



L1 蛋白質からなるウイルス様粒子 virus-like particle (L1-VLP という) で、HPV 粒子と外観が酷似し、かつ強い抗原性を持つことから HPV 粒子表面に結合する抗体が誘導できる。しかし L1-VLP により誘導される抗体は遺伝子型特異的であるため、10 種以上ある oncogenic HPV の感染を全て予防することは困難とされる。

本研究では、どの遺伝子型の粘膜型 HPV 感染も予防できる遺伝子型共通ワクチンの開発を目指し、ワクチン抗原の候補としてもう 1 つの構造蛋白質である L2 蛋白質に注目した。L2 蛋白質は、大部分がウイルス粒子内に存在するが、一部は粒子の表面に露出していると考えられている。一般に中和エピトープはウイルス粒子表面に露出している領域であることから、L2 蛋白質の中の HPV 粒子表面に露出している領域を抗 L2 モノクローナル抗体を用いて選出することから研究を進めた。

子宮頸癌の約 50% から検出される HPV 16 型を用い、L1、L2 遺伝子が同時発現するバキュロウイルスベクターを夜盗蛾細胞に感染させ、そこから塩化セシウム平衡密度遠心法とショ糖沈降速度法を用いて HPV 16 型 L1/L2-VLP を精製した。これを接種した Balb/c マウスからモノクローナル抗体 (MAbs) を作製し、精製された 16 型 L1/L2-VLP との結合を ELISA 法で検討したところ、18 種類の MAbs が粒子表面を認識した。L1-VLP および 4 つの truncated-L2 蛋白質 (HPV 16 型 L2 蛋白質の 1-173aa、1-330aa、141-243aa、318-473aa の各領域) を抗原とした ELISA 法により、11 種の MAbs が HPV 16 型 L2 蛋白質の 1-140aa 領域を認識すると判定した。本研究では遺伝子型共通ワクチンを目指すため、HPV 16 型 L2 蛋白質 1-140aa 領域のうち、遺伝子型間でアミノ酸配列がよく保存されている 3 ヶ所の領域 (HPV 16 型 L2 蛋白質の 1-12aa、56-81aa、95-120aa 領域) に注目した。これらの領域のアミノ酸配列を持つ合成ペプチドを 6 種類作製し、ELISA 法により 11 種類の MAbs との結合をみた。7 種類の MAbs は 69-81aa 領域と結合し、2 種類の MAbs は 108-120aa 領域と結合した。これより HPV 16 型 L2 蛋白質の 69-81aa と 108-120aa 領域は、粘膜型 HPV にほぼ共通でかつウイルス粒子表面に露出している領域であることが示された。

これらの領域に対する抗体が HPV の細胞内への侵入を阻害 (中和という) できれば、これらの領域は HPV の中和エピトープと考えられる。これを確かめるために、培養細胞内へ侵入し、自分の遺伝子を発現させられる粒子 (感染粒子という) を用いた中和抗体測定法を開発した。この感染粒子は複製や増殖しないが、HPV 粒子の培養細胞への侵入 (感染という) を観察できる。本研究では、試験管内でマーカー DNA を L1/L2-VLP 内に組込むことで、偽ウイルス pseudovirion を人工的に作製する方法を開発した。すなわち精製した L1/L2-VLP を 2-メルカプトエタノール (2-ME) で処理し粒子構造が壊された状態に

し、レポーター遺伝子の $\beta$ -galactosidase 発現プラスミドを加え、2 価の陽イオンを添加しつつ高塩バッファーに対して透析し 2-ME を除くと、L1、L2 蛋白質が再構築される。粒子構造を再形成したものの一部にプラスミド DNA を組込んだ pseudovirion が含まれる。この試料を塩化セシウム平衡密度勾配遠心法にかけ、pseudovirion を精製した。pseudovirion 内に DNA が組込まれているは、DNase I 耐性 DNA を検出することで確認した。この試料の電子顕微鏡で直径約 55nm の再構成粒子が確認された。pseudovirion を COS-1 細胞に感染させ、 $\beta$ -galactosidase 染色後、青変細胞として感染細胞数を測定した。同様の方法で HPV 6 型の L1/L2-VLP から成る pseudovirion 6 型を作製した。

これらの pseudovirion を用いて各種抗体の中和活性を調べた。HPV 16、18、6 型 L1-VLP 抗血清や L2-MAb を、pseudovirion と 1 時間反応させた後 COS-1 細胞に感染させ、青変細胞数の減少を観察した。16 L1-VLP 抗血清のみが pseudovirion 16 型を中和し、6 型 L1-VLP 抗血清のみが pseudovirion 6 型を中和したことから、L1-VLP 抗血清は遺伝子型特異的な中和抗体を含むことが確認された。HPV 16 型 L2 蛋白質 69-81aa を認識する MAb は、pseudovirion 16 型感染は中和したが、pseudovirion 6 型感染は中和しなかったことから、HPV 16 型に特異的な中和抗体であった。一方、HPV 16 型 L2 蛋白質 108-120aa を認識する MAbs は、pseudovirion 16、6 型どちらの感染も同様に中和したことから、HPV 16、6 型に共通の中和抗体と考えられた。これを裏付けるために、108-120aa 領域のアミノ酸配列を持つ合成ペプチド (P-108/120) を Balb/c マウスに皮下注射し得た抗血清が、16、6 型両方の pseudovirion 感染を中和することを確かめた。更に pseudovirion は人工的に再構成した粒子であるため、実際の HPV 粒子 (authentic-virion という) でもこの領域が中和エピトープであるかを確認した。巨大な外陰コンジローマから HPV 11 型 authentic-virion を精製し、HaCaT 細胞へ感染させた後 RT-PCR 法により HPV 11 型遺伝子の転写産物 (E1<sup>+</sup>E4 mRNA) を検出することで、authentic-virion の細胞内への侵入を観察する系を確立した。各種抗体を authentic-virion と反応させ、authentic-virion 感染の中和を観察したところ、authentic-virion 11 型にとっても HPV 16 型 L2 蛋白質の 108-120aa 領域が中和エピトープになっていることが示された。

そこで、この遺伝子型共通中和エピトープを利用した L2 ペプチドワクチンの可能性を探った。主に性行為感染で伝播する HPV 感染を予防するためには、子宮頸部-膣粘膜面に中和抗体を誘導する必要がある。そこで本研究では、経鼻接種による粘膜面での中和抗体の誘導を試みた。P-108/120 にアジュバントとしてコレラ毒素を混和し、Balb/c マウスに 2 回経鼻接種 (2 週間隔) して、血清・膣洗浄液中を採取した。ELISA 法、中和抗体測定法により、HPV 16 型

L1/L2-VLP に対する IgG、IgA 抗体の抗体価とその中和活性を測定した。血清中には IgG、腔洗浄液中には IgA が主に検出され、いずれも pseudovirion 16 型と authentic-virion 11 型の感染に対する中和抗体を含んでことが示された。またこれらの抗体は、HPV 16、6 と同様に HPV 18 型 L1/L2-VLP にも結合することから、ほぼ全ての粘膜型 HPV 粒子と結合することが示唆された。また、L2 ペプチドワクチン、L1-VLP ワクチンにより誘導された抗体の中和力価を比較したところ、ほぼ同様であった。Balb/c マウスとは MHC クラス II ハプロタイプが異なる C57BL/10 マウスでは、P-108/120 を経鼻接種しても L1/L2-VLP に対する抗体は誘導されなかったが、MHC クラス II 分子に結合できるように P-108/120 を改変したところ、C57BL/10 マウスの腔洗浄液中にも中和抗体が誘導された。ヒトの HLA クラス II タイプに合うようなワクチン抗原の改変が可能であることが示唆された。

本研究により HPV 16 型 L2 蛋白質の 108-120aa 領域に対する抗体は、多くの粘膜型 HPV の感染を中和することが示された。この中和エピトープを利用したペプチドワクチンがヒトでも高力価の抗体を誘導できれば、遺伝子型共通ワクチンとして十分に期待できる。