

北里大学大学院獣医学系研究科





博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

平成28年2月19日

学位論文題目

猫伝染性腹膜炎 (FIP) に対する抗ウイルス薬および抗 TNF 薬の開発

氏名	土岐 朋義	所属	獣医学専攻	獣医伝染病学
----	-------	----	-------	--------

審査委員	主査	北里大学	教授	佐藤 久聡	
	副査	北里大学	教授	岡野 昇三	
	副査	北里第一三共ワクチン(株) ワクチン研究所第2研究グループ長		本川 賢司	
	副査	北里大学	准教授	田邊 太志	

審査の結果 合格 最終試験の成績 優

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	土岐 朋義 (4DV12003 獣医伝染病学)
学位論文題目	猫伝染性腹膜炎 (FIP) に対する抗ウイルス薬および抗TNF薬の開発
担当者	主査 北里大学教授 佐藤 久聡 副査 北里大学教授 岡野 昇三 副査 北里第一三共ワクチン(株) ワクチン研究所第2研究グループ長 本川 賢司 副査 北里大学准教授 田邊 太志

論文審査の要旨 (3,000 字以内)

猫伝染性腹膜炎(FIP)はコロナウイルス科の猫伝染性腹膜炎ウイルス(FIPV)の感染により引き起こされる致死性のウイルス感染症である。過去40年に渡って、FIPを治療するために国内外で様々な研究が行われてきたが、いまだにFIPに対する有効な治療方法は確立していない。そこで著者は、FIPVの感染様式およびFIPの病態を踏まえて、FIPの治療薬の開発を試みた。

1. I型およびII FIPVの感染を抑制するS1ドメイン由来ペプチドの同定

近年、ウイルス蛋白質由来のペプチドが抗ウイルス薬として注目されている。これらのペプチドはウイルス構成蛋白や細胞上のウイルスレセプターと結合することによりウイルス感染を阻害する。

そこで著者は野外での流行が多いI型FIPVであるKU-2株のS蛋白質S1領域のアミノ酸配列を参考に30種のペプチドを合成し、それらのFIPVに対する感染抑制効果を調べた。まず初めに株化細胞での増殖性が乏しいI型FIPVの感染効率を増加させる方法を検討し、ポリカチオンを含む細胞培養液でウイルスを希釈することでI型FIPVの感染効率が約4倍上昇することを明らかにし、以後の実験ではポリカチオン添加細胞培養液を用いることにした。30種のペプチドのうち、1-S1-8、1-S1-9、1-S1-10、1-S1-16および1-S1-22がKU-2株の感染を有意に減少させた。次に、特に高い感染抑制効果を示した1-S1-9および1-S1-16のI型FIPV株、II型FIPV株、猫ヘルペスウイルス(FHV)および猫カリシウイルス(FCV)に対する感染抑制効果を調べたところ、これらのペプチドはI型およびII型FIPVの感染を特異的に抑制したが、FHVおよびFCVの感染は抑制しなかった。また、1-S1-9および1-S1-16の抗ウイルス活性は、細胞にペプチドを反応後、洗浄することにより減少した。特に1-S1-9はFIPVの細胞への結合を競合的に阻害し、FIPVの感染効率を低下させる可能性が推察された。

2. FIPに対する治療を目的とした抗fTNF- α モノクローナル抗体の開発

近年、FIPの病態悪化にはウイルス感染マクロファージから産生されるfTNF- α が深く関わっていることが報告されている。TNF- α は免疫の誘導に重要なサイトカインであるが、過剰に産生された場合には炎症性免疫疾患を引き起こす。ヒト医学領域では炎症性疾患に対してTNF- α を中和する抗体が治療薬として用いられている。そこで著者はfTNF- α を認識する9種類のモノクローナル抗体(mAb)を作出し、mAbの組換えfTNF- α に対する中

和活性およびIC₅₀ (組換えfTNF- α の細胞傷害活性を50%抑制するmAbの濃度)をWEHI-164細胞に対する細胞傷害試験により測定した。9種類のmAb全てが組換えfTNF- α を中和したので、IC₅₀値と組換えfTNF- α に対する反応性の違いに基づいて3種類のmAbを選抜し、FIPV感染マクロファージ由来の天然型fTNF- α に対する中和活性を測定したところ、mAb 2-4が組換え型および天然型fTNF- α の両方に対して高い中和活性を有することが明らかとなった。そこでmAb 2-4のFIP治療薬としての有効性を確認するため、fTNF- α が関与するFIPの病態悪化をmAb 2-4が抑制できるか否かを*in vitro*の系で検討した。その結果、mAb 2-4はFIP発症猫由来好中球の生存率の増加を抑制するとともに、FIP発症猫で認められるTリンパ球のアポトーシスによる減少を抑制することを確認した。即ち、mAb 2-4はfTNF- α の生理活性を中和することでFIPの病態悪化を抑制することが示唆された。

3. 抗fTNF- α モノクローナル抗体のFIPに対する治療効果

Mab 2-4の*in vitro*系でのfTNF- α 中和活性の確認後、mAb 2-4がFIP発症猫のFIPの症状の緩和および生存率の改善に関与するか否かを調べた。mAb 2-4を投与した猫では3頭中2頭においてFIP症状の改善が認められ、実験終了時まで発症は認められなかった。一方、対照群では3頭全てがFIPを発症した。mAb 2-4を投与した猫では、抗体投与後に血漿中の α 1-酸性糖蛋白質および血管内皮細胞増殖因子濃度の改善が認められ、末梢血リンパ球数の回復も認められた。これらの結果より、抗fTNF- α mAb 2-4がFIPの治療に有効であることが強く示唆された。

4. 抗fTNF- α mAb 2-4のmouse-feline chimeric mAbへの改

変

これまでの結果から、mAb 2-4 (mouse mAb)はFIPの治療薬として有用である可能性が強く示唆されたが、本抗体はマウス由来の抗体であるため、feline anti-mouse antibodyが誘導されることでmAb 2-4のfTNF-alphaに対する反応性が低下する可能性が考えられた。そこで著者はmAb 2-4の可変領域を猫抗体の定常領域に結合させたmouse-feline chimeric mAb (chimeric mAb 2-4)を作製した。chimeric mAb 2-4は、抗猫IgG抗体と反応し、fTNF-alphaに対する中和活性もmouse mAb 2-4と同等であることが確認された。そこで、精製したchimeric mAb 2-4およびmouse mAb 2-4を猫に反復投与し、feline anti-mouse antibody responseの誘導能の変化を調べた。mouse mAb 2-4を投与した猫の血清中にはfeline anti-mouse antibodyが誘導されるとともに、mouse mAb 2-4のfTNF-alphaに対する中和効果が明らかに減弱した。一方、chimeric mAb 2-4を投与した猫においては、feline anti-mouse antibody responseがmouse mAb 2-4を投与した猫と比較して減弱していた。以上の結果から、chimeric mAb 2-4はmouse mAb 2-4よりもFIPの治療薬として有用であることが示唆された。

本論文において著者は抗FIPV活性を有するペプチドを同定するとともに、抗fTNF-alpha mAb 2-4がFIPの治療に有効であることを*in vitro*および*in vivo*で示した。抗TNF-alpha mAbを抗ウイルス薬と併用することでウイルス感染症に対する治療効果が上昇することが既に知られているので、mAb 2-4を単独で治療薬として用いるのではなく、抗FIPVペプチドやこれまでの研究で報告された抗FIPV薬と併用することでFIPに対する治療効果をさらに高めることがで

きると考えられる。これらの知見は未だ治療方法が確立していない
FIPの有効な治療方法の開発に大いに寄与するものと考えられる。

最終試験の結果の 要旨および担当者

学位申請者	土岐 朋義 (4DV12003 獣医伝染病学)
学位論文題目	猫伝染性腹膜炎 (FIP) に対する抗ウイルス薬および抗TNF薬の開発
担当者	主査 北里大学教授 佐藤 久聡 副査 北里大学教授 岡野 昇三 副査 北里第一三共ワクチン(株) ワクチン研究所第2研究グループ長 本川 賢司 副査 北里大学准教授 田邊 太志

成績：優

最終試験の結果の要旨

審査員一同は、論文提出者に対し、平成28年2月19日、その論文内容および関連事項について詳細な質疑を行った。その結果、論文提出者は博士（獣医学）の学位を受けるに相応しい学識と能力を有するものと認め、優と判定した。