

## アデノウイルスにおける中和抗体回避機構の解明

### 研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヒライ タカマサ 平井 孝昌
所属等	昭和薬科大学 薬剤学研究室 特任助教
プロフィール	<p>私は、昭和薬科大学の薬学部薬学科を卒業後、同大学の博士課程に進学しました。博士課程では、アデノウイルスの構成タンパク質の機能解析を行い、ウイルスタンパク質を用いて、タンパク質等の高分子を送達可能な新たなドラッグデリバリーシステムを考案しました。</p> <p>現在は同大学の特任助教として、中和抗体を回避可能なアデノウイルスの新たな感染機構の解明を目指し研究に励んでいます。また、遺伝子導入に関する知識と経験を活かし、国立医薬品食品衛生研究所 再生・細胞医療製品部との共同研究を行っており、アデノウイルスベクターを用いて iPS 細胞由来の再生医療製品中の未分化細胞の高感度検出法の確立を目指しています。</p>

### 1. 研究の概要

本研究は、感染細胞内で増殖した 5 型アデノウイルス (Ad) が「中和抗体により阻害されることなく他の細胞に感染する」という新たな感染機構を有することに着目し、Ad がどのように中和抗体を回避して他の細胞に感染するのかを明らかにすることを目的とした。今回行った 2 つの検討内容を下記に示す。

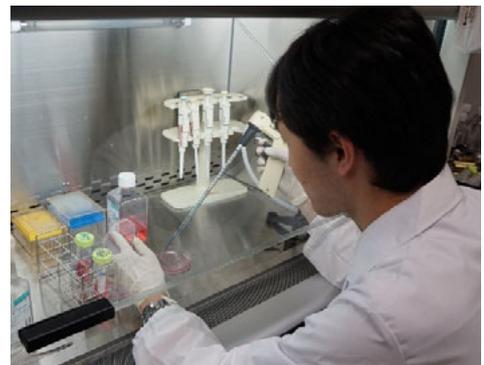
#### (1) Ad における中和抗体の結合量に関する検討

中和抗体は量依存的に Ad の感染を阻害する。つまり、Ad に多くの中和抗体が結合するほど、感染はより強く阻害される。そこで、既知の感染機構と新たな感染機構とで Ad に結合する中和抗体の量を比較し、新たな感染機構を想定した条件の方が中和抗体の結合量が少ないことを明らかにした。

#### (2) 異なる血清型の Ad における中和抗体回避能に関する検討

これまでの検討では、5 型 Ad を用いて検討を行ってきた。Ad には 50 種を超える血清型が存在するが、5 型以外の血清型においても同様に中和抗体を回避可能であるかは明らかとなっていない。そこで、5 型とはサブグループおよび受容体が異なる 35 型 Ad を用いて再感染量を評価し、中和抗体存在下においても感染細胞から他の細胞への感染が起きることを示した。

一般的に中和抗体の影響を検討する場合、中和抗体存在下において Ad がどの程度細胞に侵入し、遺伝子を発現するかを評価する。一方、本研究は中和抗体存在下において、感染細胞内で増殖した Ad の他の細胞への感染を評価するため、Ad の感染細胞内での挙動や感染細胞から他の細胞への移行過程についても重要である。特に、新規感染機構では、Ad が感染細胞から隣接細胞の膜上に広がることが示唆されている。この特異なウイルスの挙動に関する検討はされておらず、本研究の特色と言える。ウイルスの挙動と中和抗体との関係を明らかにすることで、中和抗体からの回避機構の解明につながると推測される。



## 2. 研究の動機、目的

Ad は、咽頭結膜熱や流行性角結膜炎等を引き起こすウイルスである。一方、ウイルスの機能をがんや難治性疾患等の治療に応用する試みが進められており、その 1 つとして、腫瘍溶解性ウイルスが挙げられる。腫瘍溶解性ウイルスとは、遺伝子組み換えにより、がん細胞でのみ増殖するウイルスであり、がん細胞に感染するとウイルスが増殖しがん細胞を傷害する。増殖したウイルスは他のがん細胞に再び感染するため、作用が持続し高い抗腫瘍効果が期待されている。しかし、ウイルスを用いた治療法は、ウイルスに対する免疫応答の影響を考慮しなくてはならない。特に、中和抗体は感染防御の観点では非常に重要な役割を果たすが、治療用ウイルスの治療効果は減弱される。したがって、中和抗体による影響を受けない腫瘍溶解性ウイルスが求められている。ウイルスは宿主の機能をうまく利用し、感染と増殖を繰り返し、長きにわたり生き残ってきた。ウイルスは宿主の免疫を回避する様々な機構を備えており、Ad もインターフェロンの放出や細胞傷害性 T 細胞による攻撃を抑制する戦略を有している。そこで、私は中和抗体による阻害を回避するための機構も存在すると予想し、中和抗体存在下における Ad の感染について検討を行った。その結果、感染細胞内で増殖した Ad は中和抗体による阻害を受けずに、他の細胞に感染できることを明らかとした。さらなる検討を行うことで、Ad をより有効に活用でき、効果の高い治療法の構築につながると考え、中和抗体の回避機構の解明を目的として本研究を実施した。

## 3. 研究の結果

### (1) Ad における中和抗体の結合量に関する検討

はじめに、中和抗体の結合量を測定するための実験系を確立した。5 型 Ad に対するマウス由来の中和抗体を得るために、不活化した Ad ベクターを投与したマウス (Balb/c、オス) から血液を採取し、血清を得た。得られた血清が中和活性を有することを確認し、マウス由来中和抗体として用いた。まず、Ad ベクターにマウス由来中和抗体を作用した。マウス由来の中和抗体が結合した Ad ベクターを ELISA 用のプレート (ヒト由来の抗 Ad 抗体を吸着) に添加し、well に結合させた。その後、マウス IgG 抗体に対する二次抗体 (ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ標識) および発色試薬を作用して発色させた。反応停止後、450 nm の吸光度を測定した。その結果、中和抗体を含まないマウス血清を作用した Ad ベクターでは吸光度は増加しなかったが、マウス由来の中和抗体を作用した Ad ベクターでは吸光度が増加した。また、マウス由来の中和抗体の濃度依存的に吸光度が増加した。したがって、本実験系により、Ad に結合した中和抗体量を比較可能であることが示された。

次に、中和抗体からの回避における中和抗体の結合性の影響を明らかにするために、上清中に浮遊した Ad (既知の感染機構を想定) および膜に結合した Ad (新規感染機構を想定) に中和抗体を作用し、各条件における抗体結合量を比較した。この時、well 中の Ad 量を補正するために、well に結合した Ad 量を PCR 法を用いて測定した。その結果、Ad 1 粒子当たりの中和抗体の結合量は、上清中に浮遊している Ad よりも膜に結合している Ad の方が少なかった。このことから、Ad は細胞膜から離れずに、膜上を移動することで、中和抗体の結合性を低下させ、一定の感染力を保持可能であることが示唆された。

### (2) 異なる血清型の Ad における中和抗体回避能に関する検討

5 型以外の血清型においても中和抗体による阻害を受けずに再感染が可能かを明らかにするために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する 35 型 Ad ベクターを用いて、中和抗体存在下における再感染について検討を行った。通常、ベクターは細胞に感染しても増殖しないように改変されているため、細胞には 35 型 Ad ベクターが増殖可能な 293 E1b 細胞を用いた。まず、35 型 Ad ベクターを 293 E1b 細胞に作用し、感染細胞とした。その後、感染細胞と区別するために ParRed で染色した 293 E1b 細胞を感染細胞とともに中和抗体存在下で培養し、GFP 発現量を flow cytometry を用いて測定した。その結果、わずかではあるが、ParRed 染色した細胞においても GFP の発現が見られた。このことから、35 型 Ad は、5 型 Ad と同様に、中和抗体存在下においても再感染が可能であることが示された。また、Ad は血

清型や感染受容体に関わらず、中和抗体を回避可能である可能性がある。今後、5型 Ad と同様に膜上での挙動を検討し、同一のメカニズムであるかを明らかにする。

#### 4. これからの展望

前述したとおり、ウイルスを用いた治療法において、免疫回避能は重要な機能である。Ad は、腫瘍溶解性ウイルスとしての臨床応用に向け、研究が行われている。今回得られた成果は、Ad の中和抗体回避能に関わる新たな知見であり、腫瘍溶解性ウイルスとしての機能向上に寄与すると考える。しかし、新規感染機構による感染量は、既知の感染機構と比べて少ないと考えられることから、今後、新規感染機構を促進する方策を探索し、中和抗体の影響を受けない腫瘍溶解性ウイルスを構築する。また、35型 Ad においても中和抗体を回避可能であることが示唆されたため、感染受容体や血清型に関わらず、どの Ad においても中和抗体を回避可能な感染機構を有する可能性がある。Ad は軽微な症状で済むことが多いが、特異的な治療法がないため、小児や免疫力が低下した人では重症化することがある。新規感染機構を阻害することができれば、中和抗体により感染が完全に阻害され、重症化を防ぐことができると予想される。今後、メカニズム解明を進め、新たな治療標的を同定し、Ad 感染症の新たな治療方策を構築する。

ウイルスは感染症を引き起こし脅威となるが、様々な機能を有しており、応用することができれば有益な存在にもなり得る。ウイルスの機能を一つずつ紐解いていき、ウイルスの新たな利用法や制御法を開発していきたい。

#### 5. 社会に対するメッセージ

ウイルスに関する研究は単に感染症を防ぎ治療するためだけではなく、がんをはじめとする様々な疾患に対する治療法としての応用を目的に行われています。本研究は、基礎研究の段階ですが、基礎検討を重ねていくことで、ウイルスの新たな可能性を切り開き、画期的な治療法の確立につながると考えています。私が行っている研究が将来誰かを助け、社会に貢献するよう、研究に励んでいきますので、今後ともご支援をよろしくお願い申し上げます。

また、ご支援をいただきました方々には、深く感謝申し上げます。1年間トライアルエラーを繰り返し替えて、研究の難しさと奥深さを改めて感じることができました。今回の研究を通して、研究と向き合い、様々な問題を解決していく力を養うことができたと感じています。誠にありがとうございました。