

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 畑山 靖佳

横浜市立大学大学院医学研究科 分子生体防御学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授 藤井 誠志
副査 横浜市立大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 准教授 佐野 大佑
副査 横浜市立大学大学院医学研究科 血液・免疫・感染症内科学 講師 吉見 竜介

Development of a Monoclonal Antibody Targeting HTLV-1 Envelope gp46 Glycoprotein and Its Application to Near-Infrared Photoimmuno-Antimicrobial Strategy

(HTLV-1 Envelope gp46 Glycoprotein を標的とするモノクローナル抗体の開発と近赤外光免疫抗菌法への応用)

レトロウイルスの一種であるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は感染細胞が生体内に侵入した後、数十年に及ぶ潜伏期間の間に細胞間感染および感染細胞のクローン増殖によりウイルス量を増やし、持続的かつ慢性的な感染を確立し、HTLV-1 感染キャリアの約 5% で成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) などの HTLV-1 関連疾患を発症することが知られている。ATL の治療法として多剤併用化学療法や同種造血幹細胞移植が行われており、最近では新規の治療法として抗 CCR4 モノクローナル抗体や抗ウイルス療法などが開発されているが、ATL の予後は依然として不良のままである。現在、HTLV-1 感染を予防するため中和抗体の開発が進められ、*in vitro* や *in vivo* での新規 HTLV-1 感染の予防効果が報告されているが、HTLV-1 感染細胞に対する有効な抗レトロウイルス治療薬やワクチンの開発には至っていない。本研究では、HTLV-1 感染に対する新規予防法の開発を目指し、HTLV-1 エンベロープタンパク質 (Env) に対する抗体を作製・選抜し、がん治療で用いられている近赤外光免疫療法 (Near-Infrared Photoimmunotherapy : NIR-PIT) を応用した近赤外光照射により病原微生物の除去が可能な新規戦略 Near-Infrared photoimmuno-antimicrobial strategy (NIR-PIAS) へ応用が可能か検討を行った。

まず HTLV-1 の Env タンパクを認識する抗体を作製するためにリポソームを添加したコムギ胚芽無細胞系を用いてリポソームに HTLV-1 Env のリコンビナントタンパクがアンカーされたプロテオリポソームを作製した。プロテオリポソームをマウスに免疫後、採取した脾臓細胞とミエローマ細胞を合成することにより、HTLV-1 Env に対するマウスモノクローナル抗体 (mAbs) を産生するハイブリドーマを作製した。イムノアッセイを用いたスクリーニングにて HTLV-1 Env に反応性を持つ抗体を産生するハイブリドーマの選抜を行い、抗体のエピトープ解析および親和性測定を行った。続いて HTLV-1 感染を定量的に検出可能なレポーターアッセイ系を確立し、mAb クローン D と既報の HTLV-1 中和活性抗体である LAT-27 の中和活性を検討した。また mAb クローン D と LAT-27 について HTLV-1 感染細胞への内在化効率を確認した。NIR-PIAS への応用が可能か確認するため、mAb クローン D および LAT-27 に IR700 を結合させ、近赤外光照射による細胞障害誘導の検討を行った。最後に NIR-PIAS 後の HTLV-1 感染細胞を用いたレポーターアッセイにて HTLV-1 の新規感染を確認し、HTLV-1 感染細胞に対する NIR-PIAS の効果を検討した。

プロテオリポソームをマウスに免疫し、作製されたハイブリドーマクローンについて、イムノアッセイにてスクリーニングを行ったところ、特に高い反応性を示すハイブリドーマクローン D を獲得した。抗体のエピトープ解析を行ったところ、細胞外ドメイン gp46 のプロリンリッチ領域のアミノ酸残基 186-192 にエピトープを持つことが明らかとなった。また生体分子間相互作用解析によりクローン D 抗体は HTLV-1 gp46 と高い親和性を示すことが明らかとなった。LAT-27 と mAb クローン D の中和活性を検討したところ、LAT-27 では抗体の用量依存的に HTLV-1 感染に対する中和活性が確認された。一方で

mAb クローン D は中和活性を示さないことが判明した。mAb クローン D の HTLV-1 感染細胞への内在化を検討したところ、中和活性を示した LAT-27 では膜表面に結合した抗体の細胞内への取り込みが確認されたが mAb クローン D では細胞内にほとんど取り込まれず、HTLV-1 感染細胞の表面に長く留まることが示された。IR700 を結合させた mAb クローン D は近赤外線照射により HTLV-1 感染細胞を特異的に認識し、LDH の放出を伴う細胞障害を誘導させることが明らかになった。また、NIR-PIAS による HTLV-1 感染細胞への細胞障害誘導により新規の HTLV-1 感染を抑制することが示された。

本研究において作製した HTLV-1 の gp46 を標的とする mAb を用いた NIR-PIAS は HTLV-1 感染細胞を直接除去できるだけでなく中和抗体のように感染も抑制する新規予防法として応用できることが示された。本研究の結果は HTLV-1 感染細胞に対して NIR-PIAS が適用可能であることを示し、ATL 細胞に特異的なマーカーを新規標的として用いることで ATL 発症後の HTLV-1 感染細胞についても直接除去可能な手法となりうる。

審査にあたり以上の研究報告がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、佐野副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) LDH の放出はどのくらいの時間で起こるのか。実際、頭頸部がんで光免疫療法をする際には非常に短い時間で反応することが知られている。
- 2) 実際に臨床応用するにあたって、感染細胞に対して細胞障害を誘導できればよいと考えられるが、血液の中にいる T 細胞に対してどのように近赤外光を照射するのか。実際に患者にどのように応用するのか。

これらの論評と質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) 近赤外光照射後 1 時間以上伸ばした検討は行っているが、時間を短くした検討は行っていない。実際の応用を考える場合、照射後どのくらいの時間で細胞障害が誘導されているか確認する必要があるため、今後検討を行いたい。
- 2) 近赤外光の透過距離は X 線ほど長くなく、体内の深部まで光を照射することは困難である。しかし、可視光と比較すると透過することが知られており、体表面の血管であれば照射が可能であると考えられる。血中に HTLV-1 感染細胞が存在しており、血流と共に体内を循環していると考えると、体の一部位に固定し、近赤外光を照射し続けることが可能な装置があれば、血液が循環することによって HTLV-1 感染細胞に対して近赤外光を照射することが可能だと考えられる。

次に、吉見副査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 今回抗体を作製した後に、どういった流れで光免疫療法として応用しようと考えたのか。
- 2) 抗体を用いてどのように発症の予防法に応用するのか。
- 3) 今回の実験系だと HTLV-1 感染細胞の Tax の発現に依存して光免疫療法の作用に影響してしまうが感染細胞に対しての光免疫療法の発展性はどうか。
- 4) 動物実験を行うなど直近で考えている目標は何があるか。

これらの論評と質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) 抗体の性状解析をした際に HTLV-1 の Env タンパクと高い親和性を示したクローン D の抗体は HTLV-1 に対する中和活性を持っていないことが明らかになった。中和活性を持つ抗体が細胞内へ取り込まれやすいこと、光免疫療法において抗体の細胞内への取り込みにより細胞障害活性が減弱することから本研究で選抜された抗体が光免疫療法に適していると考え、検討を行った。
- 2) HTLV-1 の潜伏感染後に確認される ATL 細胞では Tax の発現が減少し、Env を含む他のウイルスタンパクの発現も減少することが報告されている。そのため、標的となりうるのは新規感染した HTLV-1 感染細胞であると考えられる。ATL 等の HTLV-1 関連疾患において、体内のウイルス量と症状や予後との関連が報告されているため、光免疫療法により HTLV-1 感染細胞に障害を誘導できれば新規感染予防だけでなく、症状の緩和や予後の改善も可能になるのではないかと考えている。
- 3) 本研究で検討した光免疫療法は感染細胞表面の Env タンパクを標的としているため、細胞への障害誘導作用は Env タンパクの発現量に依存することが考えられる。ATL 細胞表面において、CCR4 など発現が増加しているマーカーが報告されているため、これらのマーカーを標的とした抗体を用いることで ATL 細胞においても細胞障害誘導が可能になると考えている。
- 4) 本研究で用いた HTLV-1 感染細胞株 MT-2 細胞はウイルス産生細胞であり、Env タンパクの発現量が多いことが知られている。より臨床に近い細胞における細胞障害を検討するためにまずは ATL 細胞の臨床株に対して光免疫療法を行い、Env タンパクの発現量と細胞障害誘導に関して検討を行いたいと考えている。

最後に、藤井主査から以下の論評と質問がなされた。

- 1) 現在、光免疫療法として承認されているのは頭頸部がんのみであり、固形がんと異なりこの実験で標的としているのは ATL で血球系のがんになるが臨床へ応用するにあたり、どのような課題があると考えられるか。頭頸部がんを始めとした固形がんは局所的に反応を集約することができる。一方で血球系がんでは全身で反応が起こり副作用も大きくなるのではないか。

これらの論評と質問に対して、以下の回答を得た。

- 1) HTLV-1 感染細胞を標的とした光免疫療法において、近赤外光の照射が一番の課題になると考えている。固形がんにおいてはファイバーを用いて体内の腫瘍部に直接光を照射することが可能であるが、血液を対象とすると全身に光を照射する必要があるため、現状困難であると考えられる。また血液を対象とした近赤外光照射による副作用も未知のため、実際に臨床応用するためにはさらなる検討が必要である。

以上のような質疑応答がなされた。

本学位論文は、HTLV-1 の抗体を作製し、光免疫療法へ応用することで HTLV-1 感染細胞に特異的に障害を誘導できる可能性を示した初めての報告であり、今後の HTLV-1 に対する感染予防法を更に発展させる可能性をもつ学術的価値の高い研究と判断された。また申請者は本学位論文の内容を中心に幅広い質問に的確に答え、この課題について深い理解と洞察を持っていることを示した。以上より申請者は医学博士を授与されるにあたり相当であると判定した。