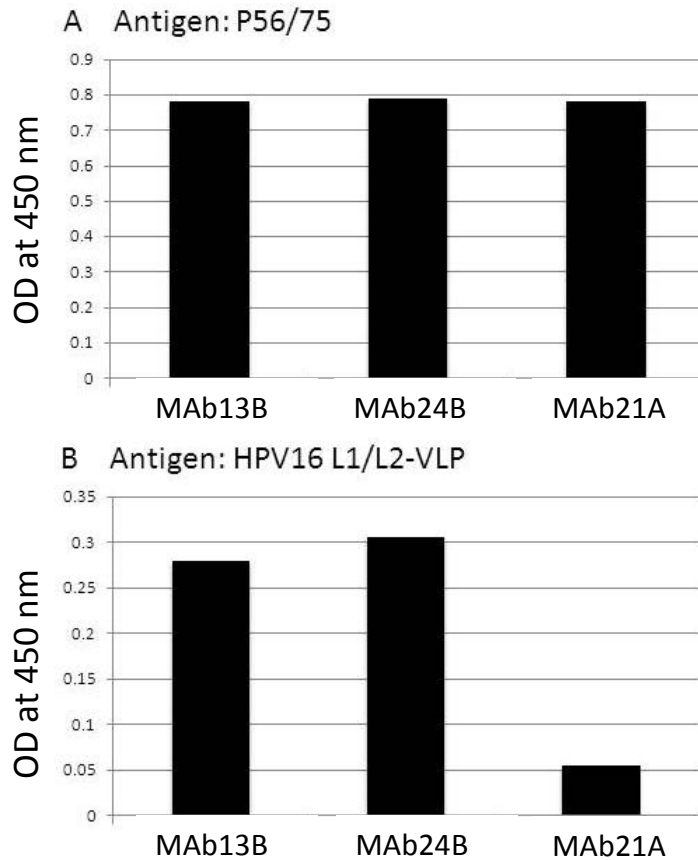
### 図3. Raft culture由来HPVの作製



- A) HPVゲノムを維持する角化細胞の作製。初代角化細胞にpHPV16-loxとpBS185をエレクトロポレーションを用いてトランスフェクションする。細胞内でCre組み換え酵素が発現すると、pHPV16-lox上で組換が起こり、ベクター配列が除かれた環状HPVゲノムができる。loxP配列は、L1遺伝子の3'非翻訳領域に挿入されているため、HPVの遺伝子発現や感染性に影響を与えない。細胞の分裂に伴い、HPVゲノムも複製、分配され、安定に維持される。
- B) HPVゲノムを維持する角化細胞をヒト初代線維芽細胞とコラーゲンを含む固形培地上で培養する。コンフルエントになった後、細胞が空気に触れるようトランスウェルプレートに移し、高濃度の塩化カルシウムを含むF培地で約20日間培養すると、細胞が層状になり分化する。細胞分化に伴いHPVゲノムの複製と粒子形成が起こる。



図4. ELISAによる抗P56/75 モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの選択



クローン化したハイブリドーマの培養上清を100倍希釈し、ELISAプレートに固定化したA)ペプチド(P56/75)、または、B) HPV16 L1/L2-VLPと反応させた。結合したMAbを、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体(SC-2031, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA)で検出した。

図5. MAbのアイソタイプと可変領域のアミノ酸配列

Heavy-chain variable region

			CDR1		CDR2
MAb13B	V <sub>H</sub>	DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLCTVTGYSIT	SDSAWNWIRQFPGNKLEWMG	YIT-FSGSTN	
MAb24B	V <sub>H</sub>	EVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASVYSF	SN-WMHWVKQRPGQGLEWIG	AIYPGTGATR	
			CDR3		
MAb13B	V <sub>H</sub>	YNPSLKS	RLSITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCTG	PFLDYWGQGTTLTVSS	
MAb24B	V <sub>H</sub>	YNQKFKD	KAKLTAVTSADTAYMELSSLTDEDSAVYYCTG	-YSLYWGQGTILTVSS	

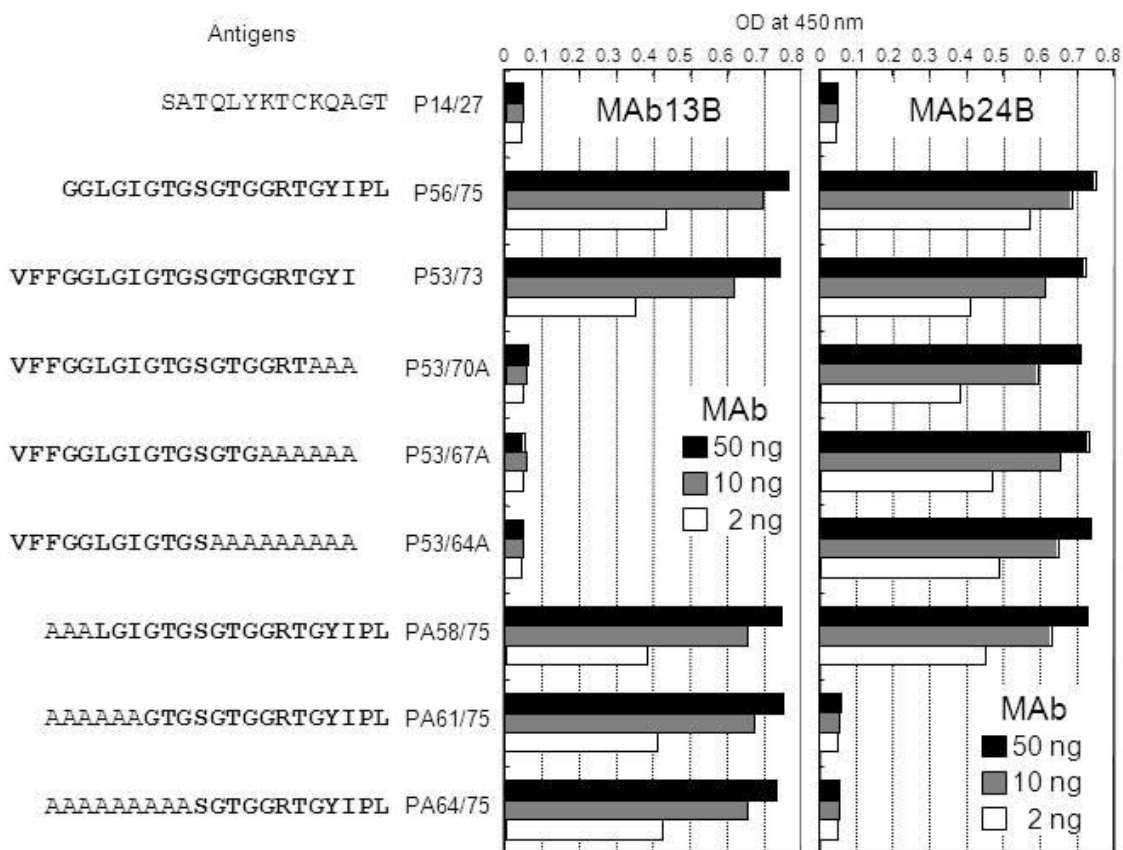
Light-chain variable region

			CDR1		CDR2
MAb13B	V <sub>L</sub>	DVVMTQTPLSLPVSLGDAQATISCRSSLSLVLSNRITYLQWYLQKPGQSPKLLIYK	VSNRF		
MAb24B	V <sub>L</sub>	DVVMTQTPLTSLVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLIY	L	VSKLD	
			CDR3		
MAb13B	V <sub>L</sub>	SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSSHPWTF	FGGGTKLEIKRA	
MAb24B	V <sub>L</sub>	SGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYC	WQGTHLPHAF	FGGGTTLEIKRA	

Nakao et al, Virology 2012より引用

MAb13BとMAb24Bの重鎖と軽鎖の可変領域の塩基配列から推測されるアミノ酸配列を示した。相補性決定領域 (CDRs) を四角で囲んで示した。

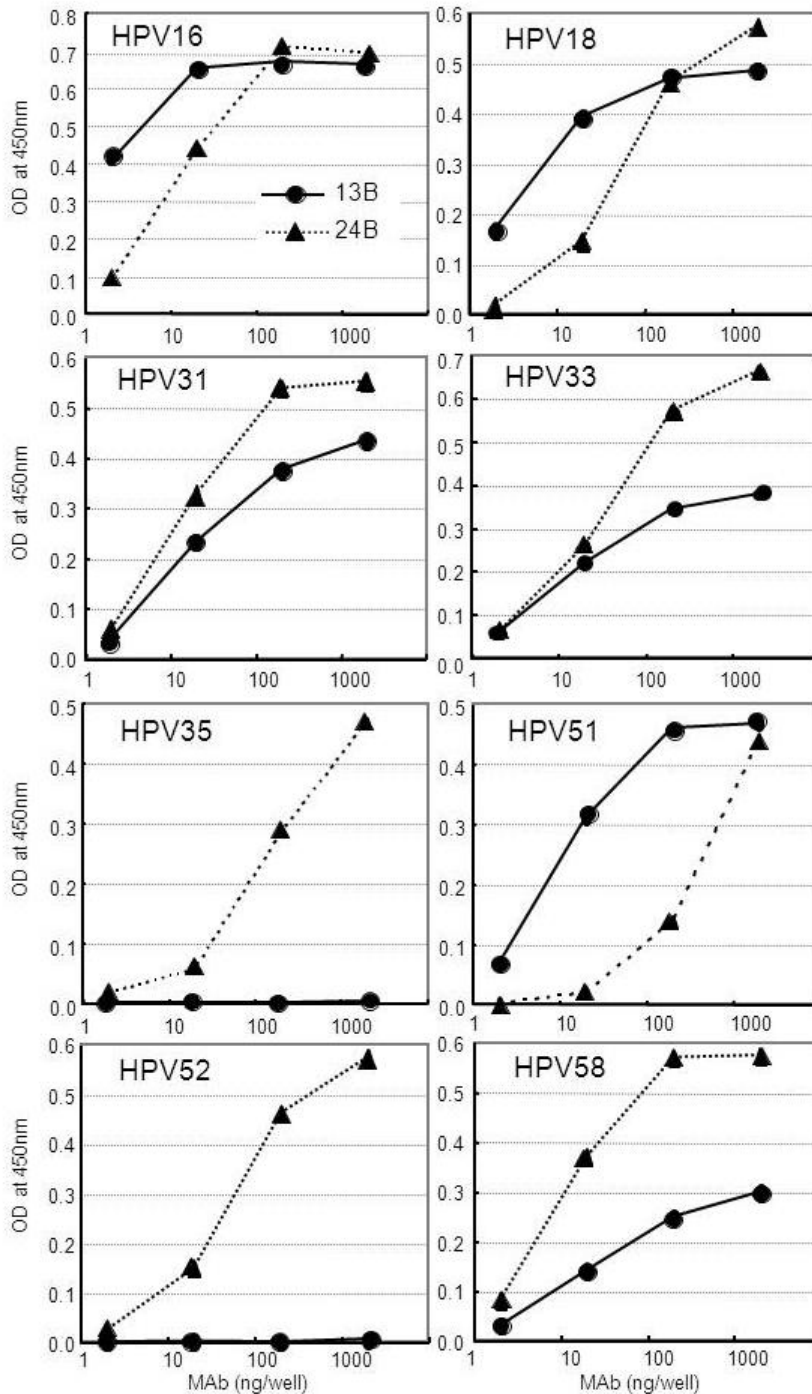
図6. MAb13BとMAb24Bの認識するエピトープ



Nakao et al, Virology 2012より引用

HPV16L2タンパク質のアミノ酸53～75の領域に欠失やアラニン変異を持つ合成ペプチドを抗原として、MAb13BとMAb24Bが認識するエピトープをELISAにより調べた。

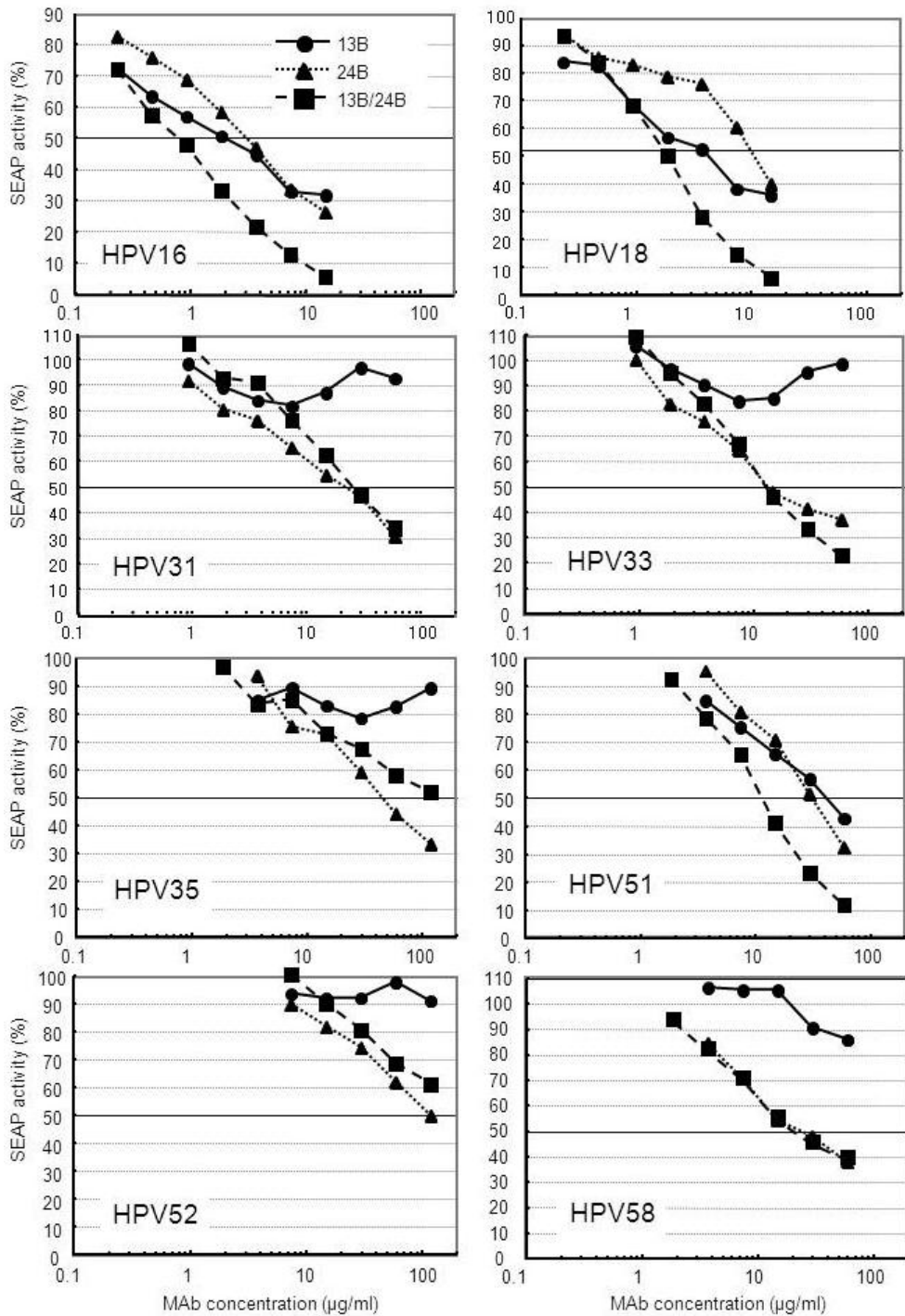
図7. MAb13BとMAb24BのL1/L2-VLPへの結合能



Nakao et al, Virology 2012より引用

200ng/wellのL1/L2-VLPをELISAプレートに固層化した。2, 20, 200, 2000ng/wellの精製したMAb13B、または、MAb24Bをwellに加え、L1/L2-VLPに結合したMAbを抗マウスIgGヤギ血清を使って検出した。MAbのL1/L2-VLPへの結合を450nmの吸光度で示した。

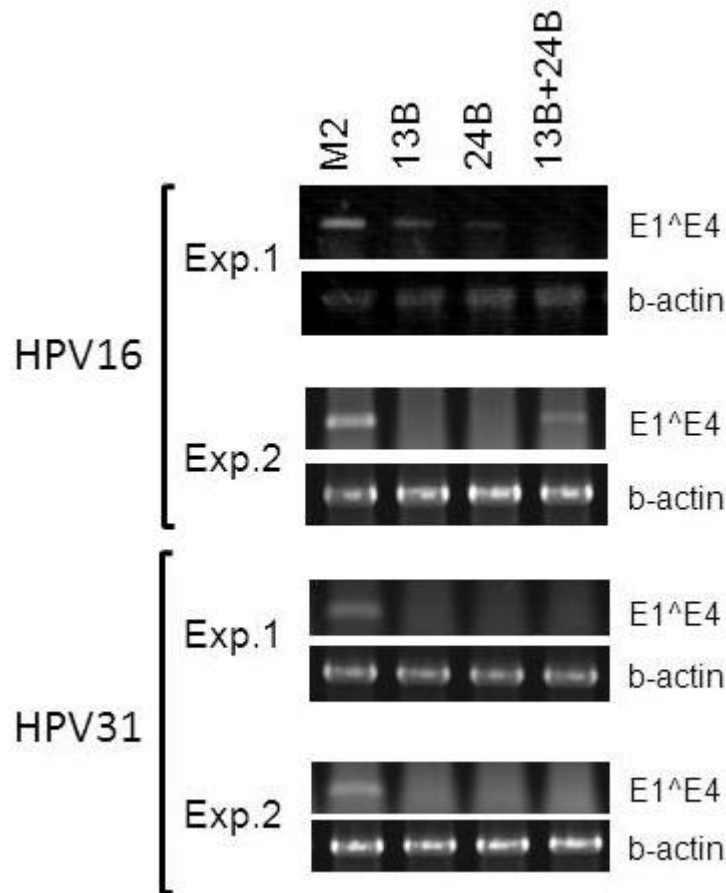
図8. MAb13B, MAb24BによるPsVの中和



Nakao et al, Virology 2012より引用

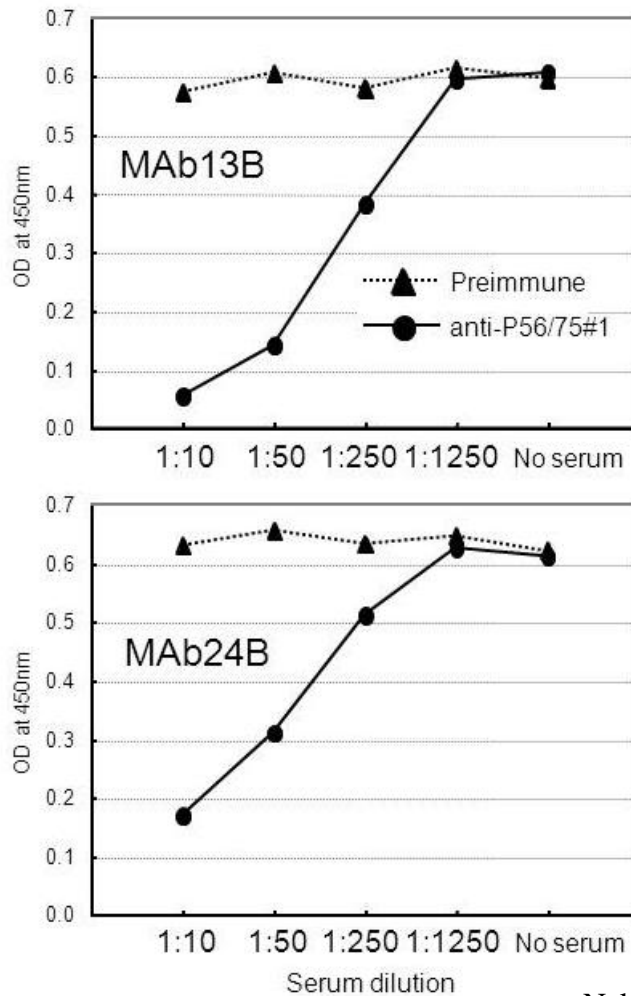
希釈したMAbとPsV溶液を等量ずつ混合し、293FT細胞に接種した。3日後、接種した細胞の培養液のSEAP活性を測定し、非感染細胞から得られる吸光度をそれぞれ測定値から減算した。測定は3回行い、PsVのみを接種した際に得られた吸光度に対する割合を計算し、プロットした。

図9. MAb13B、及び、MAb24Bによるraft culture由来HPVの中和



MAbの濃度が50 µg/mlになるようにraft culture由来のHPV16、または、HPV31と混ぜ、1時間、4°Cでインキュベートし、HaCaT細胞に感染させた。中和活性のない抗体として、抗FLAG-MAb(M2)を対照に用いた。3日後、細胞からRNAを抽出し、RT-PCRによりHPVのE1<sup>E4</sup>遺伝子と内在性コントロールとしてβ-アクチン遺伝子の発現を検出した。HPV16, HPV31、それぞれ独立した2回ずつの実験結果を示した。M2: 抗FLAG-MAb, 13B: MAb13B, 24B: MAb24B, 13B+24B: MAb13BとMAb24Bを1:1の割合で混合した。

図10. ウサギ抗P56/75血清によるMAb13B, MAb24BとHPV16L1/L2-VLPの結合阻害



Nakao et al, Virology 2012より引用

段階希釈したanti-P56/75#1 (Kondo et al., 2007)または免疫前のウサギ血清をELISAプレートのwellに固相化させたHPV16 L1/L2-VLP (200ng/well)と反応させた。続いてMAb13B (20ng/well)またはMAb24B (200ng/well)を反応させ、L1/L2-VLPに結合したMAbを抗マウスIgGヤギ血清を使って検出した。MAbのL1/L2-VLPへの結合を450nmの吸光度で示した。

図11. HPV16 L2タンパク質のaa56～aa75領域のアミノ酸配列と他の型の相同領域のアミノ酸配列の比較

	MAb24B	MAb13B
	aa58-64	aa64-73
HPV16	56-GGLGIGTGSG	SGTGGRTGYIPL-75
HPV18	55-*****	*****-74
HPV31	56-*****S*	*****V**
HPV33	55-*****	*S*****V*I-74
HPV35	56-*****S*	*****S**V**
HPV39	55-*****T*	*****-74
HPV45	55-*****	*S*****V**
HPV51	55-*****	*S*****-74
HPV52	55-*****A*	S***A**V**
HPV56	55-*****T*	S***A**V**
HPV58	55-*****	*****V**
HPV59	55-*****	*****-74
HPV66	55-*****	*S***A**V**
HPV68	55-*****	*****-74
HPV73	57-*****S*	*S*****V**
HPV6	55-*****	*****V**
HPV11	56-*****A*	S***A**V**
HPV2	54-*****	*****V-73
HPV27	53-*****	*****V-72

Nakao et al, Virology 2012より引用

HPV16 L2タンパク質と一致しているアミノ酸配列は\*で示した。MAb13BとMAb24Bのエピトープを含む領域は四角で囲んだ。