

## HCV予防・治療ワクチンの霊長類モデルによる評価系の確立

分担研究者 明里 宏文 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター 教授  
研究協力者 東濃 篤徳 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター  
鈴木 紗織 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター  
森 健一 先端生命科学研究所  
槇 昇 先端生命科学研究所

研究要旨： C型肝炎ウイルスワクチンの実用化には、モデル動物を用いた安全性・有効性の評価が必要不可欠である。今年度までに、本研究班で開発したHCVワクチンを実験用霊長類へ接種し、その有効性について評価を行った。その結果、当該ワクチンは中和抗体および細胞性免疫応答の両者を誘導可能であることが明らかとなり、HCV予防のみならず治療用ワクチンとしての可能性を示す貴重な成果を得た。更に、ワクチン免疫による感染防御効果を実証する目的で、前臨床試験用モデル動物として有望なキメラウイルス感染マウスマットを新たに開発した。今後より優れた評価モデルに向けて重要な役割を担うものと期待される。さらに、キメラウイルスの持続感染能獲得に必要な免疫回避機構に関する基盤研究を推進した。以上、HCVワクチンの臨床応用に向けた基盤研究が大きく進展した。

### A. 研究目的

C型肝炎の原因ウイルスであるHepatitis C virus (HCV) は非A, 非B型肝炎ウイルスとしてヒト骨髄から20年以上前に単離された (Choo et al., Science, 1989, 24, 359-362)。現在HCVは世界的に蔓延しており, 1億7千万 (世界人口の3%近く) がキャリアと見られている。日本での持続感染者は190万人~230万人存在すると推定されているが, 自覚症状がないことが多く, 肝硬変や肝癌へ移行する感染者が多く存在することが問題となっているため, 抗ウイルス剤や治療用ワクチン開発が急務である。

近年, 脇田らのJFH-1株の発見によりHCVの培養が可能となった (Wakita et al., Nature Medicine, 2005, 11, 791-796)。大量精製した

HCV粒子を不活化することでHCVの予防・治療ワクチンとしての実用化を目指しているが, そのためには安全性・有効性の評価にあたりHCV感染動物モデルが非常に重要である。しかしHCVはチンパンジー以外の動物では疾患モデルが存在しないという宿主域の狭さの問題がある。さらにチンパンジーの感染実験使用は絶滅危惧種である上に, 倫理的観点から我が国を始め諸外国でも認められていない。これらのことがワクチンの開発に不可欠な個体レベルでの安全性・有効性評価, さらにC型肝炎の病態解析を行なうにあたって大きな障壁となっている。

この問題を克服する方法の1つとしてGBV-B/新世界ザル-サロゲート感染モデルの応用が挙げられる。GBV-Bはタマリンから単離され, HCV

と同じくヘパチウイルスとして分類されており、新世界ザルに感染性を示し、急性および慢性C型肝炎様病態を引き起こす。我々が行ってきたマーモセットへのGBV-B接種実験では4年以上の長期に渡り、ウイルス血症およびALT値の上昇、肝線維化を伴う慢性C型様肝炎を呈することを世界で初めて見出した。以上を踏まえ、本研究ではマーモセットを用いたHCVワクチンの免疫誘導能を検証した。次に、HCVワクチン評価に必要な慢性C型肝炎のサロゲート病態解析に用いる霊長類モデルとしてHCV/GBV-Bキメラウイルス感染マーモセットモデルの確立を目指し、キメラウイルスの構築および複製能の評価を行った。またこれと平行して、HCVワクチンの有効性評価のための基盤研究を進めた。

## B. 研究方法

・細胞性免疫応答の解析：ワクチン接種マーモセットの血液より分離、凍結保存したPBMCに、HCV抗原（HCV-213: ジェノタイプ1 Core 1-102aa ポリペプチド、HCV-214: ジェノタイプ2a Core 2-119aa ポリペプチド）を添加後6時間培養し、細胞よりmRNAを抽出した。IFN $\gamma$ およびGAPDH mRNA発現量をリアルタイムPCR法にて定量し、IFN $\gamma$ /GAPDH比を算出した。これを基に、同一サル個体におけるワクチン接種前後のIFN $\gamma$  mRNA相対値を算出した。

・キメラウイルス接種実験：キメラウイルスクローンは、GBV-BをベースとしてCoreおよびE1, E2領域をGBV-Bの相当する遺伝子領域に置換したHC/GBであるGB/HC<sub>uCE12</sub>及びGB/HC<sub>E12</sub>を構築した。これらクローン由来ウイルスRNAをマーモセットに麻酔下で肝臓に直接

接種した。その後、経時的に採血しウイルス複製増殖能を評価した。

・GBV-B/マーモセット感染実験：GBV-Bストック血清を経静脈もしくは経肝臓にて接種した後、ケタミン麻酔下で定期的に採血し、血算・生化学検査、血漿中ウイルス量および抗ウイルスCore, E2, NS3抗体価の定量および次世代シーケンサーによるゲノム変異解析を行った。なおすべての動物実験は、倫理面を含めて京都大学動物実験委員会および医薬基盤研究所動物実験委員会の審査・承認を得て実施した。

## C. 研究結果

### (1) HCVワクチンの評価に関する研究

ワクチン接種：マーモセット3頭へHCVワクチンを接種したところ、有意な抗体誘導が確認された。また臨床的、病理的な副作用は認められなかった（詳細は別頁を参照のこと）。

ワクチン接種による細胞性免疫誘導能の検討：次に、本ワクチンによる細胞性免疫誘導能について検討を行った。ワクチン接種マーモセットPBMCに、ワクチンと同じジェノタイプ2a由来Coreペプチドを添加し刺激したところ、接種前PBMCと比較して有意なIFN $\gamma$  mRNAの発現誘導が認められた。このIFN $\gamma$ 発現はワクチン接種回数とともに上昇したこと、またジェノタイプ1由来Coreペプチドの添加では有意な発現誘導が生じなかったことから、ワクチン抗原刺激により特異的な細胞性免疫が誘導されたものと考えられた。

### (2) HCV/GBV-Bキメラウイルスに関する研究

今年度はHCV/GBV-BキメラウイルスGB/HC

uCE12及びGB/HCE12のサル個体での増殖能を検討すべく、キメラウイルスクロンRNAをマーモセット肝臓に接種した。その結果、感染8週までの時点で血漿中からウイルスRNAが断続的に検出された。従って、上記のキメラウイルスはマーモセット体内で増殖可能であることが強く示唆された。現在引き続きフォローアップ解析を行っている。

### (3) HCVワクチンの評価系確立のための基礎的研究

本研究では、急性および慢性GBV-B感染ザルにおける感染病態の違いを規定する原因を探る目的で、獲得免疫応答およびウイルスゲノム変異について焦点を当て比較検討を行った。

獲得免疫応答の解析：急性クリアランス例では血中ウイルスRNA量が低下する感染後3ヶ月頃に抗core、E2、NS3抗体価が上昇する一方で、GBV-Bキャリアでは顕著な抗体誘導の遅延が見られた。すなわち、抗core、E2、NS3抗体のいずれにおいても抗体価上昇に感染後1年以上を要した。これらの知見から、特異抗体（おそらく中和抗体）誘導の遅延が持続感染への移行につながる可能性が考えられた。

ウイルスゲノム変異の解析：GBV-Bキャリアの血中ウイルスゲノムにおいて検出された非同義置換（アミノ酸置換）変異は、その頻度が遺伝子領域間で大きな偏りが見られ、一定の選択圧が影響していると考えられた。この非同義置換部位について検討したところ、GBV-Bキャリアでのみ認められ急性クリアランス例では生じない複数の変異が確認された。この変異について各感染個体における時系列での動態を検討し

たところ、比較的短期間に頻繁な連続・復帰変異を生じたもの、長期にわたり固定され再変異が生じないもの、さらに慢性肝炎へと病態が進行した例でのみ生じた変異、の3種類に区分された。についてはCTLもしくは中和抗体からの逃避変異と想定された。またではウイルス増殖に有利な適応変異の可能性が考えられた。さらにでは肝障害に何らかの影響を及ぼした変異であることが示唆された。

### D. 考察

今年度までの研究により、アカゲザルおよびマーモセットへのHCVワクチン接種により有意な特異抗体誘導が確認された。また、IFN $\gamma$ 発現上昇により示される特異的細胞性免疫も平行して誘導されることが確認された。このことは、HCV全粒子によるワクチン接種により多様な抗ウイルス免疫を誘導しうることを表しており、HCV予防のみならず、治療用ワクチンとしての可能性を示す結果として非常に意義深い。

こうした結果を踏まえると、更なるワクチン自身の免疫原性の向上およびアジュバントの最適化と平行して、ワクチン免疫による感染防御効果の実証が臨床応用に向けた重要なポイントとなるだろう。この点において、今回示したキメラウイルス感染マーモセットはワクチンの有効性評価のための前臨床試験用モデルとして最も適していると考えられる。今後、より優れた評価モデルに向けて更なる改良が望まれる。

サル類における感染性を獲得したHCV/GBV-Bキメラウイルスが樹立されたとして、次の課題はキメラウイルスの持続感染性の獲得だろう。HCV感染においては、急性クリアランスと持続

感染への移行の違いを規定する要因としてIFNAのSNPが報告されているが、その本態は未だ明らかではない。この点を明らかにするためには感染初期段階でのウイルス変異や免疫応答の解析が不可欠である。しかし通常、HCV感染の発見は慢性期の肝炎発症時点となることや、HCV暴露事故等で感染が明らかな場合は直ちにIFN治療をおこなうことから、未治療のHCV感染者について感染初期から経時的に血液サンプルを入手することは困難である。従って、持続感染化移行に係る原因探索は容易ではないのが実情である。我々はこれまでに、HCVと同じフラビウイルス科ヘパシウイルス属に分類されるGBV-Bのサル感染実験において、HCV感染と同様に急性クリアランス例と持続感染移行例（GBV-Bキャリア）が見られることを報告している。特に、接種に用いるGBV-Bウイルスは感染性分子クローン由来であるため、病態の異なるサル個体における比較解析に適していると考えられる。今回の解析の結果、特異抗体（おそらく中和抗体）誘導の遅延およびウイルスゲノムの適応変異が持続感染への移行につながっている可能性が考えられた。今後、これらの現象がウイルス持続感染化とどのように関連しているのか、その機能的意義について詳細な解析を進めていきたい。

#### E. 結論

本研究班で開発したHCVワクチンは、サル類に中和抗体および細胞性免疫応答の両者を誘導可能であることが明らかとなった。HCV予防のみならず、治療用ワクチンとしての可能性を示す結果として非常に意義深い。更に、ワクチン

免疫による感染防御効果を実証するために開発を進めているキメラウイルス感染マーマセットは最も適している前臨床試験用モデル動物と考えられ、今後より優れた評価モデルに向けて重要な役割を担うものと期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Yuriko S, Saijo M, Akari H, Kurane I: Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viremia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *Journal of General Virology*, 2104, in press.
- 2) Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A: Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. *Immunogenetics*, 2014, in press.
- 3) Yoshida T, Suzuki S, Iwasaki Y, Kaneko A, Saito A, Enomoto Y, Higashino A, Watanabe A, Suzuki J, Inoue K, Kuroda T, Takada M, Ito R, Ito M, Akari H: Efficient *in vivo* depletion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in common marmosets by novel CD8 monoclonal antibody administration. *Immunology Letters* 154, 12-17, 2013.
- 4) Miura M, Yasunaga J, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H, Matsuoka M: Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology* 10, 118,

- 2013.
- 5) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Saito A, Akari H, Yasutomi Y, Matano T, Sato H, Adachi A: Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15, 56-65, 2013.
  - 6) Nomaguchi M, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Nakayama EE, Shioda T, Yokoyama M, Sato H, Adachi A: Systemic biological analysis of the mutations in two distinct HIV-1mt genomes occurred during replication in macaque cells. *Microbes and Infection* 15, 319-328, 2013.
  - 7) Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Higashino A, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H: Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archives of Virology* 158, 1209-1220, 2013.
  - 8) Saito A, Nomaguchi M, Kono K, Iwatani Y, Yokoyama M, Yasutomi Y, Sato H, Shioda T, Sugiura W, Matano T, Adachi A, Nakayama EE, Akari H: TRIM5 genotypes in cynomolgus monkeys primarily influence inter-individual diversity in susceptibility to monkey-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Journal of General Virology* 94, 1318-1324, 2013.
  - 9) Saito A, Akari H: Macaque-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1mt): Break out of the host factors. *Frontiers in Microbiology* 4, 187, 2013.
  - 10) Nomaguchi M, Yokoyama M, Kono K, Nakayama EE, Shioda T, Doi N, Fujiwara S, Saito A, Akari H, Miyakawa K, Ryo A, Ode H, Iwatani Y, Miura T, Igarashi T, Sato H, Adachi A: Generation of rhesus macaque-tropic HIV-1clones that are resistant to major anti-HIV-1 restriction factors. *Journal of Virology* 87, 11447-11461, 2013.
  - 11) Kooriyama T, Okamoto M, Yoshida T, Nishida T, Tsubota T, Saito A, Tomonaga M, Matsuzawa T, Akari H, Nishimura H, Miyabe-Nishiwaki T: Epidemiological study of zoonoses derived from humans in captive chimpanzees. *Primates* 54, 89-98, 2013.
  - 12) Moi ML, Omatsu T, Hirayama T, Nakamura S, Katakai Y, Yoshida T, Saito A, Tajima S, Ito M, Takasaki T, Akari H, Kurane I: Presence of viral genome in urine and development of hematuria and pathological changes in kidneys in common marmoset (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *Pathogens* 2, 357-363, 2013.
2. 学会発表
- 1) 東濃篤徳, 森健一, 鈴木紗織, 岩崎優紀, 吉田友教, 齊藤暁, 榎昇, 明里宏文: 霊長類を用いた HCV/ GBV-B キメラウイルス感染モデル. 第 60 回日本実験動物学会総会 (つくば) 平成 25 年 5 月 15 - 17 日
  - 2) 鈴木紗織, 東濃篤徳, 森健一, 吉田友教, 齊藤暁, 榎昇, 明里宏文: GBV-B 感染新世界ザルの液性免疫解析. 第 60 回日本実験動物学会総会 (つくば) 平成 25 年 5 月 15 - 17 日
  - 3) Atsunori Higashino, Saori Suzuki, Akatsuki Saito, Yuko Katakai, Sachi Okabayashi, Hirofumi Akari: Analysis of dynamics in GB

virus B quasispecies in the course of long-term persistent infection and disease progression in marmosets. 20<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct 6-10, 2013, Melbourne.

(神戸)平成25年11月10-12日

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

4) Saori Suzuki, Atsunori Higashino, Ken-ichi Mori, Yuko Katakai, Akatsuki Saito, Noboru Maki, Hirofumi Akari: The delayed humoral immune responses may be associated with the development of chronic GBV-B infection. 20<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct 6-10, 2013, Melbourne.

5) 東濃篤徳, 鈴木紗織, 齊藤暁, 片貝祐子, 岡林佐知, 明里宏文: 新世界ザルにおける持続感染GBV-BのQuasispecies解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸)平成25年11月10-12日

6) Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I, Takasaki T: Development of a novel non-human primate model for secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸)平成25年11月10-12日

7) 鈴木紗織, 東濃篤徳, 森健一, 吉田友教, 片貝祐子, 齊藤暁, 榎昇, 明里宏文: 急性及び慢性GBV-B感染症における液性免疫の比較解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会