

B型肝炎における自然免疫応答の解明

高橋 健 京都大学医学部附属病院消化器内科 助教

**研究要旨：**B型肝炎ウイルス（HBV）のcccDNAは宿主の核内に長期にわたり安定して存在し、ウイルスRNA産生のための鋳型として機能する。cccDNAは現在の抗HBV治療薬の要である核酸アナログ製剤では駆除できず、cccDNAの存在こそがHBVの完全排除が困難な大きな原因となっている。cccDNAの制御と排除のための新たな治療法を確立するには、免疫系によるcccDNAの制御機構の解明が重要であるが、現在は不明な点が多い。そこで本分担研究ではHBV感染における宿主免疫応答、特に自然免疫の役割解明を目的とし、最終的にcccDNA排除のための新たな治療法開発へつなげる。

A. 研究目的

従来よりB型肝炎においては、C型肝炎と異なり、ウイルス認識によるI型インターフェロン誘導などの自然免疫応答がみられないと考えられてきたが、HBV感染における自然免疫の役割は獲得免疫のそれと比較して未だ十分に解明されているとはいえない。そこで本研究ではHBV感染における自然免疫応答の有無やその活性化機構の解明を目的とする。

B. 研究方法

ヒト急性肝炎と慢性肝炎の急性増悪例を対象とし、各症例における末梢血単核球を経時的に分離採取しRNA抽出を行った。これらのサンプルを用いてマイクロアレイ解析(Agilent Technologies, SuperPrint G3 Human GE 8x60K Ver. 2.0)を行い、それぞれの症例内での経時的な遺伝子発現プロファイルを解析した。

(倫理面への配慮)

診療目的の血液検体で検査値取得後の残検体を用いるため、研究のみを目的とした侵襲的な処置は行わない。患者より説明の上同意を取得し、かつ検体の匿名化を行う。

C. 研究結果

急性・慢性症例ともに、肝炎増悪期にはIFN誘導性遺伝子をはじめとする多くの自然免疫関連分子が発現誘導もしくは抑制されていた。また、急性肝炎症例で特徴的なこととしては、病原体受容体として知られる複数のToll-like receptorの発現亢進が確認された。

D. 考察

上述のB型肝炎と自然免疫の関係を解析した先行研究はチンパンジーを用いた実験結果であり、ヒトとの結果に乖離がある可能性がある。また、当時のassayの感度の

問題から本研究でみられた分子が検出されなかった可能性もある。獲得免疫活性化には自然免疫の働きかけが必須であり、B 型肝炎においても他のウイルス感染同様に獲得免疫活性化が生じることを考えると、今回の研究結果からは B 型肝炎においても一定のレベルで自然免疫応答が誘導されているものと考察される。

#### E. 結論

従来一般に受け入れられてきた B 型肝炎での自然免疫応答の欠如とは異なり、HBV も未知の機序で宿主に認識され、自然免疫系が作動している可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, **Takahashi K**, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One*. 7(4):e35052, 2012.

2) **Takahashi K**, Marusawa H, Chiba T. Large-scale identification of effector genes that mediate the type I interferon antiviral response. *Gastroenterology*. 142(1):178-80, 2012.

##### 2. 学会発表

1) 高橋健, 那須章洋, 丸澤宏之. C型肝炎ウイルス薬剤耐性クローンの次世代ゲノムアナライザー解析 JDDW 2012, 神戸シンポジウム (口演発表)

#### 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

特になし

B型肝炎ウイルス感染が宿主の細胞周期および  
アポトーシスに与える影響の解析

加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

**研究要旨：**B型肝炎ウイルス（HBV）の複製モデルを用い、HBV複製が宿主細胞の細胞周期とアポトーシスに与える影響を解析した。HBV複製モデルのコンストラクトを培養細胞に遺伝子導入しHBVの複製を確認した。HBVが複製している細胞ではS期の分画が減少し、ウイルス複製が細胞周期を停止させる方向に作用していると考えられた。遺伝子型の異なる株のコンストラクトを用いて検討したところ、この細胞周期に与える影響は遺伝子型で差を認めなかった。またアポトーシスについても検討を行った。遺伝子型C株のコンストラクトの遺伝子導入では宿主細胞にアポトーシスが誘導されたが、遺伝子型Bj株の遺伝子導入ではアポトーシスは認めず、HBV複製によるアポトーシス誘導は遺伝子型により異なっていると考えられた。さらに遺伝子型Bj株を遺伝子導入した細胞ではアポトーシス刺激に対する反応性も低下していたことから、遺伝子型Bj株の複製細胞はアポトーシス抵抗性であると考えられた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）は血液中のウイルス粒子内では不完全2本鎖DNAとして存在している。肝細胞に感染すると核内で完全2本鎖となり、covalently closed circular DNA（cccDNA）と呼ばれる閉環らせん状のDNAとして存在する。このcccDNAは、B型肝炎寛解後、血中にHBs抗原やHBV-DNAが検出されない状態でも肝細胞内に存在し、免疫能が低下した時などにHBVが再活性化し肝炎が再燃する事が知られている。従って、B型肝炎の根本的治療にはcccDNAの排除が必要であるが、現行治療で用いられている核酸アナログなどの薬剤ではcccDNAを排除することは難しく、

cccDNAが存在する肝細胞を免疫機構により排除することが必要である。

そこで本研究では、HBVの培養細胞での複製モデルを用い、HBV複製が宿主細胞の細胞周期やアポトーシスに与える影響の解析を行った。さらに培養細胞でHBVが複製している状態でアポトーシスを誘導し、HBV感染細胞の免疫細胞によるアポトーシス誘導への抵抗性も評価した。

B. 研究方法

培養細胞での複製とウイルス粒子生成が可能な1.25倍長のHBVゲノムを持つコンストラクトを作製した。遺伝子型CとBjのコンストラクトを用い、HuH-7細胞に遺伝子

導入しHBVの複製をサザンブロットで確認した。遺伝子導入後、HBV陽性細胞と陰性細胞を抗HBc抗体による染色により選別し、HBV陽性細胞と陰性細胞それぞれで細胞周期の分画について比較検討を行った。また、アポトーシスは抗cleaved PARP抗体による染色で評価し、HBV陽性細胞と陰性細胞それぞれでアポトーシスシグナルの強度を測定する事でHBV複製がアポトーシスに与える影響を評価した。さらに遺伝子導入細胞をTNF- $\alpha$ とアクチノマイシンDで処理することによりアポトーシスを誘導し、HBV複製が免疫細胞により誘導されるアポトーシスに与える影響を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株およびHBV株であり倫理面での問題はない。HBV複製モデルに用いたHBV株は患者血清中から分離された物であり大臣確認実験にはあたらない。

## C. 研究結果

1.25 倍長の HBV ゲノムを持つコンストラクトの HuH-7 細胞への遺伝子導入により、約 30~50%の細胞が HBV 陽性となった。さらにサザンブロッティングによりこれらの細胞での HBV 複製を確認した。

これらの細胞を抗 HBc 抗体染色により HBV 陽性細胞と陰性細胞に分け、それぞれで細胞周期分画を比較したところ、HBV 陽性細胞では陰性細胞に比べ S 期の分画が低下しており、HBV の複製により細胞周期が停止していると考えられた。この HBV 複製による細胞周期分画の変化は遺伝子型 C 株と Bj 株で差を認めず、遺伝子型に関わら

ず HBV の複製は細胞周期の停止を引き起こすと考えられた。

さらに HBV の複製がアポトーシスに与える影響についても検討を行った。遺伝子型 C 株の陽性細胞では陰性細胞に比べ抗 cleaved PARP 抗体のシグナル強度が強く、このウイルスの複製によりアポトーシスが誘導されていると考えられた。しかし、このアポトーシス誘導は遺伝子型 Bj 株の陽性細胞では認めず、HBV 複製によるアポトーシス誘導は遺伝子型 Bj 株に比べ C 株で強いと考えられた。

また、HBV 複製細胞に対する TNF- $\alpha$  とアクチノマイシン D 刺激によるアポトーシス誘導においても、HBV 遺伝子型 C 株を導入した細胞では十分なアポトーシスが誘導されていたが、HBV 遺伝子型 Bj 株を導入した細胞ではアポトーシスのシグナル強度が低く、遺伝子型 Bj 株が複製している細胞ではアポトーシス抵抗性になっていると考えられた。

## D. 考察

HBV の培養細胞での複製モデルを用い、HBV 感染が宿主細胞の細胞周期、アポトーシスに与える影響を解析した。細胞周期については遺伝子型 C 株、Bj 株ともに HBV の複製が細胞周期を停止する方向に作用し、遺伝子型による差は認めなかった。アポトーシスに関しては、遺伝子型 C 株に比べ Bj 株では複製によるアポトーシスの誘導が抑制され、さらにアポトーシス刺激に対する反応性も低く、遺伝子型 Bj 株の複製細胞はアポトーシスに対し抵抗性になっていると考えられた。

## E. 結論

今回の検討により、HBV 感染が免疫細胞によるアポトーシス誘導に対し抵抗性を示し、その抵抗性はHBV の遺伝子型により差がある事が明らかとなった。今後、さらに多くの株を用いた検討を行い、アポトーシス抵抗性に関与するウイルスゲノムの領域や蛋白質、それに関わる変異などを同定し、HBV の感染排除回避機構の解明を行いたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara-Sugano M, Masaki T, Kim S, Wakita T, Mishiro S and Kato T. A subclone of HuH-7 with enhanced intracellular hepatitis C virus production and evasion of virus related-cell cycle arrest. PLoS One 7 (12), e52697, 2012.

### 2. 学会発表

なし

## 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

特になし

cccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発：抗原およびT細胞受容体の同定

村口 篤 富山大学大学院医学薬学研究部（医学）免疫学 教授

**研究要旨：**HBV はウイルスゲノムとして不完全環状二本鎖DNAを持っているが、肝細胞に侵入すると、ウイルス遺伝子が肝細胞の核内に移動し、不完全環状二本鎖DNA は完全閉鎖二本鎖DNA（cccDNA）に転換される。HBVの慢性感染状態では、複製中間体であるcccDNA は肝細胞核内に、ミニ染色体として存在する。我々は、本研究班において、cccDNAを持つ肝細胞に対する免疫の状態を明らかにするために、cccDNA感染細胞に反応するT細胞を同定し、そのT細胞レセプター（TCR）およびその標的抗原の同定を行う。平成24年度は、抗原特異的TCRの取得に必要な技術開発を行った。すなわち、モデルシステムとして、HLA-A24陽性のボランティアの末梢血リンパ球の中より、EBウイルス（EBV）特異的T細胞を検出し、そのTCRを取得することを試みた。EBV特異的T細胞は、EBV由来ペプチド／HLA-A24分子複合体四量体のT細胞への結合、あるいは、抗原刺激特異的なIFN- $\gamma$ の分泌を指標に検出・回収し、回収した単一T細胞よりRT-PCR法により、TCR cDNAを増幅し、解析した。その結果、回収した細胞の約5～8割の細胞から抗原特異的TCRを取得することができた。さらに取得したTCRを健常人末梢血リンパ球に発現させることで、抗原特異的に細胞傷害活性を誘導できることを示した。以上の結果より、本技術がHBV特異的TCRの解析・取得に応用できることを確認した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）のcccDNAは、ウイルスcoreタンパクに加え、histoneや他の核タンパクとminichromosomeを形成して核内に存在し、現行の抗ウイルス治療に抵抗性である。B型慢性肝炎の治療においては、HBVの再活性化を制御することが重要であり、そのためにはcccDNA感染細胞に対する宿主の免疫応答を制御することが重要である。本研究班では、最先端の免疫学的技術を用いて、cccDNAを制御し、さらに排除することを目標に、cccDNA感染細胞に対

する免疫監視機構の研究、および免疫治療法の開発を行う。我々は、cccDNA感染細胞に対する免疫応答を明らかにするために、標的とする抗原およびTCRを同定する。平成24年度は、抗原特異的TCRの取得に必要な技術開発を行った。

B. 研究方法

モデルシステムとして、HLA-A24 陽性のボランティアの末梢血リンパ球より、EBV特異的T細胞を検出し、そのTCRを取得することを試みた。EBV特異的T細胞は、

EBV 由来ペプチド/HLA-A24 分子複合体四量体の T 細胞への結合、あるいは、EBV ペプチド刺激特異的な IFN- $\gamma$ の分泌を指標に、フローサイトメータを用い検出し、回収した。回収した単一の細胞より RT-PCR 法により、TCR cDNA を増幅し、それを TCR 陰性の T 細胞株 (TG40) に遺伝子導入し、TCR を細胞表面に発現させた。取得した TCR が EB ウイルス特異的か否かは、ペプチド/MHC 四量体による染色により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究を進めるにあたり、研究計画等を富山大学倫理審査委員会に諮り、承認を得た。ボランティアは本学研究室内から募り、インフォームドコンセントを得た上で、末梢血 20 mL を採血し、研究に用いた。

### C. 研究結果

HLA-A24 陽性のボランティア 10 人の末梢血より、EBV 特異的 T 細胞を同定・回収し、TCR cDNA を増幅した。その結果、回収した細胞の 12%~72%の細胞から TCR  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖をペアで取得することができた。取得した TCR cDNA を発現ベクターに導入し、TG40 細胞に遺伝子導入し、細胞表面に発現した TCR の抗原特異性を解析した結果、全体で 444 個の EBV 特異的 TCR を取得することができた。抗原特異的 T 細胞を同定・回収してから、取得した TCR の抗原特異性を検証するまでの期間は、最短 10 日間であり、一人あたり約 10~90 個の抗原特異的 TCR を取得することができた。TCR のレパートリー解析を行った結果、末梢血中の EBV 特異的 T 細胞は oligo-

clonal であり、少ない人で 1 種類、多い人でも 10 種類程度であり、限定されたクローンが優先的に増殖していることがうかがえる。また、EBV 由来ペプチド/HLA-A24 分子複合体四量体の結合を指標に EBV 特異的 T 細胞を検出した場合と、IFN- $\gamma$ の分泌を指標に EBV 特異的 T 細胞を検出した場合とで、ほぼ同じ TCR レパートリーが検出された。さらに、取得した TCR を末梢血リンパ球に発現させたところ、EBV ペプチド特異的に標的細胞を傷害することが示された。

### D. 考察

1 個の T 細胞から 2 種類の TCR  $\alpha$  鎖あるいは  $\beta$  鎖が取得できる場合があった。時には、抗原特異性を示す TCR ではなく、抗原特異性を示さない TCR の cDNA が優先的に増幅されることがあり、TCR cDNA を取得した時、抗原特異的 TCR を見逃さないように、慎重に TCR の機能を評価する必要がある。

末梢血 T 細胞に TCR 遺伝子を発現させた場合、元々の T 細胞に発現している内因性の TCR とミスペアリングを起こすため、導入した抗原特異的 TCR の発現が低い傾向が観察された。今後、取得した TCR の臨床への応用を考えた場合、TCR の導入効率・発現効率をさらに向上させる技術・方法を開発する必要がある。

今後、cccDNA 感染細胞特異的 TCR を取得していくには、cccDNA 感染細胞刺激によるサイトカインの分泌等を指標に T 細胞を同定する方法を確立していく必要がある。

## E. 結論

我々が開発した方法 (hTEC10 システム) は、非常に短期間で、非常に効率良く抗原特異的 TCR を取得できることを示すことができた。今後、cccDNA 感染細胞特異的 T 細胞を同定し、その TCR を取得していく際の強力なツールとして使用できることが確認された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ozawa T., Piao X., Kobayashi E., Zhou Y., Sakurai H., Andoh T., Jin A., Kishi H, and Muraguchi A.: A novel rabbit immunospot array assay on a chip allows for the rapid generation of rabbit monoclonal antibodies with high affinity. PLoS ONE, 7: e52383, 2012.
- 2) Sun X., Saito M., Sato Y., Chikata T., Naruto T., Ozawa T., Kobayashi E., Kishi H., Muraguchi A., and Takiguchi M.: Unbiased analysis of TCRA/b chains at the single-cell level in human CD8<sup>+</sup> T-cell subsets. PLoS ONE, 7: e40386, 2012.
- 3) Ozawa T., Horii M., Kobayashi E., Jin A., Kishi H., and Muraguchi A.: The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-Cb antibody. Biochem. Biophys. Res. Commun., 422: 245-249, 2012.

### 2. 学会発表

- 1) 小林栄治, 水腰英四郎, 岸 裕幸, 小澤龍彦, 浜名 洋, 長井輝美, 金 艾順, 金子周一, 村口 篤: 抗原特異的

T 細胞受容体遺伝子の超迅速クローニングシステムの構築. 第16回日本がん免疫学会総会, 2012, 7, 26-28, 札幌.

- 2) 水腰英四郎, 北原征明, 伏見一美, 中本安成, 松井 修, 向田直史, 松島綱治, 小林栄治, 岸 裕幸, 村口 篤, 金子周一: 肝細胞がんに対する免疫療法の開発. 第16回日本がん免疫学会総会, 2012, 7, 26-28, 札幌.
- 3) 岸 裕幸, 小林栄治, 水腰英四郎, 小澤龍彦, 金子周一, 村口 篤: がんの TCR 遺伝子治療にむけた候補 TCR 遺伝子の迅速クローニング法. 第71回日本癌学会学術総会, 2012, 9, 19-21, 札幌.
- 4) Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Hamana H., Nagai T., Ozawa T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., and Muraguchi A.: A novel human TCR efficient cloning system confers candidate for TCR gene therapy within 10 days. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer, 2012, 10, 26-28, North Bethesda, USA.
- 5) 岸 裕幸, 金 艾順, 小林栄治, 小澤龍彦, 浜名 洋, 村口 篤: Detection of antigen-stimulated cytokine secretion in human T-cells at single cell levels on a live cell chip. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸.
- 6) 小澤龍彦, 小林栄治, 金 艾順, 岸裕幸, 村口 篤: The binding affinity of a soluble TCR-Fc fusion protein is significantly improved by crosslinkage with an anti-Cb antibody. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸.

- 7) 小林栄治, 岸 裕幸, 浜名 洋, 小澤龍彦, 中河秀俊, 金 艾順, 村口 篤 : Cloning of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸.
- 8) 浜名 洋, 小林栄治, 岸 裕幸, 小澤龍彦, 金 艾順, 村口 篤 : Comparison of TCR repertoires in EBV-specific T cells detected by three different staining methods. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012, 12, 5-7, 神戸.

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

特になし

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

池田 裕明 三重大学大学院医学系研究科 准教授

研究要旨：B型慢性肝炎の治療においては、肝炎ウイルスの増殖を低下させ、cccDNAを中心とするHBVの再活性化機構を制御することが重要である。cccDNAの制御と排除を行う治療法を開発するためには、cccDNAの存在様式と遺伝子発現の調節機構といったcccDNAの基本的な動態を解明するとともに、cccDNAに対してどのような免疫が作動しているかを明らかにして研究開発を行うことが必要である。国内外においてhistone修飾を標的とする薬剤、あるいはsmall RNAなどの核酸医薬を用いて直接にcccDNAを標的とする治療薬研究が進められているが、逆に再活性化の可能性が指摘されるなど、有効な治療法が開発されていない。本研究は、最先端の免疫学の技術を用い、cccDNAの制御と排除を行う新規治療薬の開発研究を目指す。cccDNAの細胞内の動態と、それを持つ肝細胞に対する免疫の状態を明らかにする。標的とする抗原、その抗原エピトープを認識するT細胞レセプター（TCR）を同定し、TCR遺伝子導入T細胞、ペプチドなどを作製し、動物モデルを用いてcccDNAの制御と感染細胞の排除に対する有効性と作用機序を明らかにする。

A. 研究目的

B型肝炎に対しては、国内外においてhistone修飾を標的とする薬剤、あるいはsmall RNAなどの核酸医薬を用いて直接にcccDNAを標的とする治療薬研究が進められている。しかし、逆に再活性化の可能性が指摘されるなど、有効な治療法が開発されていない。本研究は、こうした直接的な抗ウイルス剤の開発と異なり、世界最先端の免疫学の技術を用いたcccDNAの制御と排除をめざす開発研究を行う。

本分担研究者は、本事業の研究者らと連携し、標的とする抗原とその抗原エピトープを認識するT細胞レセプター（TCR）を同

定し、TCR遺伝子導入T細胞を用いた画期的な新規治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

①腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する TCR 遺伝子導入ヒト T 細胞を重度免疫不全 NOG マウスに輸注し、抗腫瘍効果と輸注 T 細胞の動態を解析した。②マウス腫瘍の腫瘍抗原を認識する TCR を発現するエコトロピックベクターを作製し、TCR 遺伝子導入リンパ球輸注療法のマウスモデルを開発した。③効率良く導入 TCR を発現し、安全性の高い新規レトロウイルスベクターの開発を行った。（倫理面への配慮）

本研究に用いるヒト末梢血等の検体の採集、解析はヘルシンキ宣言にのっとり行なわれ、全て三重大学医学部研究倫理委員会にて承認されたプロトコールに従い、被験者本人の書面による同意書を得て実施される。採取した検体は本人特定不可能な暗号化がなされ盗難防止処置を施した冷蔵庫、液体窒素タンクに保存する。被験者個人情報に関しては匿名化され、個人のプライバシー、遺伝子解析の結果が外部に漏洩されないよう厳重な注意、処置が施行される。

レトロウイルスを用いたヒト末梢血単核球への腫瘍抗原特異的TCRの導入実験は三重大学の組換えDNA実験審査委員会及び三重大学医学部研究倫理委員会において承認されている。これらの実験は三重大学において承認を受けたP2レベルの研究室にて行なわれる。

実験動物を用いたT細胞輸注療法、遺伝子免疫療法の研究は三重大学の組換えDNA実験審査委員会、三重大学医学部研究倫理委員会、動物実験審査委員会においてすでに承認を受けており、三重大学において承認をうけた実験室、飼育室において実施される。

### C. 研究結果

①TCR 改変ヒト T 細胞輸注療法の効果や安全性を評価するインビボ評価系を確立した。具体的には、腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する TCR 遺伝子導入ヒト T 細胞を重度免疫不全 NOG マウスに輸注し、MAGE-A4 発現ヒト腫瘍細胞の成長抑制を確認した。ワクチンとの併用効果、輸注 T 細胞のマルチファンクション性のバイオマーカーとしての重

要性を見出した。②エコトロピックレトロウイルスベクターによる TCR 遺伝子導入リンパ球輸注療法のマウスモデルを確立し、様々なベクター構造や輸注プロトコールの同種インビボ評価系を確立した。③独自開発の siTCR 技術に、2A ペプチドの導入とジスルフィド結合を組合せ、導入 TCR 遺伝子の発現を高めると共により安全性の高い新規ベクターの開発を行った。

### D. 考察

TCR 遺伝子導入リンパ球の輸注療法を効果的に評価するインビボ評価系が確立された。また、導入 TCR の発現効率と安全性が高い新規レトロウイルスベクターが作製された。以上の成果は今後本研究にて同定される予定の HBV 感染細胞に特異的に反応する TCR を用いた画期的な新規治療法の開発に大きく役立つことが期待される。

### E. 結論

本年度は TCR 遺伝子導入リンパ球の輸注療法のインビボ評価系が確立され、導入 TCR の発現効率と安全性が高い新規レトロウイルスベクターが作製された。以上の成果は、HBV 感染を克服する TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法の開発に大きく役立つことが期待される。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Okamoto S, Amaishi Y, Goto Y, Ikeda H, Fujiwara H, Kuzushima K, Yasukawa M, Shiku H, Mineno J. A promising vector for TCR gene therapy: Differential effect of

- siRNA, 2A peptide, and disulfide bond on the introduced TCR expression. **Mol. Ther. - Nucleic Acids**, in press, 2013.
- 2) Soga N, Hori Y, Yamakado K, Ikeda H, Imai N, Kageyama S, Nakase K, Yuta A, Hayashi N, Shiku H, Sugimura Y. Limited expression of cancer-testis antigen in renal cell carcinoma patients. **Mol. Clin. Oncol.** 1:326-330 2013.
  - 3) Shirakura Y Mizuno Y, Wang L, Imai N, Amaike C, Sato E, Ito M, Nukaya I, Mineno J, Takesako K, Ikeda H, Shiku H. T-cell receptor gene therapy targeting melanoma-associated antigen-A4 inhibits human tumor growth in non-obese diabetic/SCID/gc<sup>null</sup> mice. **Cancer Sci.** 103(1):17-25, 2012.
  - 4) Noguchi T, Kato T, Wang L, Maeda Y, Ikeda H, Sato E, Knuth A, Gnjatich S, Ritter G, Sakaguchi S, Old LJ, Shiku H, Nishikawa H. Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy. **Cancer Res.** 72(7):1672-1682, 2012.
  - 5) 池田裕明, 珠玖 洋. カラー版 内科学 西村書店 第6章 15 遺伝子治療・免疫療法 :304-308, 2012.
2. 学会発表
- 1) Naoko Imai, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Linan Wang, Kazuko Shirakura, Chisaki Amaike, Yumi Goto, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroaki Ikeda, Hiroshi Shiku. Evaluation of vector construction of TCR gene therapy for cancer utilizing a novel mouse model. 第41回日本免疫学会学術集会、神戸、2012
  - 2) 今井奈緒子、河村あゆみ、山根真妃子、後藤優美、岡本幸子、峰野純一、竹迫一任、池田裕明、珠玖洋。T細胞レセプター遺伝子導入リンパ球輸注療法のマウスモデルによる解析。第16回日本がん免疫学会総会、札幌、2012
  - 3) 細井勇人、池田裕明、今井奈緒子、王立楠、糠谷育衛、榎竜嗣、峰野純一、竹迫一任、平野聡、珠玖洋。インテグリンを介したリンパ球刺激はCD8<sup>+</sup>T細胞輸注療法の抗腫瘍効果を向上する。第16回日本がん免疫学会総会、札幌、2012
  - 4) 影山 慎一、池田 裕明、宮原 慶裕、今井 奈緒子、石原 幹也、斎藤 佳菜子、片山 直之、上田 修吾、戸村 大助、糠谷 育衛、峰野 純一、竹迫一任、珠玖 洋。食道癌に対するTCR遺伝子導入リンパ球輸注療法の安全性と細胞血中動態の解析。第71回日本癌学会総会、札幌、2012
  - 5) Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Naoko Imai, Yoshihiro Miyahara, Mikiya Ishihara, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Daisuke Tomura, Sachiko Okamoto, Ikuei Nukaya, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Naoyuki Katayama, Hiroshi Shiku. Clinical application of gene-modified lymphocytes for cancer immunotherapy. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会、招待講演、熊本、2012
  - 6) Naoko Imai, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Linan Wang, Kazuko Mori, Chisaki Hyuga, Yumi Goto, Sachiko

Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroaki Ikeda, Hiroshi Shiku. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会、熊本、2012

- 7) Sachiko Okamoto, Yumi Goto, Yasunori Amaishi, Ikuei Nukaya, Hiroaki Ikeda, Hiroshi Fujiwara, Kiyotaka Kuzushima, Masaki Yasukawa, Hiroshi Shiku, Junichi Mineno. 2nd generation “siTCR” vector : Improvement of efficacy and safety of TCR gene therapy. 15<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy. Philadelphia, USA, 2012

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

特になし

ペプチド+アジュバント併用療法の開発

石井 健 （独）医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクトリーダー

**研究要旨：**本研究は主としてペプチドを抗原としたワクチン候補に供与するアジュバントの開発を目的とする。本年度は本年度は期間も限られていたことからペプチドワクチンの候補アジュバントの選定と全臨床試験の予備実験をモデル抗原を用いて行った。人で既に上市されて用いられているアラムアジュバントをコントロールとしてTLR9リガンドであるCpGODNやその他TLRリガンド、粒子アジュバント、新規アジュバントを用いて抗原特異的な免疫反応のキャラクタライゼーションを行った。

A. 研究目的

本研究は主としてペプチドを抗原としたワクチン候補に供与するアジュバントの開発を目的とする。

B. 研究方法

ペプチドなど、候補抗原が確定した時点で使用するアジュバントの選定をする必要があるが、我々はまず数あるアジュバントを独自にカテゴリー化し、それぞれでどのような免疫反応が誘導できるかを検討した。

- 1) 認可されたアラム (Alum) アジュバントに代表される粒子アジュバント
- 2) 強い細胞性免疫を誘導する TLR リガンド；主に TLR9 リガンドである CpGDNA や TLR3 リガンドの dsRNA など
- 3) その他

C. 研究結果

本年度は期間も限られていたことからペ

プチドワクチンの候補アジュバントの選定と全臨床試験の予備実験をモデル抗原を用いて行った。人で既に上市されて用いられているアラムアジュバントをコントロールとして TLR9 リガンドである CpGODN やその他 TLR リガンド、粒子アジュバント、新規アジュバントを用いて抗原特異的な免疫反応のキャラクタライゼーションを行った。

- 1) アラムアジュバントにおける Th2 型アジュバント作用とその機序として、宿主の細胞への障害や、細胞から放出される DNA などの Damage associated molecular pattern (DAMPs) が重要であることを示したが、粒子状をとらない、新規アジュバントを複数同定し、それらは同じ Th2 アジュバントにもかかわらず DAMPs を誘導することなく、まったく異なる作用機序でアジュバント効果を示すことを見出した。

- 2) TLR リガンドにおいては現在臨床試

験が行われている第一世代 TLR9 リガンド (S 化された裸の DNA 断片) をコントロールとして、DDS 機能が付与された第2世代の TLR9 リガンドのアジュバント機能を解析した。その結果、In vitro での自然免疫活性化能、In vivo でのアジュバント効果、特に細胞性免疫を担当する CD4Th1 細胞や CD8T 細胞の誘導が著名に増強することを見出した。

#### D. 考察

今後、ペプチドワクチンとアジュバントの最適化スクリーニングを行うだけのバラエティーに富んだ (すなわち、いろいろな作用と、そのメカニズムをもった) 新たなアジュバントの同定、機能解析、作用機序解析を始めることが出来た。

#### E. 結論

上記の通り、ペプチドワクチンに最適化されたアジュバントを提供し、GMP ロット化といった、臨床開発の道筋をつけることが重要と考えられる。また、cccDNA の除去にかかわる自然免疫の機序を利用したアジュバント単独の免疫療法なども探索していきたい。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, [Ishii KJ](#), Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating

STING trafficking. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23388631.

2) Jounai N, Kobiyama K, Takeshita F, [Ishii KJ](#). Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:168.

3) Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, [Ishii KJ](#), Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. Hum Vaccin Immunother. 2013 9(2). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23291928.

4) Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, [Ishii KJ](#), Yokoyama M. Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. J Control Release. 2013 165(3):183-90.

5) Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, [Ishii KJ](#), Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. Cell Host Microbe. 2012 12(5):705-16.

6) Nakayama T, Kumagai T, [Ishii KJ](#), Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young

- children. *Vaccine*. 2012 30(52):7662-6.
- 7) Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine*. 2012 30(52):7658-61.
- 8) Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. Type-I IFN signaling is required for the induction of antigen-specific CD8(+) T cell responses by adenovirus vector vaccine in the gut-mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 425(1):89-93.
- 9) Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol*. 2012 12(7):479-91.
- 10) Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine*. 2012 30(26):3885-90.
- 11) 石井健 「概論；宿主の生態バリア」  
実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム 2012 30(20): 134-137.
- 12) 石井健 「概論；感染・共生・生体防御研究から生まれる新たな疾患予防、治療法のターゲット」 実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム2012 30(20): 172-175.
- 13) 城内直、石井健 「細胞外核酸の生物学的意義と臨床応用」 実験医学（増刊）編集 笹川千尋、柳雄介、大野博司、石井健 感染・共生・生態防御システム2012 30(20): 209-216.
- 14) 青枝大貴、石井健 「ワクチン開発研究の展開」免疫学Update 南山堂 編集 審良静男他 2012 p190-200.
- 15) 青枝大貴、石井健 「自然免疫研究と次世代ワクチン」 医学のあゆみ 2012 243(1):122-128.
- 16) 青枝大貴、石井健 「ワクチン」免疫学コア講義 南山堂 編集 熊ノ郷淳他 2012 p262-271.
- 17) 小檜山康司、石井健. 自然免疫メカニズムを利用するワクチンアジュバント開発. *THE LUNG* 2012 20(4):54-61.
- 18) 鉄谷耕平、石井健. アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政。ファームテクジャパン2012,28(4): 45-52.
- 19) 鉄谷耕平、石井健. ワクチンアジュバントの現状と展望. レギュラトリーサイエンス学会誌2012, 2(2): 149-158.
- 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  
特になし

遺伝子組み換えワクチニアウイルス株の樹立と治療効果の解析

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：**B型肝炎ウイルス（HBV）は、肝細胞を宿主として慢性感染症を起こし、慢性肝炎・肝硬変、さらには肝細胞癌を引き起こす。HBVは免疫の不完全な乳児期は慢性化するが、成人では排除されることが知られている。これは免疫寛容を破綻させることが治療につながる（免疫療法）ことを示している。我々は慢性HBV感染症の実験モデルとして樹立したHBV-TgマウスにおいてNKT細胞を活性化するGalactosylceramideが抗ウイルス効果を示すことを明らかにした。これらの結果はHBV慢性感染症において、免疫の賦活化が新たな治療法となる可能性を示していた。また、持続的な免疫活性化を得るために、HBVs抗原遺伝子組換えワクチニアウイルスの構築を進めている。

A. 研究目的

慢性感染症に対する免疫療法の開発を目指す。そのモデルとしてHBVにおける免疫寛容の成立と破綻のメカニズムを解析し、さらには免疫賦活化によるHBVの治療法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

慢性感染症のモデルとしてHBVに着目し解析を行った。HBV感染動物モデルであるHBV感染ヒト肝臓型キメラマウスでは、ヒト肝細胞の持つ自然免疫とHBVの解析が可能であった。しかし、SCIDマウスであり、獲得免疫の解析は困難であった。そこで我々は慢性HBV感染症のモデル動物としてHBVゲノムを組み込んだ遺伝子改変マウス（HBV-Tgマウス）を作成した。本マウスでは、自然免疫・獲得免疫が施錠であるため、これら免疫システムと慢性HBV感染症

の関係を解析することが可能となった。また、免疫賦活化するツールとして、NKTを活性化するgalactosylceramideを使用した。さらに、細胞性免疫・液性免疫を強力に誘導できる組換えワクチニアウイルスの作製を試みた。

（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

BVゲノムを組み込んだ遺伝子改変マウス（HBV-Tgマウス）を作成した。このマウスは、胎生期よりHBV蛋白質を発現しているため免疫寛容状態になっている。実際、HBV-DNA及びHBV蛋白質は排除されず持続的に発現していた。さらに、本マウスは肝

臓にて炎症像を認め、やがて肝硬変、肝細胞癌を引き起こし、ヒトでの慢性HBV感染症の病態に類似していた。本マウスにNKT細胞を活性化するgalactosylceramideを投与し抗HBV効果を評価した。すると、galactosylceramide投与によりNKT細胞が活性化され、肝臓内HBV-DNA量の低下を認めた。

#### D. 考察

本マウスにNKT細胞を活性化するgalactosylceramideを投与し抗HBV効果を評価したところ、NKT細胞が活性化され、肝臓内HBV-DNA量の低下を認めたが持続しなかった。

#### E. 結論

Galactosylceramide等による自然免疫活性化のみでは効果が持続しなかった。獲得免疫を強力に活性化できる組換えワクチニアワクチンの樹立に向けて研究を進める。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fumihiko Yasui, Masayuki Sudoh, Masaaki Arai, Michinori Kohara. Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. *J. Med. Virol.* (2013) in press.
- 2) 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).
- 3) 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).

- 4) Kazuaki Inoue, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Chiho Matsuda<sup>1</sup>, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Shusuke Kuge, Makoto Yoshiba 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).
- 5) 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

- |  |  |
|--|--|
| <p>1) Takano T., Tsukiyama-Kohara K., <u>Kohara M</u> : Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. The International Liver Congress 2012.4.18-22 Barcelona (SPAIN)</p> <p>2) Tsukiyama-Kohara K., <u>Kohara M.</u> : 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</p> <p>3) 小原恭子、佐藤正明、<u>小原道法</u> : 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</p> <p>4) Hirata Y., Ikeda K., Sudoh M., Tokunaga Y., Taguchi R., <u>Kohara M.</u>: 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)</p> <p>5) Kimura K., Sekiguchi S., Otsuki T., Tokunaga Y., Tsukiyama-Kohara K., <u>Kohara M.</u>: 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)</p> | <p>1. 特許取得<br/>なし</p> <p>2. 実用新案登録<br/>なし</p> <p>3. その他<br/>特になし</p> |
|--|--|

G. 知的所有権の出願・取得状況

HBV由来細胞傷害性T細胞エピトープの同定とペプチドワクチンの開発

水腰英四郎 金沢大学附属病院消化器内科 講師

**研究要旨：**B型肝炎ウイルス（HBV）のcccDNAは、ウイルス増殖が大きく低下し、血液中にHBsAg、HBV DNAが検出されない症例においても、生涯にわたって肝組織中に見いだされる。cccDNAはウイルスcoreタンパクに加え、histoneや他の核タンパクとminichromosomeを形成して核内に存在し、現行の抗ウイルス治療に抵抗性である。cccDNAの制御と排除を行う治療法を開発するためには、cccDNAの存在様式と遺伝子発現の調節機構といったcccDNAの基本的な動態を解明するとともに、そうした動態にあるcccDNAに対して、どのような免疫が作動しているかを明らかにして研究開発を行うことが必要である。

本研究では、cccDNA感染細胞に対する免疫監視機構の解明とcccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発を行う。本年度はこれらの研究を遂行するための基礎的研究として、HBV由来細胞傷害T細胞エピトープの同定を行った。

A. 研究目的

HBV cccDNA 感染肝細胞に発現している細胞傷害性 T 細胞エピトープを同定することにより、cccDNA 感染細胞に対する免疫監視機構の解明と cccDNA 感染細胞に対する免疫治療法の開発を行う。

B. 研究方法

B型肝炎ウイルス(HBV) genotype C の large S 領域、pre-core/core 領域、HBx 領域、polymerase 領域のアミノ酸配列を基に、コンピュータソフト(BIMAS)を用いて、HLA-A24 拘束性細胞傷害性 T 細胞(CTL)エピトープの予測を行う。次に HLA-A24 分子への結合予測スコアが 5.0 以上のエピトープをもつペプチドを作製し、各種

免疫学的アッセイ法 (ELISPOT アッセイ、CTL アッセイ等) にてヒト末梢血リンパ球での免疫反応を検討する。倫理面への配慮として、本研究では臨床研究・疫学研究・ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。本研究に関しては、研究施設内の倫理委員会として、1) 医学倫理審査委員会と2) ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の2つの承認を今年度に得た。

C. 研究結果

コンピュータにて予測された CTL エピトープのうち、large S 領域から 28 種類、pre-core/core 領域から 13 種類、HBx 領域から 4 種類、polymerase 領域から 44 種類