

201227011B

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 22 年度～24 年度 総合研究報告書

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 22 年度～24 年度 総合研究報告書

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 |

目次

I. 総合研究報告

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（総合）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11

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18

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22

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37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表43

IV. 研究成果の刊行物・別刷53

I. 総合研究報告

平成22年度～平成24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）
総合研究報告書

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。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Cre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスを樹立した。このCre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスの肝臓におけるHCV蛋白は完全に排除されることなく、1年以上の持続的な発現が確認され、肝臓における炎症や脂肪変性、線維化等の慢性肝炎の病態を示した。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-RV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：

二部 主任研究官

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

A. 研究目的

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い。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、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効果的な肝炎ウイルスの排除及び慢性肝炎の正常化を目指した。

本研究の成果は、学術的貢献のみならず肝炎の新たな治療法開発へ道を開き、国民の健康増進につながると共に、肝硬変及び肝癌発症率の低下に伴う医療費削減を介して行政への貢献も可能であると考えられる。

B. 研究方法

研究代表者（小原道法）

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。HCVN25-RVV 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-RVVs 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 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、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- α 、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 ϕ) やM2マクロファージ (M2M ϕ) の分布変化について解析した。

研究分担者（瀬谷司）

HCV 蛋白の高持続発現 Tg マウス (KO-HCV/Cre-Tg) の作製を目指して HCV/Cre-Tg マウスを MAVS^{-/-}、Riplet^{-/-}マウス

と交配中である。一方、Th1 アジュバントとして RNA duplex を想定しており、多くの合成品を作製して機能を検討中である。正常マウスの 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 査定系を構築した。

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-Tg マウスは poly (I:C) を投与後、HCV 蛋白を3ヶ月間持続的に発現
- (2) HCV 遺伝子発現 DNA (HCV-DNA) ワクチンの作製
- (3) ウェスタンブロット法による HCV-DNA ワクチンの HCV 蛋白質発現の確認
- (4) エレクトロポレーションによるマウスへの免疫
- (5) ELISPOT 法による細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 誘導能の測定
- (6) 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
- (7) C 型肝炎モデルマウスを用いた肝臓治療効果についての評価
- (8) DNA ワクチン投与マウスからの脾臓細胞移入実験
- (9) マウス脾臓樹状細胞の機能解析

研究分担者（鈴木亮介）

複数の遺伝子型/株由来の 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

のレプリコン（構造蛋白質領域を欠損し、EMCV-IRES および F luc 遺伝子を挿入したもの）cDNA を polI promoter/terminator 間に挿入したレプリコンプラスミドを作製した。これらの2種類のプラスミドを Huh7.5.1 細胞へトランスフェクションして HCVtcp を作製した。HCVtcp と HCVpp, HCVcc について、Huh7.5.1 細胞への感染における抗 CD81 抗体および抗 ApoE 抗体の影響を調べた。また HCV に対して感受性が高い Huh7 細胞および Huh7.5.1 細胞について、各エンドサイトーシス経路に重要な宿主因子を siRNA によりノックダウンし、HCVtcp 感染後3日目の細胞内のルシフェラーゼ活性を調べる事により、HCV 感染に関わるエンドサイトーシス経路の解析を行った。

さらに 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日後に Luc 活性を測定し、コントロール群と比較する事により、抗体の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 γ , TNF α , 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- α 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 ϕ)が産生しており、さらに炎症性単球(IM)およびM ϕ 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 ϕ 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 α)を発現するM2M ϕ が優位に存在している事が分かった。

研究分担者（瀬谷司）

HCV感染のマウスモデルとしてMAVS $^{-/-}$, Riplet $^{-/-}$ の肝細胞がJ6JFH-1株の複製を許すこと、ヒトCD81を発現させればHCV感受性になることを証明した。肝細胞株でその成果を検証し、培養系のHCV感染実験

を施行している。HCV感染動物モデルとしてKO-HCV/Cre-Tgマウスの発がん頻度がMAVS経路の遮断で上がるかを検討する。

次にDNAワクチンがTh2シフトを誘導し、CTL, NKを強く活性化し難いことを見出した。この問題を克服するため、C型肝炎患者に害のないTh1アジュバントを合成することを試みた。多くの候補からRNA duplexの特異な2次構造を持つ試作品を得、現在化学合成を施行している。

In vitro合成物にはNK活性化、CTL誘導に有利な物質があり、これをDNAワクチンと併用して効果の改善が果たせるかを検討予定である。なお、DNAの単独投与はSTING経路を活性化するため、この経路とTh2指向性の関係を検証している。

Cross-primingアッセイでTh1からCTLを誘導する機構についてもHCVが誘導する宿主蛋白の機能修飾を含めて検討中である。

研究分担者（保富康宏）

（1）HCV遺伝子発現DNA(HCV-DNA)ワクチンの作製:各種HCV-DNAワクチン(HCV-CN2, HCV-N25, empty)を作製した。

（2）HCV蛋白の発現確認:作製したHCV-DNAワクチンをCOS7細胞に導入し、ウエスタンブロット法によりCore蛋白質の発現が見られることを確認した。

（3）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- γ 産生細胞をELISPOT法により測定した。HCV-N25投与群では、EL-4/E2, /NS2, /N3-4A細胞による刺激後に、

顕著に IFN- γ を産生することを確認した。さらに、脾臓より CD8⁺、CD4⁺細胞を分離し、HCV 抗原特異的 IFN- γ 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⁺、CD4⁺細胞で HCV 抗原特異的 IFN- γ の産生が認められた。

⁵¹Cr遊離法によるCTL誘導の検討では、細胞傷害活性が認められた。

(4) HCV蛋白発現腫瘍細胞接種マウスを用いた *in vivo*におけるHCV特異的細胞性免疫誘導能の評価：HCV-DNAワクチンを投与したC57BL/6マウスに、HCV蛋白発現腫瘍細胞をマウス側腹部皮下に移植し、腫瘍の大きさを評価したところ、HCV-DNAワクチン投与群で有意に減少した。また、生存率は、HCV-DNAワクチン投与群で有意に上昇した。

(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の評価：HCV蛋白を3ヶ月間持続的に発現させたCN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスにHCV-DNAワクチンを投与し、肝臓中のHCVコア蛋白発現量を測定したところ、肝臓中コア蛋白発現量が有意に減少していることを確認した。このコア蛋白発現量の減少にはCD8⁺、CD4⁺両細胞が重要な役割を果たしていることが分かった。

また、肝臓の形態学的検索を行ったところ、HCV-N25 投与群において肝臓組織の異常が改善されることを確認した。

しかし、CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)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- γ 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- γ 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ることを確認した。さらに、脾臓より CD8⁺、CD4⁺細胞を分離し、IFN- γ の産生を測定したところ、HCV-CN2 DNA 投与群では、CD8⁺、CD4⁺両細胞で HCV 特異的 IFN- γ の産生がみられなくなった。また、HCV-N25 DNA 投与群の CD4⁺細胞の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生数は WT マウスと同等の結果が得られたが、CD8⁺細胞の IFN- γ 産生数が WT マウスと比べて、抑えられていた。これらの現象は別種の HCV-Tg マウスである RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスに HCV-DNA ワクチンを投与した際も確認された。

(6) 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^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスに移入しても、同等数の HCV 特異的 IFN- γ 産生細胞が検出されることから、成熟した CTL の IFN- γ の産生を抑制する機構が WT マウスと異なり HCV-Tg マウスに特別存在している可能性はないと考えられる。

次に、CTL 誘導能の減弱は樹状細胞の機能低下によるものである可能性が考えられたので、樹状細胞の CTL 誘導能についての検討を行った。WT、RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスから脾臓樹状細胞を取り出し HCV-NS3 のペプチドをパルスし、WT もしくは RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスに移入する実験を行ったところ、WT マウスに移入した際は、WT、ならびに RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)由来樹状細胞は、共に同程度の CTL を誘導できることから、両者の脾臓樹状細胞の CTL 誘導能に差が無いことを確認した。し

かし、レシピエントを RZCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスにしたところ、WT、ならびに RZCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-) 由来樹状細胞による CTL の誘導は、WT をレシピエントにした時と比べて、大幅に減弱した。

(7) 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^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに HCV-DNA ワクチンを投与した後、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 法により確認したが、肝臓中のコア蛋白発現量については、HCV-N25 DNA ワクチン 2 回投与群に比べて減少する傾向が見られたものの、有意差は無かった。

研究分担者（鈴木亮介）

遺伝子型 1a、1b、2a、3a 由来の構造蛋白質を用いた HCVtcp の産生が認められた。HCVtcp と HCVpp、HCVcc について、抗 CD81 抗体および抗 ApoE 抗体による感染中和を調べたところ、抗 CD81 抗体は HCVtcp、HCVpp および HCVcc の感染を中和したが、HCVtcp と HCVcc は HCVpp に比べて著しく高い感受性を示した。また抗 ApoE 抗体は HCVtcp と HCVcc の感染を中和したものの、HCVpp の感染は中和しなかった。

エンドサイトーシス経路の解析では、ク

ラスリン依存性およびカベオリン依存性エンドサイトーシスに関与する 3 つの分子（クラスリン、カベオリン、ダイナミン）のノックダウンを行った。Huh7 細胞ではクラスリンおよびダイナミンのノックダウンにより HCVtcp 感染の抑制が認められた。しかしながら Huh7.5.1 では感染の抑制は認められなかった。マクロピノサイトーシスに関与する 2 つの宿主因子（PAK1 および CTBP1）をノックダウンしても Huh7.5.1 では感染の抑制は認められなかった。

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いだした。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 M ϕ が減少する事が明らかとなった。rVV-N25 による肝臓内の IM、M ϕ 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、M ϕ 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)

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。このMAVS^{-/-}系は今後のHCV発がんモデル実験の試金石になる。本MAVS^{-/-}マウス肝細胞株を使って肝炎患者からウイルス分離ができればIFNのバイアスの無いウイルス株を抽出しうる。本研究のHCV/Cre-Tgと自然免疫改変モデルマウスが以上の解析に有益であり、更に発がんのリスク因子の解明にも貢献するかもしれない。

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。我々のRNAアジュバントはこの目的に合致する。現在の試供品が化学合成できればCTL、NKなどエフェクター効果の高いワクチンの提供が可能になる。副作用などの有害事象を排除した最善の剤形について今後の検討が必要である。

DNAワクチンはDNAセンサーを活性化する。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。この点を自然免疫の分子機構として解明することは重要なのでヒトへの投与前に解析を進める必要がある。

(保富康宏)

HCV感染症は肝炎から、肝硬変、肝癌へ

と進行する慢性感染症疾患である。現在用いられている治療法においても治療効果を得られない患者は多く、新規の治療法、治療薬の開発は急務となっている。一方、HCVが病態を進行させるには極めて長い期間が必要であり、生涯を通じてHCVをコントロールし、寛快される例も存在することから、適切な免疫反応を強く誘導すれば治療に結びつく可能性があると考えられる。これらのことから、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。しかし、HCV-DNAワクチン投与後の脾細胞のHCV抗

原特異的 IFN- γ 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が、WT マウスに投与した際に誘導される細胞性免疫に比べれば大幅に減弱しており、今後さらに投与方法などの検討を行いたい。

(鈴木亮介)

HCVtcp と HCVpp は粒子構造や感染機構が異なる事から、細胞侵入過程においても違いがある可能性が示唆された。HCVtcp は HCVpp のように他のウイルス蛋白を利用しておらず、また HCV が増殖可能な肝臓由来の細胞で作製する事から、HCVpp に比べてより HCV 本来の性質を反映した解析ツールであると考えられた。

この HCVtcp を用いて細胞侵入経路の解析を行ったところ、Huh7 細胞ではクラスリン依存性エンドサイトーシス経路によって細胞侵入するが、Huh7.5.1 細胞においては、クラスリン依存性およびカベオリン依存性

エンドサイトーシスではなく、またマクロピノサイトーシス経路でもない、他の経路によって細胞侵入している可能性が示唆された。

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になり、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

HCVpp に比べて、より HCV 本来の性質を反映した解析ツールと考えられる HCVtcp を、多くの株を用いて作製する事が可能となった。これらを用いた細胞侵入経路の解析により、従来報告されているクラスリン依存性エンドサイトーシスに加え、HCV がクラスリン非依存性エンドサイトーシス経路により細胞侵入している可能性が示唆された。また、抗体の感染中和活性の評価を行い、中和活性を有するモノクローナル抗体を見いだした。

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) 発明の名称：新規組換え型ヒトC型肝炎ウイルス様粒子とその産生方法

出願人：国立感染症研究所、財) 東京都医学研究機構、東レ株式会社

発明者：脇田隆宇、石井孝司、鈴木哲朗、鈴木亮介、宮村達男、田邊純一、曾根三郎
特許番号：1930416、登録国：E P。

3) 発明の名称：C型肝炎ウイルス粒子高生産系

発明者：脇田隆宇、石井孝司、鈴木哲朗、鈴木亮介、宮村達男、田邊純一、曾根三郎

特許番号：1956087、登録国：E P

出願日：平成23年8月31日、出願番号：特願2011-189251

4) 出願日：平成22年9月9日、出願番号：「特願2010-202355」、発明の名称：

「難治性ウイルス感染症の治療剤」、発明者：小原道法、中川慎一郎、出願人：東京都医学研究機構

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担(総合)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：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「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）株を樹立し、治療ワクチンとしての効果を検討した。また、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Cre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスを樹立した。Cre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスの肝臓におけるHCV蛋白は完全に排除されることなく、1年以上の持続的な発現が確認され、肝臓における炎症や脂肪変性、線維化等の慢性肝炎の病態を示した。この慢性肝炎モデルマウスに対してHCV-RVV接種1週後のTgマウス肝臓ではN25接種群では肝臓の索状構造や肝細胞の状態など、形態学的な異常の正常化が認められた。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。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- α 、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（M1 ϕ ）やM2マクロファージ（M2 ϕ ）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 α 、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。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-a, IL-6 の関与が示唆されたため、炎症性単球 M 1 マクロ

ファージ (M1M ϕ) や M2 マクロファージ (M2M ϕ) の分布変化について解析した。

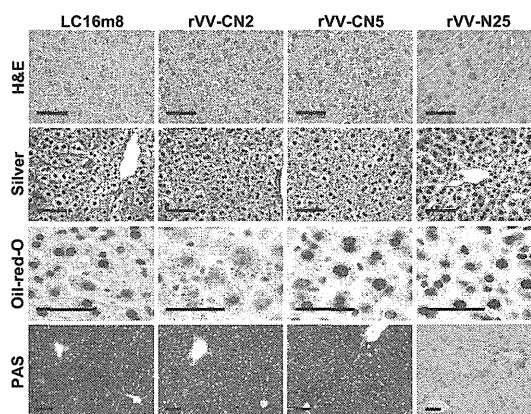
(倫理面への配慮)

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

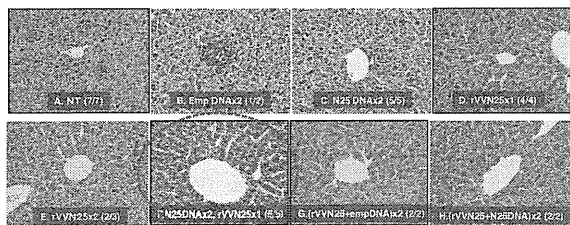
肝細胞にHCV蛋白が発現後、約2年にわたり血清HCV coreの上昇が持続し、同時にALTの上昇を認めた。約90日後ではリンパ球の浸潤像、steatosisなどの慢性肝炎の所見を肝組織でみとめ、600日後では雄に有意に肝細胞癌が発症していた。

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DNA2回

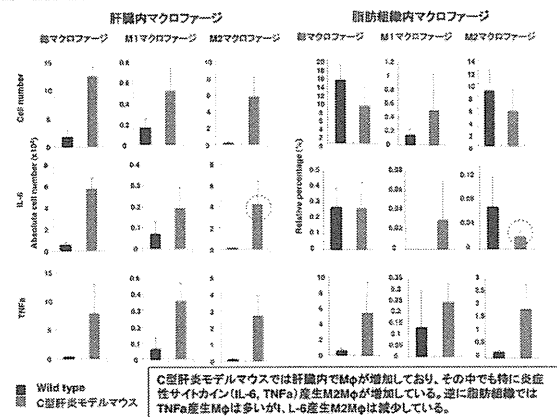
とrVV1回がもっとも効果的な組み合わせであった。



さらにN25接種群では、他群と比較し血清IFN γ , TNF α , 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- α 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 ϕ)が産生しており、さらに炎症性単球(IM)およびM ϕ 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 ϕ 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 α)を産生するM2M ϕ が優位に存在している事が分かった(図1)。

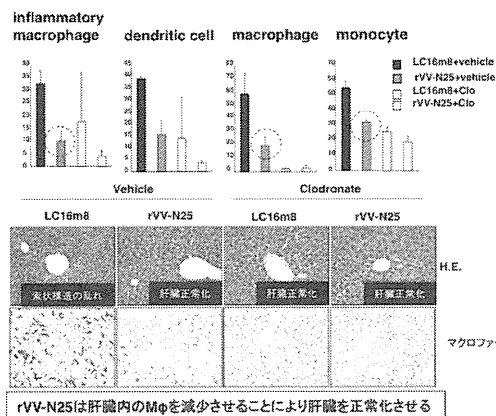
図1. 肝臓と脂肪組織内マクロファージ分布



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M ϕ が減少する事が明

らかとなった。rVV-N25による肝臓内のIM, M ϕ 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、M ϕ をクロドネート(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(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週間後で正常化した。このときに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M ϕ 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- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. PLoSONE(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- α 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- α 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. Translocase 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 β -hydroxysterol Δ 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).

16) Kayo Yoshikawa, Aya Ogata, Chiho Matsuda, Michinori Kohara, Hideo Iba, Yukio Kitade, Yoshihito Ueno. Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance. *Bioconjugate Chemistry* 22:42-49 (2011).

17) Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. *Arch. Virol.* 156:295-304 (2011).

18) Kiminori Kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89:433-442 (2011).

19) Takashi Takano, Michinori Kohara, Yuri Kasama, Tomohiro Nishimura, Makoto Saito, Chieko Kai, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response. *J. Med. Virol.* 83:801-809 (2011).

20) Kiminori Kimura, Michinori Kohara. *Frontiers of Model Animals for Human Diseases. Experimental Animals* 60(2), 93-100 (2011).