

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

HPV と HBV を標的とする多価ワクチンの開発

分担研究者 森 清一郎 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

**研究要旨** 昨年度までに、HPV16キャプシドタンパク質L2のアミノ酸56から75領域（L2-56/75）には少なくとも2つの交差性中和エピトープがあることが分かり、これらのエピトープを提示する抗原は、幅広い型のHPVに対する次世代ワクチンと成り得ることを示した。本年度は、L2-56/75を使用したワクチンの実用化を目指すため、製薬会社と共同研究を行った。B型肝炎ウイルスワクチンであるHBs抗原にL2-56/75を挿入したキメラ抗原（HBs-56/75）を作成し、マウスに免疫した。HBs-56/75抗原は、交差性HPV中和抗体、及び、抗HBs抗体を効率よく誘導したことから、幅広い型のHPVとHBVに有効な多価ワクチンとして有用である。

A. 研究目的

現行 HPV ワクチンは主要キャプシドタンパク質 L1 を抗原としており、子宮頸がんの原因となる約 15 の高リスク型のうち HPV16 と HPV18 にのみ有効である。昨年度までに、HPV16 の副キャプシドタンパク質 L2 のアミノ酸 56 から 75 領域（L2-56/75）に、少なくとも2つの交差性中和エピトープ（13B、及び、24B）があることが分かり、これら2つのエピトープを認識する抗体を誘導できる抗原は、全ての高リスク型を含む幅広い HPV に有効な次世代ワクチンと成り得ることを示した。本年度の研究目的は、L2-56/75 を使用したワクチンの実用化を目指すため、13B、及び、24B エピトープを認識する抗体を効率よく誘導でき、克つ、ヒトに接種可能なワクチン抗原を開発することである。

B 型肝炎ウイルス(HBV)ワクチンとして既に実用化されている HBs 抗原に L2-56/75 を挿入したキメラ抗原を作成し、マウスにおける抗 L2 抗体、抗 HBs 抗体の誘導を調べた。

B.研究方法

L2-56/75をHBs抗原のN末端に付加したキメラ抗原（HBs-56/75-N）、アミノ酸127と128の間に挿入したキメラ抗原（HBs-56/75-127）、C末端に付加したキメラ抗原（HBs-56/75-C）をコードする遺伝子を作成し、CHO細胞で発現させた。精製した各キメラ抗原を各群10匹のマウス大腿部にアルミアジュバントともに5µg/dose、4週おきに2回接種し、2回目の接種から4週間後に血清を採取した。比較として、HBs抗原も同様に接種した。10匹分の血清を等量ずつ混合し、各抗原に対する抗

血清とした。高リスク型であるHPV16、18、31、33、35、51、52、58のウイルス様粒子（VLP）を抗原とするELISAで、各抗血清に含まれる抗L2抗体価を調べた。上記高リスク型VLPにレポータープラスミドをパッケージした偽ウイルスを作成し、各抗血清のHPV中和活性を調べた。L2-56/75に相当するペプチドに欠失とアラニン置換を導入した変異ペプチドを抗原とするELISAで、各キメラ抗原により誘導された抗L2抗体が認識するエピトープを調べた。HBs抗原を用いたELISAで、抗HBs抗体の誘導を調べた。

（倫理面への配慮）

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号、平成17年6月改正）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月）」、内閣府告示の「動物の処分方法に関する指針」を踏まえ、適切に行った。

### C. 研究結果

全てのキメラ抗原は、HPV16-VLPに結合する抗L2抗体を誘導した。なかでも、HBs-56/75-127により誘導される抗L2抗体価が最も高く、調べた全ての高リスク型HPV-VLPへの結合が確認された。また、抗HBs-56/75-127血清は、HPV16、18、35の偽ウイルスを中和した。全てのキメラ抗原は、L2-56/75領

域にある2つのエピトープのうち13Bを認識する抗体を優位に誘導したが、HBs-56/75-127は、他のキメラ抗原に比べ、24Bエピトープを認識する抗体も効率よく誘導した。全てのキメラ抗原は、抗HBs抗体を誘導した。

### D. 考察

昨年度までに、13B、及び、24Bエピトープをそれぞれ認識するモノクローナル抗体、MAb13B、及び、MAb24Bを分離し、それらの中和活性を調べた。各MAb単独よりも、2つのMAbを混ぜた場合、より高いHPV中和活性が認められた。今回作成した3種類のキメラ抗原のうち、HBs-56/75-127が最も効率よく抗HPV中和抗体を誘導した理由の一つとして、この抗原が13Bだけでなく24Bエピトープに対する抗体も誘導したことが考えられる。全てのキメラ抗原は抗HBs抗体を誘導したことから、HBVへの有効性も維持していることが期待される。

### E. 結論

HBs抗原にHPV16 L2-56/75領域を挿入したキメラ抗原は、幅広い型のHPVとHBVに有効な多価ワクチンとして有用である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Ishii Y, Takeuchi T, Kukimoto I. Replication interference between human papillomavirus types 16 and 18 mediated by heterologous E1

helicases. Virol J, 2014 11:11.

Kukimoto I, Maehama T, Sekizuka T, Ogasawara Y, Kondo K, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Ishii Y, Takeuchi T, Yamaji T, Takeuchi F, Hanada K, Kuroda M. Genetic variation of human papillomavirus type 16 in individual clinical specimens revealed by deep sequencing. PLoS One, 2013 8: e80583.

Ishii Y, Nakahara T, Kataoka M, Kusumoto-Matsuo R, Mori S, Takeuchi T, Kukimoto I. Identification of TRAPPC8 as a host factor required for human papillomavirus cell entry. PLoS One, 2013 8: e80297.

## 2 . 学会発表

Mori S, Kusumoto-Matsuo R, Kukimoto I. Molecular mechanism of replication interference between HPV16 and HPV18. DNA tumor virus meeting 2013 (Birmingham)

森 清一郎、松尾 理加、柊元 巖、ヒトパピローマウイルス16型と18型間での複製干渉機構、第61回日本ウイルス学会学術総会（神戸）

柊元 巖、森 清一郎、近藤 一成、個々の臨床検体における HPV16 ゲノム多様性の解析、第72回日本癌学会学術総会（横浜）

近藤 一成、佐藤 奈加子、角田 肇、森 清一郎、竹内 隆正、石井 克幸、柊元 巖、子宮頸部細胞診異常者の年齢と HPV 型の関連における検討、第72回日本癌学会学術総会（横浜）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

HPV/HSV キメラタンパク質を有効成分とする HPV 感染症及び/又は B 型肝炎用ワクチン（PCT/JP2013/082094）出願日：2013 年 11 月 28 日