

201227011A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス性肝炎に対する  
治療ワクチンの開発に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 25 (2013) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの  
開発に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 25(2013)年 3 月

## ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

### 研究組織

<u>研究代表者</u>		
小原 道法	公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・感染制御プロジェクト	プロジェクトリーダー
<u>研究分担者</u>		
瀬谷 司	北海道大学・大学院医学研究科	教授
保富 康宏	独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター	センター長
鈴木 亮介	国立感染症研究所・ウイルス第二部	主任研究官

# 目次

## I. 総括研究報告

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

小原 道法 .....1

## II. 分担研究報告

1. 組換えワクチニアワクチンの作成及び治療効果の解析

小原 道法 .....9

2. HCV 感染が誘導する免疫エフェクターと病態解析

瀬谷 司 .....15

3. HCV 感染におけるウイルス特異的免疫反応の解析

保富 康宏 .....18

4. C 型肝炎ウイルスのトランスパッケージング型粒子を用いた感染機構の解析

鈴木 亮介 .....29

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....35

IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....41

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
総括研究報告書

ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

研究代表者：小原 道法 東京都医学総合研究所  
感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

**研究要旨：** C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者に対するインターフェロン治療は副作用等の問題も大きく、またB型肝炎ウイルス (HBV) は現在用いられている核酸アナログ製剤では根治が困難である。本研究ではHCV及びHBV特異的免疫賦活化による根治を目指した治療的ワクチンの開発を目的とする。慢性肝炎状態のHCV/Cre-TgにC型肝炎ウイルス遺伝子組換えワクチンHCVN25-RVVを接種したところ治療効果が認められた。また、HCVの外殻蛋白領域遺伝子および非構造蛋白領域遺伝子を組み込んだHCV-DNAワクチンをC57BL/6マウスに免疫したところ、HCVに対する強いCTLの誘導が認められた。C型肝炎モデルマウスにDNAワクチンを投与したところ、肝臓中のHCVコア蛋白発現量が有意に減少し、治療用ワクチンとして有用である可能性が示唆された。さらに、より強く細胞性免疫を誘導する為に、DNAワクチンとワクシニアウイルスを用いたprime/boost法についての検討を行った。さらに、最も効果的なワクチン免疫法を選択し、HCV感染ヒト肝臓型キメラマウスでの治療効果と安全性を検討する。また、HCVtcpを用いて、HCVエンベロープ蛋白質であるE1およびE2に対するモノクローナル抗体あるいはウサギ抗血清の中和活性評価を行うことにより、遺伝子型の異なるHCVtcpに対して中和活性を示すモノクローナル抗体を見だし、パントロピックワクチンエピトープの可能性を示した。

**研究分担者：**

瀬谷司：北海道大学・大学院医学研究科  
教授

保富康宏：独立行政法人医薬基盤研究所・  
霊長類医科学研究センター センター長

鈴木亮介：国立感染症研究所・ウイルス第  
二部 主任研究官

インターフェロン治療は副作用等の問題も大きく、またB型肝炎ウイルス (HBV) は現在用いられている核酸アナログ製剤では根治が困難である。他方で、HCVは感染することにより80%の被感染者が慢性化してしまうが、20%は慢性化せず自己の免疫によりウイルスを排除する。また、HBVに関しては、慢性化した成人において増悪化を契機に自己の免疫により排除する例が知られている。これらのことは、

**A. 研究目的**

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者に対する

免疫を賦活化することによりウイルスのコントロールができる可能性を示唆している。そこで本研究ではHCV及びHBV特異的免疫賦活化による根治を目指した治療的ワクチンの開発を目的とする。

本研究者らは、HCV遺伝子をスイッチング発現できる新規HCVトランスジェニックマウス（HCV Tgマウス）を樹立した。このHCV Tgマウス出生後の任意の時期のHCV蛋白質発現により、持続的なHCV蛋白発現と慢性肝炎発症を引き起こし、HCV感染患者で見られる病態推移を模倣していると考えられる。また、HCVを臓器特異的に発現してウイルスの直接作用も解析できる。よって、このHCV Tgマウスを用い、1) 肝炎ウイルスに対する免疫寛容成立の機序と、2) 免疫寛容の破綻、慢性肝炎の発症機序、ウイルスの直接作用を明らかにし、3) これらの知見を基に、免疫寛容の解除による肝炎ウイルスの排除及び慢性肝炎発症抑制を目指した。

## B. 研究方法

### 研究代表者（小原道法）

HCVN25-RV2 を慢性肝炎状態の HCV/Cre-Tg に接種し、HCV 排除及びその作用機序を解析した。治療効果を評価するために、HCV-RV2s の接種後 1 週および 4 週のマウスにおいて解析した。また、強力な治療効果を得るために DNA ワクチンと rV2 との組み合わせによる prim/boost 法を 8 通り設定して評価を行った。

さらに、炎症性サイトカインの定量、肝臓、脾臓リンパ球での抗原特異的CTLsの検出などの解析を行った。慢性肝炎の病態形成に

TNF- $\alpha$ 、IL-6の関与が示唆されたため、炎症性単球M1マクロファージ（M1M $\phi$ ）やM2マクロファージ（M2M $\phi$ ）の分布変化について解析した。

### 研究分担者（瀬谷司）

DNA 投与の免疫効果は CD4 の Th 1 シフト、NK 活性化、CTL 誘導（cross-priming）で査定した。樹状細胞とマウス脾細胞の混合系でNK, CTL, Th1/2, Th17 などの誘導機能を査定した。NK、CD8 T、CD4 T細胞の枯渇系と Cross-priming 査定系も構築した。

HCV 蛋白の持続発現 Tg マウス（KO-HCV/Cre-Tg）の作製を目指して HCV/Cre-Tg マウスを MAVS<sup>-/-</sup> マウスと交配している。一方、MAVS<sup>-/-</sup>肝細胞の培養系では HCV の複製と蛋白産生が検知できたので、ヒト CD81 を発現させて HCV に罹る肝細胞株を確立した。

### 研究分担者（保富康宏）

HCV遺伝子発現DNAワクチンを作製し、慢性肝炎状態のHCV/Cre-Tgに接種し、HCV蛋白質の排除及びその作用機序を解析した。

- (1) HCV遺伝子発現DNA（HCV-DNA）ワクチンの作製
- (2) 肝臓中のHCVコア蛋白発現量の測定
- (3) ELISPOT法による細胞傷害性Tリンパ球（CTL）誘導能の測定
- (4) HCV蛋白過剰発現腫瘍細胞接種マウスモデルを用いたHCV特異的細胞性免疫誘導能についての評価
- (5) C型肝炎モデルマウスを用いたHCV特異的細胞性免疫誘導能並びに治療効果について

での評価

(6) DNAワクチン投与マウスからの脾臓細胞移入実験

(7) マウス脾臓樹状細胞の機能解析

### 研究分担者（鈴木亮介）

遺伝子型1a、1b、2a、3a由来HCVの遺伝子配列を用い、coreからNS2領域を発現するプラスミドを作製した。一方で、JFH-1株由来のレプリコンプラスミドのレポーター遺伝子部分を、従来から用いている

Firefly luciferaseから、Gaussia

Luciferase (G Luc) に置換したプラスミドを作製した。構造領域発現プラスミドおよびレプリコンプラスミドの2種類を

Huh7.5.1細胞へトランスフェクションしてHCVtcpを作製した。HCVのE1およびE2に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清についての感染中和活性の評価の為に、段階希釈した各種抗体または抗血清とHCVtcpを室温で1時間反応させ、その後ウイルス液をHuh7.5.1細胞に添加し、感染させた。2日後の培養上清のG Lucの活性を測定し、コントロール群と比較する事により、感染中和活性を評価した。

### （倫理面への配慮）

患者由来の組織や血清の使用に当たっては各研究機関の倫理委員会において承認を受ける。提供者には「インフォームド・コンセント」を書面で行う。動物の管理は法律に従って行い、各研究機関の動物実験委員会の承認を得る。

## C. 研究結果

### 研究代表者（小原道法）

(1) 慢性肝炎状態のHCV-Tgマウスに組換えワクチン r VV-N25を単回皮内接種し、接種後1週のTgマウス肝臓では各接種群でHCV蛋白の減少が認められなかったが、4週ではN25接種群が減少していた。またN25接種群では接種後1週で肝臓の索状構造や肝細胞のsteatosisなど、HCV特有の形態学的な異常の正常化が認められた。

(2) より効果的な治療効果を得るために、DNAワクチンとワクシニアウイルスを用いたprime/boost法を8通り行ったところDNA2回とrVV1回がもっとも効果的な組み合わせであった。

(3) N25接種群では、他群と比較し血清IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-12、IL-6などの炎症性サイトカインが抑制されていた。TNF- $\alpha$ とIL-6の中和抗体をTgマウスに投与したところ慢性肝炎像は正常状態に改善していた。

(4) 肝臓内の炎症性サイトカインは主にマクロファージ(M $\phi$ )が生産しており、さらに炎症性単球(IM)およびM $\phi$ に着目して解析を進めたところ、このマウスの肝臓内では一般的な急性炎症部位で多く見られるM1M $\phi$ ではなく、慢性炎症部位に見られる炎症性サイトカイン(IL-6, TNF $\alpha$ )を発現するM2M $\phi$ が優位に存在している事が分かった。

### 研究分担者（瀬谷司）

DNAワクチンは一般にSTING経路を活性化してTh2シフトを誘導するため、CTL、NKの免疫起動には好ましくない。DNAセンサーにはIFN誘導性、非誘導性があり、まだ完全な解明がなされていない。我々は

DNA の細胞内投与で IFN 誘導するのに TBK1 がリン酸化されることが必須であることを樹状細胞で示した。STING, TBK1 の経路が IFN 誘導と Th2 シフトに関与する。この樹状細胞を polyI:C などの Th1 アジュバントを加えて Th1 誘導型に変換することを試みた。DNA と polyI:C の組合せによって NK, CTL が高く誘導されることが判明した。

一方、HCV の複製を許す MAVS<sup>-/-</sup>マウス肝細胞株を樹立した。効率は落ちるが HCV 感染によって NS5A の蛋白産生が確認できた。この細胞株を用いて DNA uptake の効果と免疫（樹状細胞）系への影響を調べている。

### 研究分担者（保富康宏）

(1) ELISPOT 法による HCV-DNA ワクチンの細胞性免疫誘導能についての検討

HCV-DNA ワクチンを投与した C57BL/6 マウスより脾臓を採取し、脾細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞を ELISPOT 法により測定した。HCV-CN2 投与群由来の脾細胞は、顕著に IFN- $\gamma$  を産生することを確認した。さらに、CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 細胞を分離し、HCV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞を測定したところ、HCV-CN2, HCV-N25 の DNA ワクチン共に CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 細胞で HCV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  の産生が認められた。

(2) C型肝炎モデルマウスを用いた HCV 特異的細胞性免疫誘導能並びに治療効果についての評価

HCV-N25 を免疫した C57BL/6 (WT) マウス脾臓から CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 細胞を分離し、HCV 蛋白を発現させた CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup> マウスに投与したところ、両投与群でコア蛋

白発現量の減少が見られたことから、HCV-N25 DNA ワクチンによるコア蛋白発現量の減少に CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> 両細胞が重要な役割を果たしていることが分かった。

(3) CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup> マウスに HCV-DNA ワクチンを投与し、その後、脾臓中の HCV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞を ELISPOT 法により測定したところ、HCV-DNA ワクチン投与群由来の脾細胞の IFN- $\gamma$  産生能は WT マウスを用いた結果に比べ、減弱あるいは消失していた。また、HCV-N25 DNA 投与群の CD4<sup>+</sup> 細胞の HCV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生数は WT マウスと同等の結果が得られたが、CD8<sup>+</sup> 細胞の IFN- $\gamma$  産生数が WT マウスと比べて、抑えられていた。この現象は別種の HCV-Tg マウスである RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>

) /MxCre<sup>(+/-)</sup> マウスに HCV-DNA ワクチンを投与した際も確認された。

(4) HCV-Tg マウスにおける DNA ワクチンの CTL 誘導能減弱についての解析

WT マウスに HCV-N25 DNA ワクチンを投与することで誘導した CTL を WT もしくは CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup> マウスに移入しても、同等数の HCV 特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞が検出された。

(5) DNA ワクチンとワクシニアウイルスを用いた prime/boost 法についての検討

今回の DNA ワクチンの投与方法では、HCV-Tg マウスでは、CD8 T 細胞反応の誘導が減弱しており、より強く細胞性免疫を誘導できるような投与方法として、DNA ワクチンとワクシニアウイルスを用いた prime/boost 法について検討した。CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup> マウスに DNA を投与後、2 週目にワクシニアウイルスを投与し、4 週

目に解析を行った。すると併用することにより、細胞性免疫反応が増強することをELISPOT法により確認した。

#### 研究分担者（鈴木亮介）

レポーター遺伝子をG Lucに置換したレプリコンプラスミドをHuh7.5.1細胞に導入すると、ウイルスゲノム複製により得られるLuciferase活性はFirefly luciferaseを用いた場合よりも約2桁高かった。このレプリコンプラスミドを、様々な株由来のHCV構造領域発現プラスミドと一緒にHuh7.5.1細胞に導入すると、これまでのレプリコンプラスミドでは感染価が認められなかった株においても、HCVtcpの感染性が確認できた。しかし依然として感染性が認められない株も存在した。

次にこれらのHCVtcpを用いて、HCVのE1およびE2に反応するマウスモノクローナル抗体およびウサギ抗血清について感染中和活性を評価した結果、中和活性を持つモノクローナル抗体を見だし、またこのモノクローナル抗体は、遺伝子型の異なる複数の株のHCVtcpに対しても中和活性を示した。

#### D. 考察

3年度は計画通りに研究を実施した。得られた結果をさらに発展させ以下の研究を進める。

##### （小原道法）

rVV-N25の作用機序を調べるために、このマウスにrVV-N25を接種し、接種後の免疫細胞の動きをFACS解析したところ、肝臓

におけるIMおよびMφが減少する事が明らかとなった。rVV-N25による肝臓内のIM, Mφの減少がC型肝炎の正常化に繋がるかどうか調べるために、Mφをクロドロネート(clo)で枯渇させたところ、肝臓の病態が改善し、さらにrVV-N25とCloとの併用でも肝臓の病態が正常化する事が分かった。さらにこの機序について解析を進める。以上のことからHCV-rVVはHCVの排除及び肝炎抑制を目指した安全で効果的な治療ワクチンの開発が期待される。

##### （瀬谷司）

DNAワクチンはDNAセンサーを活性化しますが、その副作用の問題点は未解明である。特にHCV感染における樹状細胞の動態は判っていない。一方、DNA, RNA刺激が異なった免疫応答を起動することは以前から知られていた。近年の進歩はSTING-TBK1の経路、MAVS-TBK1の経路に特有の遺伝子発現の相違があるか、その相違が樹状細胞の活性化状態にどう反映されるか、がDNAワクチンの効果解析の鍵になることを示唆している。HCV感染患者の免疫系にDNAワクチンが有効であるにはTh1シフトとIFN誘導が同時に起きるアジュバントのデリバリーが必要である。本研究はその対策にRNAアジュバントの併用が良いことを示唆した。

IFN誘導経路を欠損したマウス肝細胞株のスクリーニングからMAVS経路とIFNAR経路がHCVの感染抵抗性に関与することが判明した。IFNARと異なり、MAVSはIRF-3のみを活性化して病態への影響が少ない。RNAセンサーのRIG-IがMAVSを活性化するが、RIG-IはRipletによるユビキチン化が必須である。肝細胞とHCVの許容性は検討中

だが、HCV/Cre-TgとRiplet<sup>-/-</sup>交配マウスでHCV感染モデルが作製しうる。

小原のDNAワクチンを患者に実用化する過程でTh2シフトを改善した剤形が免疫応答の誘導には重要となる。我々はpolyI:Cに見られる副作用を極少にしたRNA(Th1)アジュバントの化学合成を進めており、完成すればCTL, NKなどエフェクター効果の高いワクチンアジュバントの提供が可能になる。

#### (保富康宏)

本研究ではHCVに対する免疫反応の解析ならびに免疫療法、治療用ワクチンの開発を試みた。治療用ワクチンは現在では主に癌において試みられており、実用化もされている。治療用ワクチンを考える場合、癌とHCVの大きな違いは癌においては標的となる抗原は限られており、目的とする抗原に対し、如何に強い細胞性免疫を誘導するかということである。一方、HCVのような感染症を考える場合は、まずどの抗原が治療の標的に適しているのか、何故、自然感染では標的抗原に対する免疫反応が十分でないのか等の新たな視点の研究が必要である。本研究ではベクターに対する反応等の複雑な免疫反応を排除し、より抗原特異的な細胞性免疫を主体とした免疫反応を誘導すべくHCV各種遺伝子を用いたDNAワクチンを開発した。

このDNAワクチンとC型肝炎モデルマウスを用いてHCV抗原と免疫反応の検討を行ったところ、特にHCVの非構造蛋白領域を発現するDNAワクチン(HCV-N25)は、マウス肝臓中のHCVコア蛋白発現量を有意に

減少させ、肝細胞の膨化や索状配列の乱れなどの形態学的異常を改善させた(前年度研究より)。しかし、HCV-DNAワクチン投与後の脾細胞のHCV抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生能は減弱あるいは消失しており、HCV蛋白が発現することで免疫抑制の状態になり、強い細胞性免疫が誘導できていないことが考えられる。HCV-Tgマウス由来樹状細胞のCTL誘導能は正常であるが、HCV-Tgマウス体内で樹状細胞からT細胞への、CTL誘導につながるどこかの部分に障害があり、WTマウスに比べてCTL誘導が抑制されていると考えられる。これらの機構が解明されれば、治療用ワクチンのさらなる開発に繋がることが考えられる。

また、HCV-Tgマウス体内でより強く細胞性免疫を誘導できるような投与方法として、DNAワクチンとワクシニアウイルスを用いたprime/boost法について検討したところ、細胞性免疫が増強することを確認した。

#### (鈴木亮介)

HCVレプリコンのレポーター遺伝子をG-Luc遺伝子に置換する事により検出感度が約100倍高まり、従来の方法では感染価が認められなかった株を用いてHCVtcpを作製する事が出来た。これはウイルスのゲノム複製効率や感染性粒子の形成/産生効率が向上したのではなく、レポーターの検出感度の上昇が寄与しているものと考えられた。本研究による複数の遺伝子型/株由来のHCVtcpを用いる事により、迅速、簡便な感染中和アッセイのスクリーニングが可能となり、幅広い遺伝子型に対して活性を示す中和抗体の探索が期待される。

## E. 結論

C型肝炎ウイルス遺伝子組換えワクチン及びDNAワクチンで効果が認められたので、さらに、細胞内免疫活性化剤や構築したHCV-DNAワクチンを併用することで治療効果増強法の検討、抗体価の測定や細胞性免疫応答の解析を行った。HCVの非構造蛋白領域を発現するDNAワクチン（HCV-N25）はC型肝炎モデルマウスを用いた実験の結果より、治療用ワクチンとして有用である可能性が示された。HCV-TgマウスにおけるHCVに対する免疫抑制機構についての解析が進めば、さらにHCV-N25の効果を増強することが期待できる。HCVtcpを、多くの株を用いて作製する事が可能となり、パントロピック中和活性を有するモノクローナル抗体を見いだした。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

各分担研究報告書を参照

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

### 1. 特許取得

1) 出願日：平成24年12月12日、出願番号：特願2012-270987

発明の名称：肝線維症の予防または治療剤  
発明者：公益財団法人東京都医学総合研究所；小原道法、株式会社PRISM Pharma；小田上剛直、小路弘行

出願人：公益財団法人東京都医学総合研究所、株式会社PRISM Pharma

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

組換えワクチニアウイルスの作成及び治療効果の解析

小原 道法 東京都医学総合研究所  
感染制御プロジェクト・プロジェクトリーダー

**研究要旨：**任意の時期にC型肝炎ウイルス(HCV)遺伝子をスイッチング発現するTgマウスを樹立した。このマウスは慢性肝炎、肝線維化を経て肝細胞癌を生じる。このマウスの解析から肝炎の進展にはウイルス蛋白発現よりも炎症性サイトカインが重要であり、さらにワクチン投与により回復させることができる知見を得た。C型肝炎ウイルスに対する抗HCV薬とされているインターフェロンは、病態の進行した患者や高齢者には適用できないことから、より安全で効果的な治療法の開発が急務となっている。我々は哺乳動物細胞において複製可能な弱毒ワクチニアウイルスLC16m 8株を母体としたHCV遺伝子組換えワクチニアウイルス(HCV-rVV)株を複数樹立し、治療ワクチンとしての効果を検討した。また、強力な治療効果を得るためにDNAワクチンとrVVとの組み合わせによるprim/boost法を8通り設定して評価を行った。さらに、慢性肝炎の病態形成にTNF- $\alpha$ 、IL-6の関与が示唆されたため、炎症性単球M1マクロファージ(M1M $\phi$ )やM2マクロファージ(M2M $\phi$ )の分布変化について解析した。

A. 研究目的

C型肝炎は日本で200万人に及ぶ患者がおり、唯一の有効な抗HCV薬とされているインターフェロンは、30-40%程度の患者にしか治療効果が認められず、病態の進行した患者や高齢者には適用できないことから、より安全で効果的な治療法の開発が急務となっている。我々は強力に宿主の免疫応答を惹起し、HCVを排除する目的で、哺乳動物細胞において複製可能な弱毒ワクチニアウイルス「LC16m8株」を母体としたHCV遺伝子組換えワクチニアウイルス(HCV-rVV)株を作製し、治療ワクチンと

しての効果を検討した。病態の進行は、肝臓に常在する骨髄由来の組織マクロファージであるクッパー細胞の活性化に依存し、クッパー細胞から放出される炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ 、IL-6)が慢性肝炎に関与していると考えられている。治療ワクチンの投与と炎症性サイトカインを放出している肝臓内マクロファージに注目して解析した。

B. 研究方法

Cre/loxP システムで HCV 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(Tg マウス)と、IFN 誘導性に Cre を発現する Tg マウ

スを交配させる事で、任意の時期に HCV 遺伝子 (CN2-NS2) をスイッチング発現する Tg マウスを作製した。このマウスは poly(I:C) 投与後にインターフェロン応答性に Cre recombinase を発現し、HCV の構造蛋白質と非構造蛋白質の一部を発現する。HCV 蛋白質発現に伴う正常な免疫応答が発動することで急性肝炎を発症し、その後も持続的な炎症状態が続き、poly(I:C) 投与 3-6 ヶ月後には C 型慢性肝炎の病態 (肝臓の索状構造の乱れ、脂肪化、グリコーゲンの蓄積、繊維化) を発症する事を昨年までに報告してきた。この C 型肝炎モデルマウスに、天然痘に対するワクチン株である LC16m8 株に HCV の非構造領域 (NS2-NS5B) を挿入した組換えワクチニアウイルス (rVV-N25) を接種した。この HCV-RVVs の治療効果を評価するために、接種後 1 週および 4 週のマウスにおいてさらに、抗 CD4, CD8 抗体投与下で上記 1)2) に加え、炎症性サイトカインの定量、肝臓、脾臓リンパ球での抗原特異的 CTLs の検出などの解析を行った。また、強力な治療効果を得るために DNA ワクチンと rVV との組み合わせによる prim/boost 法を 8 通り設定して評価を行った。

慢性肝炎の病態形成に TNF- $\alpha$ , IL-6 の関与が示唆されたため、炎症性単球 M1 マクロファージ (M1M $\phi$ ) や M2 マクロファージ (M2M $\phi$ ) の分布変化について解析した。

(倫理面への配慮)

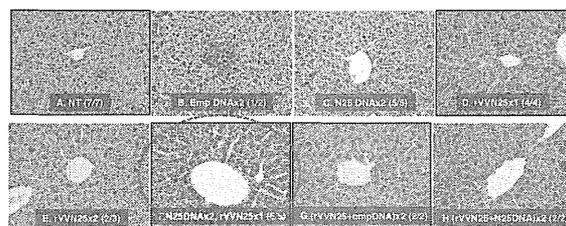
動物実験については、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。また、東京都臨床医学総合研究所動

物実験委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

肝細胞に HCV 蛋白質が発現後、約 2 年にわたり血清 HCV core の上昇が持続し、同時に ALT の上昇を認めた。約 90 日後ではリンパ球の浸潤像、steatosis などの慢性肝炎の所見を肝組織でみとめ、600 日後では雄に有意に肝細胞癌が発症していた。

HCV-rVV-N25 接種後 1 週の Tg マウス肝臓では各接種群で HCV 蛋白質の減少が認められなかったが、4 週では N25 接種群が減少していた。また N25 接種群では接種後 1 週で肝細胞の膨化、索状配列の乱れ、脂肪変性、グリコーゲン変性といった、HCV 特有の形態学的な異常の正常化が認められた。より効果的な治療効果を得るために、DNA ワクチンとワクチニアウイルスを用いた prime/boost 法を 8 通り行ったところ DNA 2 回と rVV 1 回がもっとも効果的な組み合わせであった。

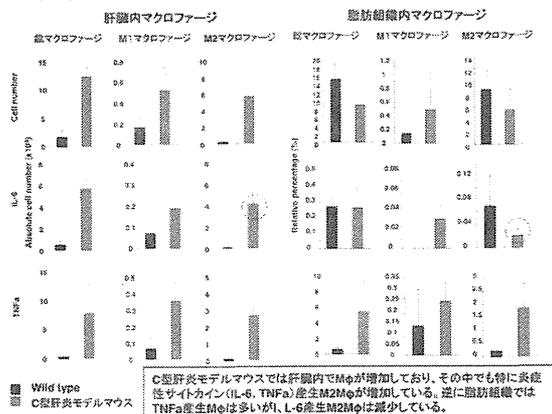


さらに N25 接種群では、他群と比較し血清 IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12, IL-6 などの炎症性サイトカインが抑制されていた。TNF- $\alpha$  と IL-6 の中和抗体を Tg マウスに投与したところ慢性肝炎像は正常状態に改善していた。

肝臓内の炎症性サイトカインは主にマクロファージ (M $\phi$ ) が産生しており、さらに炎症性単球 (IM) および M $\phi$  に着目して解析を進めたところ、このマウスの肝臓内で

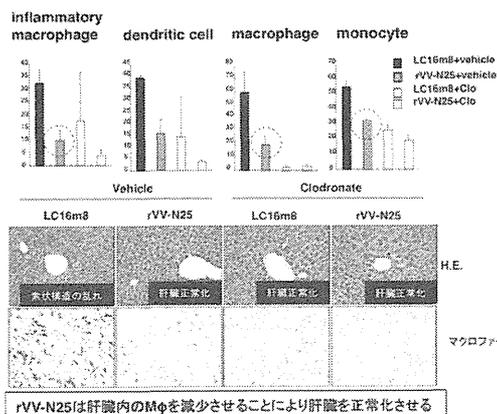
は一般的な急性炎症部位で多く見られるM1Mφではなく、慢性炎症部位に見られる炎症性サイトカイン(IL-6, TNFα)を発現するM2Mφが優位に存在している事が分かった(図1)。

図1. 肝臓と脂肪組織内マクロファージ分布



rVV-N25の作用機序を調べるために、このマウスにrVV-N25を接種し、接種後の免疫細胞の動きをFACS解析したところ、肝臓におけるIMおよびMφが減少する事が明らかとなった。rVV-N25による肝臓内のIM, Mφの減少がC型肝炎の正常化に繋がるかどうか調べるために、Mφをクロドロナート(clo)で枯渇させたところ、肝臓の病態が改善し、さらにrVV-N25とCloとの併用でも肝臓の病態が正常化する事が分かった(図2)。

図2. rVV-N25接種による肝臓内マクロファージ減少



#### D. 考察

C型肝炎の病態(肝臓の索状構造の乱れ、脂肪化、グリコーゲンの蓄積、繊維化)を発症するC型肝炎モデルマウスに、HCV遺伝子組換えワクチニアウイルス(rVV-N25)を接種したところ、接種1週間後で血清中の炎症性サイトカインが低下し、慢性肝炎の病態が正常化する事がわかった。この病態の正常化には肝臓におけるIMおよびMφが減少する事が主要因であることが明らかとなった。

#### E. 結論

肝臓内HCV蛋白の制御に関して、CTLなどによるHCV発現細胞の排除を検討するために、肝臓のHCV遺伝子のスイッチング効率およびHCVのmRNA量をTaqMan法により検索した。その結果、DNAレベルおよびRNAレベルともにコントロールと差がなかった。このことから、rVV-N25接種によるHCV蛋白の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働いていることが示唆された。より効果的な治療効果を得るために、DNAワ

クチンとワクシニアウイルスを用いた prime/boost法を8通り行ったところDNA2回とrVV1回がもっとも効果的な組み合わせであった。

また、慢性肝炎症状の正常化は肝臓におけるIMおよびMφが減少に伴うものであることが示された。以上のことからHCV-rVVはHCVの排除及び肝炎正常化を目指した安全で効果的な治療ワクチンとして開発が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shin-ichiro Nakagawa, Yuichi Hirata, Takeshi Kameyama, Yuko Tokunaga, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Kazuaki Inoue, Akinori Takaoka and Michinori Kohara. Targeted induction of interferon- $\lambda$  in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. PLoS ONE(2013) in press.
- 2) Tsunamasa Watanabe, Fuminaka Sugauchi, Yasuhito Tanaka, Kentaro Matsuura, Hiroshi Yatsuhashi, Shuko Murakami, Sayuki Iijima, Etsuko Iio, Masaya Sugiyama, Takashi Shimada, Masakazu Kakuni, Michinori Kohara, Masashi Mizokami. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut (2012) in press.
- 3) Fumihiko Yasui, Masayuki Sudoh, Masaaki Arai, Michinori Kohara. Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. J. Med. Virol. 85:241-249 (2013).
- 4) Tsunamasa Watanabe, Fuminaka Sugauchi, Yasuhito Tanaka, Kentaro Matsuura, Hiroshi Yatsuhashi, Shuko Murakami, Sayuki Iijima, Etsuko Iio, Masaya Sugiyama, Takashi Shimada, Masakazu Kakuni, Michinori

Kohara, Masashi Mizokami. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- $\alpha$  in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut (2012) in press.

- 5) Yuri Kasama, Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Masaaki Satoh, Zhongzhi Wang, Nagla Elwy, Shinji Harada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocation of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3. Virus Res. 163: 405-409 (2012).
- 6) Makoto Saito, Michinori Kohara, Yuri Kasama and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Hepatitis C virus induces overexpression of 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase through Sp1. J. Med. Virol. 84:733-746 (2012).
- 7) Leiyun Weng; Michinori Kohara; Takaji Wakita; Kunitada Shimotohno; Tetsuya Toyoda. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. Gene 496:79-87 (2012).
- 8) Hideyuki Konishi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Hitoshi Yoshino, Hiroshi Ohmori, Motooki Ashiara, Yuichi Hirata, Atsunori Ohta, Hiroshi Sakamoto, Natsuko Hada, Asao Katsume, Michinori Kohara, Kazumi Morikawa, Takuo Tsukuda, Nobuo Shimma, Graham Foster, William Alazawi, Yuko Aoki, Mikio Arisawa, and Masayuki Sudoh. An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication. Sci. Comm. 2: 259:1-9 (2012).
- 9) Naoko Kubota, Yasutaka Inayoshi, Naoko Satoh, Takashi Fukuda, Kenta Iwai, Hiroshi Tomoda, Michinori Kohara, Kazuhiro Kataoka, Akira Shimamoto, Yasuhiro Furuichi, Akio Nomoto, Akira Naganuma and Shusuke Kuge. HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells. FEBS letter 30:586(16):2318-2325 (2012).

10) Qiang Wang, Shijian Zhang, Hongbing Jiang, Jinalan Wang, Leiyun Weng, Yingying Mao, Satoshi Sekiguchi, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Philippe Buchy, Vincent Deubel, Ke Xu, Bing Sun and Tetsuya Toyoda. PA from an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus activates viral transcription and replication, and induces apoptosis and interferon expression. *Virology Journal* 8;9:106-118 (2012).

11) Yuichi Hirata, Kazutaka Ikeda, Masayuki Sudoh, Akemi Suzuki, Yuko Tokunaga, Leiyun Weng, Masatoshi Ohta, Yoshimi Tobita, Ken Okano, Kazuhisa Ozeki, Kenichi Kawasaki, Takuo Tsukuda, Asao Katsume, Yuko Aoki, Takuya Umehara, Satoshi Sekiguchi, Tetsuya Toyoda, Kunitada Shimotohno, Tomoyoshi Soga, Masahiro Nishijima, Ryo Taguchi, and Michinori Kohara. Self-enhancement of Hepatitis C Virus Replication by Promotion of Specific Sphingolipid Biosynthesis. *PLoS Pathog.* 2012 Aug;8(8):e1002860. Epub 2012 Aug 16. (2012).

12) Jun Aoki, Yuka Kowazaki, Takahiro Ohtsuki, Rumiko Okamoto, Kazuteru Ohashi, Seishu Hayashi, Hisashi Sakamaki, Michinori Kohara and Kiminori Kimura. Kinetics of Peripheral Hepatitis B Virus-specific CD8+ T Cells in Patients with Onset of Viral Reactivation. *J. Gastroenterology* (2012) in press.

13) Leiyun Weng, Xiao Tian, Yayi Gao, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 1820(12):1886-92 (2012).

14) Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshida and Michinori Kohara. Impairment of interferon regulatory factor-1 3 activation by hepatitis C virus core protein

basic region 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 428(4):494-499 (2012).

15) Satoshi Sekiguchi, Kiminori Kimura, Tomoko Chiyo, Takahiro Ohtsuki, Yoshimi Tobita, Yuko Tokunaga, Fumihiko Yasui, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takaji Wakita, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Kyosuke Mizuno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Kouji Matsushima and Michinori Kohara. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS ONE* 7(12):e51656 (2012).

## 2. 学会発表

1) Takano T., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. The International Liver Congress 2012. 4. 18-22 Barcelona (SPAIN)

2) Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in C cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas in vivo. 第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2012. 9. 11-14. 兵庫  
3) 小原恭子, 佐藤正明, 小原道法 : C型肝炎ウイルスの複製に関与する新規宿主因子BGT-1. 第71回日本癌学会学術総会 2012. 9. 19-21. 札幌

4) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., Kohara M. : Self-enhancement of Hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012. 10. 4-11. Venice (Italy)

5) Kimura K., Sekiguchi S., Ohtsuki T., Tokunaga Y., Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. : Immunization with a recombinant vaccinia virus encoding a nonstructural protein of the Hepatitis C Virus suppresses viral protein level in mouse liver. 19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2012. 10. 4-11. Venice (Italy)

6) Yasui F., Sakoda Y., Kida H., Itoh Y., Ogasawara K., Kohara M. : Development of recombinant H5N1 influenza vaccine based

on vaccinia virus vector. 6<sup>th</sup> Vaccine & ISV Congress 2012. 10. 14-16. Shanghai (China)

なし

7) 平田雄一、池田和貴、須藤正幸、徳永優子、田口 良、小原道法 : C型肝炎ウイルスによるスフィンゴ脂質の合成促進とウイルス複製環境の構築. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012. 11. 13-5. グランキューブ大阪 (大阪)

8) 斉藤 誠、飛田良美、棟方 翼、伊藤利紗、菅 裕明、佐々木 亨、窪田規一、小澤 真、小原恭子、小原道法 : 新世代抗体医薬としての特殊環状ペプチドによるインフルエンザウイルス増殖阻害効果. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012. 11. 13-5. グランキューブ大阪 (大阪)

9) 小原道法、大槻貴博、徳永優子、木村公則 : HCV感染による慢性肝炎の病態形成と治療ワクチン 第16回日本ワクチン学会学術集会 2012. 11. 17-18. パシフィコ横浜

10) Yasui F., Munekata K., Itoh Y., Sakoda Y., Kida H., Ogasawara K., Kohara M. : Single immunization with H5N1 influenza vaccine based on recombinant vaccinia virus protects mice and macaques from challenge with H5N1 influenza virus. 第41回日本免疫学会学術集会 2012. 12. 5-7. 神戸国際会議場 (神戸)

11) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Tobita Y., Taguchi R., Kohara M. : Self-enhancement of hepatitis C Virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. 第35回日本分子生物学会年会 2012. 12. 11-14. 福岡国際会議場 (福岡)

12) Kimura K., Sekiguchi S., Otsuki T., Tokunaga Y., Kohara M. : Immunization with a recombinant vaccinia virus encoding a nonstructural protein of the hepatitis C virus ameliorates chronic hepatitis in the liver of transgenic mice. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology 2012. 12. 13-18. Ottawa (Canada)

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

H24 年度厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

ウイルス性肝炎に対する治療的ワクチンの開発に関する研究

瀬谷 司 北海道大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

**研究要旨：**本研究の意義は小原らの作製したC型肝炎マウスモデル（HCV/Cre-Tg）を基に、組み替えワクチニアウイルス株（GMP準拠）のヒト（C型肝炎患者）への治療ワクチンとしての開発を目指すことにある。本年度はHCVのDNAワクチンの作用機構の解明と治療効果を評価するマウスの作製の2点で本企画を支持できれば、これまでのアジュバント開発と相俟ってC型肝炎対策・肝がん対策の免疫創薬に貢献が期待できる。

A. 研究目的

HCV 特異的免疫賦活化による根治治療的ワクチンの開発を目指す。小原らの DNA ワクチンを実効ならしめるアジュバント開発に加えて、DNA センサーが起動する Th2 免疫を Th1 に偏向する方法と評価系作製のためのマウス系を作製することを今年度の目標とする。

B. 研究方法

DNA 投与の免疫効果は CD4 の Th 1 シフト、NK 活性化、CTL 誘導（cross-priming）で査定した。樹状細胞とマウス脾細胞の混合系で NK, CTL, Th1/2, Th17 などの誘導機能を査定した。NK、CD8 T、CD4 T 細胞の枯渇系と Cross-priming 査定系も構築した。

HCV 蛋白の持続発現 Tg マウス（KO-HCV/Cre-Tg）の作製を目指して HCV/Cre-Tg マウスを MAVS<sup>-/-</sup> マウスと交配している。一方、MAVS<sup>-/-</sup>肝細胞の培養系では

HCV の複製と蛋白産生が検知できたので、ヒト CD81 を発現させて HCV に罹る肝細胞株を確立した。

（倫理面への配慮）

本研究は大学等における実験動物の指針に準じて行い、大学の動物実験委員会に申請して承認を得た。

C. 研究結果

DNA ワクチンは一般に STING 経路を活性化して Th2 シフトを誘導するため、CTL、NK の免疫起動には好ましくない。DNA センサーには IFN 誘導性、非誘導性があり、まだ完全な解明がなされていない。我々は DNA の細胞内投与で IFN 誘導するのに TBK1 がリン酸化されることが必須であることを樹状細胞で示した。STING, TBK1 の経路が IFN 誘導と Th2 シフトに関与する。この樹状細胞を polyI:C などの Th1 アジュバントを加えて Th1 誘導型に変換することを試みた。DNA と polyI:C の組合せによって