

# 学位論文の要旨

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)

March, 2023  
(2023 年 3 月)

Yasuyoshi Hatayama  
畑山靖佳

Department of Microbiology and Molecular Biodefence Research  
Yokohama City University Graduate School of Medicine  
横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 分子生体防御学

(Doctoral Supervisor: Akihide Ryo, professor)  
( 指導教員：梁 明秀 教授 )

## 学位論文の要旨

# 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)

<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/10/2153>

### 1. 序論

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、成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL)、HTLV-1 関連脊髄症/熱帯性瘧疾性対麻痺、HTLV-1 ぶどう膜炎を引き起こす(Hinuma et al., 1981; Poiesz et al., 1980; Uchiyama, 1997)。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 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(Saito et al., 2014; Tanaka et al., 2014)。一方で 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) (Mitsunaga et al., 2022)へ応用が可能か検討を行った。

### 2. 実験材料と方法

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の脂質膜に 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。免疫アッセイを用いたスクリーニングにて細胞表面に発現する 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、HTLV-1 Env に対して高い反応性を有する mAb を産生するハイブリドーマクローン D を樹立した。mAb クローン D について Env タンパクの欠損変異体およびペプチドを用いてエピトープ解析を行い、その後、オクテットアッセイにより mAb クローン D の親和性について解析を行った。続いて mAb クローン D の中和活性を確認するため、HTLV-1 感染により培養上清中に NanoLuc を分泌するよう遺伝子導入を行った LTR-secNL Jurkat 細胞を作製し、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た。このアッセイ系を用いて 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 LAT-27 と mAb クローン D 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。

### 3. 結果

タンパクを免疫することで得られたハイブリドーマクローンについて、免疫アッセイにて HTLV-1 感染細胞表面の Env タンパクに反応性を持つ抗体産生ハイブリドーマを選抜した。その中で特に高い反応性を示した mAb クローン D について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。またオクテットアッセイを用いた抗体の解離定数測定によりクローン 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 NanoLuc シグナルが減少し、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 ではシグナルの減少が見られず中和活性を示さないことが判明した。HTLV-1 と同じレトロウイルスである HIV-1 において、中和活性を持つ抗体は感染細胞内に取り込まれやすいことが報告されており、近赤外光を用いたがん治療法である Near-Infrared photoimmunotherapy において抗体の内在化により細胞障害誘導が減少することから mAb クローン D の HTLV-1 感染細胞への内在化を検討した。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 感染も抑制することが示された。

#### 4. 考察

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。HTLV-1 潜伏感染後に確認される ATL 細胞においては gp46 を含むウイルスタンパクの発現が減少することが報告されており、gp46 を標的とした NIR-PIAS の効果が制限される可能性がある。しかし、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。

キーワード：HTLV-1, モノクローナル抗体, 近赤外光免疫抗菌戦略, IR700

## 引用文献

- Hinuma, Y., K. Nagata, M. Hanaoka, M. Nakai, T. Matsumoto, K. I. Kinoshita, S. Shirakawa, and I. Miyoshi. 1981. "Adult T-Cell Leukemia: Antigen in an ATL Cell Line and Detection of Antibodies to the Antigen in Human Sera." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(10):6476–80.
- Mitsunaga, Makoto, Kimihiro Ito, Takashi Nishimura, Hironori Miyata, Kei Miyakawa, Takeshi Morita, Akihide Ryo, Hisataka Kobayashi, Yoshimitsu Mizunoe, and Tadayuki Iwase. 2022. "Antimicrobial Strategy for Targeted Elimination of Different Microbes, Including Bacterial, Fungal and Viral Pathogens." *Communications Biology* 5(1):647. doi: 10.1038/s42003-022-03586-4.
- Poiesz, Bernard J., Francis W. Ruscetti, Adi F. Gazdar, Paul A. Bunn, John D. Minna, and Robert C. Gallo. 1980. "Detection and Isolation of Type C Retrovirus Particles from Fresh and Cultured Lymphocytes of a Patient with Cutaneous T-Cell Lymphoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(12):7415–19.
- Saito, Mineki, Reiko Tanaka, Hideki Fujii, Akira Kodama, Yoshiaki Takahashi, Toshio Matsuzaki, Hiroshi Takashima, and Yuetsu Tanaka. 2014. "The Neutralizing Function of the Anti-HTLV-1 Antibody Is Essential in Preventing in Vivo Transmission of HTLV-1 to Human T Cells in NOD-SCID/ $\gamma$  cnull (NOG) Mice." *Retrovirology* 11:74. doi: 10.1186/s12977-014-0074-z.
- Tanaka, Yuetsu, Yoshiaki Takahashi, Reiko Tanaka, Akira Kodama, Hideki Fujii, Atsuhiko Hasegawa, Mari Kannagi, Aftab A. Ansari, and Mineki Saito. 2014. "Elimination of Human T Cell Leukemia Virus Type-1-Infected Cells by Neutralizing and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity-Inducing Antibodies against Human t Cell Leukemia Virus Type-1 Envelope Gp46." *AIDS Research and Human Retroviruses* 30(6):542–52. doi: 10.1089/aid.2013.0214.
- Uchiyama, T. 1997. "Human T Cell Leukemia Virus Type I (HTLV-I) and Human Diseases." *Annual Review of Immunology* 15:15–37. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.15.

## 論文目録

### I. 主論文

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

**Hatayama, Y.**, Yamaoka Y., Morita T., Jeremiah S.S., Miyakawa K., Nishi M., Kimura Y., Mitsunaga M., Iwase T., Kimura H., Yamamoto N., Takaori-Kondo A., Hasegawa H., and Ryo A. :  
Viruses. Vol. 14, No.10, P. 2153, 2022.

### II. 副論文

なし

### III. 参考論文

1. An autopsy case of COVID-19-like acute respiratory distress syndrome after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccination.

Yoshimura Y., Sasaki H., Miyata N., Miyazaki K., Okudela K., Tateishi Y, Hayashi H., Kawana-Tachikawa A., Iwashita H, Maeda K., Ihama Y., **Hatayama Y.**, Ryo A., and Tachikawa N.:  
International Journal of Infectious Diseases, Vol. 121, P. 98–101, 2022.

2. Prospective clinical evaluation of the diagnostic accuracy of a highly sensitive rapid antigen test using silver amplification technology for emerging SARS-CoV-2 variants.

Obata K., Miyakawa K., Takei T., Wada A., **Hatayama Y.**, Kato H., Kimura Y., Sekino H., Katada J., Ryo A.:  
Biomedicines. Vol. 10, No.11, P. 2801, 2022

3. Generation and utilization of a monoclonal antibody against hepatitis B virus core protein for a comprehensive interactome analysis.

Nakai Y., Miyakawa K., Yamaoka Y., **Hatayama Y.**, Nishi M., Suzuki H., Kimura H., Takahashi H., Kimura Y., Ryo A.:  
Microorganisms. Vol.10, No.12, P. 2381, 2022