

201320022A

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

肝炎ウイルス特異的免疫賦活化による
根治治療的ワクチンの開発に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 26(2014)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

肝炎ウイルス特異的免疫賦活化による
根治治療的ワクチンの開発に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 26(2014)年 3 月

肝炎ウイルス特異的免疫賦活化による根治治療的ワクチンの
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>		
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
小原 恭子	国立大学法人鹿児島大学・越境性動物疾病制御研究センター	教授・センター長
押海 裕之	国立大学法人北海道大学・大学院医学系研究科	講師
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

肝炎ウイルス特異的免疫賦活化による根治治療的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. 慢性肝炎病態とワクチン治療効果の解析

小原 道法	----- 1 1
-------	-----------

2. HCV 感染に対する治療用ワクチンに関する研究

保富 康宏	----- 1 6
-------	-----------

3. ツパイ自然感染モデルでの発症・治療評価

小原 恭子	----- 2 3
-------	-----------

4. 病態解析と細胞性免疫誘導能の高いアジュバントの開発

押海 裕之	----- 2 6
-------	-----------

5. 中和活性を持つ抗 HCV EI モノクローナル抗体のエピトープ解析と中和エピトープを有するウイルス粒子産生系の確立に関する研究

鈴木 亮介	----- 2 9
-------	-----------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 3 5
---------------------	-----------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 4 1
-----------------	-----------

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（平成25年度）

肝炎ウイルス特異的免疫賦活化による根治治療的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：本研究ではC型肝炎ウイルス(HCV)感染者に対する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。マウス動物モデルを用い、HCV感染時の新たなIII型インターフェロン産生経路を発見し、またIII型インターフェロンが樹状細胞に及ぼす影響を詳細に解明した。また、我々は、I型やIII型のインターフェロン産生に重要なRiplet分子がHCVのNS3-4Aプロテアーゼによって分解されることを解明した。これは、Riplet分子の分解を阻害することが、アジュバント効果を高める為に重要であることを示していた。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。また、ワクチンの効果を判定する動物モデルとして成獣のツパイにHCV genotype1b, 2a, 4aのウイルスを接種し6ヶ月程度経過を観察している。いずれの遺伝子型を接種したツパイにおいてもHCVの感染増殖が観察された。

研究分担者：

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

小原恭子：鹿児島大学・共同獣医学部教授

押海裕之：北海道大学・大学院医学研究科 講師

鈴木亮介：国立感染症研究所・ウイルス第二部 主任研究官

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、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。そこで本研究では肝炎ウイルス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)

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 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、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。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 (保富康宏)

(1) マウス

poly(I:C)を投与することで、任意の時期に HCV 遺伝子を誘導発現できるトランスジェニック (HCV-Tg) マウス (CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-), RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-))、C56BL/6 マウスを用いた。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させた後に、実験に使用した。CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスは HCV 遺伝子の一部を、RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-)マウスは全長をコードしている。

(2) HCV遺伝子発現ワクチンの作製

すべてのHCV遺伝子領域を含むpBMSF7Cプ

ラスミドベクターからPCR法と制限酵素反応を用いて、HCVの複製に関与している非構造蛋白領域（NS2-5）の遺伝子領域をpCAGGSプラスミドベクターにそれぞれ組み込むことにより作製したHCV-DNAワクチン（HCV-N25）をprimeワクチンとして使用した。これらのワクチンのコントロールとしてHCV遺伝子領域を含まないDNAワクチン（empty）をコントロールとして使用した。また、DNAワクチンに組み込んだ配列と同じ配列をワクシニアウイルスLC16m8株に組み込んだ組換えワクシニアウイルス（rVV）であるrVV-N25をboostワクチンとして使用した。

（3）免疫方法

25 μ lのPBSに懸濁した100 μ gのDNAワクチンをマウスの下腿部筋肉に投与後、エレクトロポレーション（50 V, 99 msec, 8 times）を2週毎に2回投与した。さらにboostとしてワクシニアウイルスをDNA投与後2週間目にワクシニアウイルス 1×10^8 pfu/50 μ lで皮下投与した。最終投与後2週目に脾臓、肝臓を回収し解析を行った。

（4）ELISPOT法による特異的細胞性免疫誘導能の測定

赤血球溶血処理を行った脾細胞（ 1×10^5 ）または、脾細胞を磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いて分離したCD8⁺、CD4⁺細胞（ 2×10^5 ）を予めマイトマイシン処理を行った刺激細胞（HCVの各遺伝子部位を過剰発現した腫瘍細胞（EL-4/E2, /NS2, /N3-4A））（ 1×10^4 ）で刺激し、37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂インキュベーター中で48時間培養、HCV抗原特異的IFN- γ 産生細胞をELISPOT法により測定した。

（5）肝臓の解析

ワクチンを投与した後、肝臓を回収し、肝臓組織抽出液の作製並びにホルマリン固定を行った。肝臓組織抽出液中のHCVコア蛋白質発現量は市販のHCV抗原ELISAキット（Ortho Clinical Diagnostics）を用いて定量した。ホルマリン固定した肝臓片はパラフィン包埋後、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

研究分担者（小原恭子）

ツパイ肝臓からDNAを精製し、全ゲノムの配列を次世代シーケンサーで決定した。独自のプログラムを用いた相同性解析から、各遺伝子ORFの配列を決定した。

生後約1年のツパイにHCV genotype1b, 2a, 4aのウイルスを 5×10^4 – 2×10^8 腹腔内に接種した。また、免疫力の弱い新生児のツパイにもgenotype 4a(5×10^4)のHCVを腹腔内に接種した。HCVを接種したツパイは2週間おきに0.5mLずつ採血し、HCV-RNA量を定量PCRで測定すると共に、ALT値を測定した。

研究分担者（押海裕之）

ヒト肝臓由来の細胞と遺伝子型1bのHCVウイルスのレプリコンと、遺伝子型2aのヒト培養細胞に感染可能なHCV JFH1株を用いた。また、マウス動物モデルとして、自然免疫応答に関与する遺伝子のノックアウトマウスを用い、HCVのRNAをマウス肝臓内へ導入するためにハイドロダイナミック法を用いた。

研究分担者（鈴木亮介）

(1) 抗体および血清の中和活性の評価

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を段階希釈し、遺伝子型の異なる複数の株由来の HCV エンベロープ蛋白質を持つ感染性 HCVtcp とそれぞれ混合し、室温で 1 時間反応させた後に Huh7.5.1 細胞に添加した。2 日後の培養上清の 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。

(2) 中和抗体のエピトープの同定

中和活性を示した抗体のエピトープを同定する為に、HCV エンベロープ蛋白質由来のアミノ酸配列をオーバーラップさせて合成した 20aa のペプチド鎖をプレートに固相化させ、抗体を反応させる事により抗体のエピトープを決定した。

(3) 中和エピトープを有するウイルス粒子の産生

同定されたエピトープ配列を日本脳炎ウイルス (JEV) の E 蛋白質に挿入し、prM-E 領域を発現させる事により、HCV エピトープ配列を持った JEV subviral particle を産生させた。

(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)

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。

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) を発現する M2M ϕ が優位に存在している事が示された。

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 M2M 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明らかとなった。

研究分担者（保富康宏）

1) HCV 遺伝子発現 DNA (HCV-N25) ワクチンとワクシニアウイルス (rVV-N25) の作製

pCAGGS プラスミドベクターに HCV の非構造蛋白遺伝子領域を組み込んだ HCV-DNA ワクチン (HCV-N25) および組み換えワクシニアウイルス (rVV-N25) を作製した。

(2) ELISPOT 法による prime/boost ワクチンの細胞性免疫誘導能についての検討

HCV-N25 ワクチンおよび rVV-N25 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。コントロール群由来の脾細胞は刺激後、何ら特異的なスポットを示さなかったが、HCV-N25 投与群由来の脾臓細胞では、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。また、prime/boost 群においても同様に EL-4/E2, /NS2, /N3-4A 細胞に対し、IFN- γ を産生することを確認した。

(3) HCV 部分長遺伝子発現 C 型肝炎モデルマウスを用いた *in vivo* における HCV 特異的細胞性免疫誘導能の評価

HCV 蛋白を 3 ヶ月間持続的に発現させた CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに prime/boost ワクチンを投与し、脾臓細胞中の HCV 抗原特異的 IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により測定したところ、C56BL/6 マウスを用いた場合と異なり、HCV-N25 群および prime/boost 群由来の脾臓細胞で EL-4/N3-4A 細胞に対する反応のみが見られた。EL-

4/N3-4A 細胞に対する特異的 IFN- γ 産生細胞数は HCV-N25 のみを投与した群に比べ、rVV-N25 による prime/boost ワクチンを行った群の方が有意に高かった。さらに、肝臓中の HCV コア蛋白発現量を測定したところ、empty 投与群に比べワクチン投与群全てにおいて、肝臓中コア蛋白発現量が減少しており、prime/boost 群が最もコア蛋白発現量を減少させていることを確認した。また、肝臓の形態学的検索を行ったところ、HCV 蛋白を 3 ヶ月間持続的に発現させた CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスの肝臓では、肝細胞の膨化や索状配列の乱れなどの形態学的異常が多数観察されるが、ワクチン投与群においてそれらの異常が改善され、特に prime/boost 群でその改善が顕著であったことを確認した。

(4) HCV 全長遺伝子発現 C 型肝炎モデルマウスを用いた *in vivo* における HCV 特異的細胞性免疫誘導能の評価

CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスを用いた場合と同様に、HCV の全長遺伝子をコードしている RzCN5-15^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスにワクチンを投与し、脾臓細胞中の特異的 IFN- γ 産生能を測定した。CN2-29^(+/-)/MxCre^(+/-) マウスに投与した場合と異なり、prime/boost 法によるワクチン投与を行っても特異的細胞性免疫の増強は見られなかった。しかしながら、肝臓中のコア蛋白発現量は HCV-N25 ワクチン投与群に比べて、rVV-N25 投与群と prime/boost 投与群では有意に減少しており、形態学的検索においても prime/boost 群で改善が見られた。

研究分担者（小原恭子）

研究代表者と共にツパイ全ゲノムの解析を進め2匹のツパイに関して全ゲノム情報が明らかとなった。その結果、遺伝子により相同性が異なり、分子群により異なる進化をしている可能性が考えられた。HCV感染レセプターである、CD81, SR-BI, claudin1, occludin 1はヒトのホモログと相同性が高く Missing Link となっている可能性が明らかとなった。

ツパイの飼育・繁殖法が確立し、15匹中15匹の♀が出産できた。成獣のツパイにHCV genotype1b, 2a, 4aのウイルスを接種し6ヶ月程度経過を観察している。いずれの遺伝子型を接種したツパイにおいてもHCVの一過性増殖が観察された。また、ALTの一過性上昇も見られたが、特に genotype 2aと4aを接種したツパイでの高い上昇が見られ、肝炎を起こしていると考えられた。さらに、新生児のツパイに最も増殖の良かった genotype 4aを接種して経過を観察している。

研究分担者（押海裕之）

ヒト肝細胞のHuH-7株由来の細胞と、遺伝子型1bと2aのHCVウイルス、またはレプリコンを用い、HCVのNS3-4Aプロテアーゼが、Riplet ユビキチンリガーゼの活性中心であるRINGフィンガードメインを切断することを発見した。このRiplet ユビキチンリガーゼは、HCV感染時の自然免疫応答においてI型インターフェロンやIII型インターフェロン産生に必須であることから、HCVのNS3-4AによるRiplet分子の切断が、宿主の自然免疫応答の抑制に大きな役割を果たしていると考えられる。

HCV感染時のIII型インターフェロン産生経路としてこれまで、ヒトのBDCA3陽性の樹状細胞においてTLR3依存的な経路が重要であると報告されていた。我々はマウス動物モデルを用い、ヒトのBDCA3陽性樹状細胞に相当するマウスCD8陽性樹状細胞では、TLR3依存的経路以外にも、RIG-I依存的な経路が働くこと、また、この経路が生体内に於いて非常に重要であることを解明した。

一方で、III型インターフェロンの重要生が注目されているものの、I型インターフェロンとの相違点については未だ十分に解明されていない。我々は今回、III型インターフェロンはT細胞やNK細胞の細胞傷害活性を誘導せずに、肝細胞内のウイルスの排除を促す働きを持つことを解明した。また、III型インターフェロンによるパラクラインやオートクラインがIII型インターフェロンの十分な産生に非常に重要であることも解明した。

研究分担者（鈴木亮介）

(1) 中和活性を有する抗体の同定

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、遺伝子型の異なる複数の株のHCVtcpに対して中和活性を示すE1モノクローナル抗体を見いだした。

(2) 中和抗体のエピトープの同定

中和活性を示した抗体をオーバーラップペプチドに反応させ、抗体と強く反応する12アミノ酸の領域を明らかにした。

(3) 中和エピトープを有するウイルス粒子

の産生

同定されたエピトープ配列に対する抗体を誘導する為の抗原を効率良く調製する為に、JEV の subviral particle 産生系を利用した。JEV の E 蛋白質中にエピトープ配列を挿入したプラスミドを作製し、293T 細胞に導入して発現させたところ、エピトープ配列が挿入された subviral particle が培養上清に分泌される事を確認した。

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)

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 C 型肝炎モデルマウスでは、本来抗炎症に働くと考えられていた M2M ϕ が炎症性サイトカインを産生していた。

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 M2M ϕ が減少する事が主要因であることが明らかとなった。

(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 感染症は慢性感染症であり、病態の進行には長期の時間が必要である。さらに進行せずに寛快する例もあることから、生体の免疫反応での病態制御は可能であると考えられる。組み換えウイルスワクチンによる手法は目的とする抗原に比較しベクターウイルスに対する免疫反応が大きく、頻回投与が困難であることが問題である。一方、DNA ワクチンはベクターに対する免疫反応が誘導されないが、組み換えウイルスワクチンと比較すると十分な免疫反応が得られないことが多く報告されている。

prime/boost ワクチンはこの両者の欠点を補い、現在考えられているワクチン投与方法では最も期待されている。本研究においてもどちらか一方の免疫以上に prime/boost は効果的であることが認められた。以上の事から、この手法をさらに詳細に検討することが今後の治療に新たな展開を与える可能性が示唆された。

(小原恭子)

ツパイの HCV レセプター分子がヒトホモログに高い相同性を示した事に一致して HCV genotype1b, 2a, 4a のいずれもツパイにおいて増殖能を示した。しかしながら、これらの血清中ウイルス量はあまり高くなかった。今後は、ツパイ肝臓キメラマウスを用いて HCV を継代し、ツパイ肝細胞に馴化した HCV 株を得る。また、ウイルスの接種法についても皮下接種が良いという報告もあり、接種法の検討を進める。

(押海裕之)

C 型肝炎患者では HCV ウイルスが持続感

染するために自然免疫応答が抑制されている。そのためワクチンにとって重要なアジュバントは肝炎患者では十分に働くことができない。今回、HCVのNS3-4Aプロテアーゼが、自然免疫応答活性化に重要なRipletユビキチンリガーゼを切断することを解明したことから、現在承認されているテラプレビル等のプロテアーゼ阻害剤は、担にウイルスの排除を促すだけでなく、肝炎患者の自然免疫応答の抑制を解除し、ワクチンに使用するアジュバントの効果を高めることが期待される。

III型インターフェロンによるオートクラインやパラクラインが、細胞によるIII型インターフェロンの十分な産生に非常に重要であることを証明し、TLR3ではなくRIG-I経路を活性化することを解明した。このことから、III型インターフェロンが、TLR3をターゲットとしたアジュバントではなく、RIG-Iをターゲットとしたアジュバントの効果を高める働きをすると期待される。

(鈴木亮介)

HCV中和エピトープ解析についてはE2蛋白質について多く報告されているものの、E1蛋白質の中和エピトープについては報告が少なく、我々が同定したエピトープ領域については未報告である。このエピトープに反応する抗体を効率良く誘導する抗原を調製する為に、中和エピトープ配列を持ったフラビウイルス粒子を293T細胞で発現させ、粒子の培養上清への分泌が確認された。今後、この抗原を精製してマウスに免疫し、中和活性を持つ抗体が誘導できる

かどうかを評価する。

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蛋白排除機構が働いていることが示唆された。また、慢性肝炎症状の正常化は肝臓におけるM2Mφの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。

HCVの非構造蛋白領域を発現するDNAワクチン(HCV-N25)および組み換えワクシニアウイルス(rVV-N25)を用いたprime/boostワクチン接種法はC型肝炎モデルマウスを用いた実験の結果より、HCV-N25またはrVV-N25ワクチン単独投与に比べても治療用ワクチンの投与プロトコールとして更なる有用性が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。HCVウイルスによる宿主自然免疫抑制メカニズムとして新たに、HCVのNS3-4AによるRipletユビキチンリガーゼ切断というメカニズムを解明した。

III型インターフェロンの新たな産生メカニズムと新たな作用機序を解明した。これらの知見をもとに、ワクチンに使用する

アジュバント開発の為の重要な知見を得ることが出来た。

な し

また、HCV 自然感染・発症モデルであるツパイの全ゲノム配列を決定し、その特徴を明らかにし、ツパイの飼育・繁殖法を確立した。さらに HCV genotype 1b, 2a, 4a がツパイに感染する事が明らかとなった。今後は新生児への接種など検討し、HCV を高ウイルス量で持続感染する系を樹立する予定である。

さらに、適切な HCV の中和抗体の評価が可能な 1 回感染性トランスパッケージング型 HCV 粒子 (HCVtcp) 産生系を用い、幅広い遺伝子型の HCV に対して中和活性を有する抗 E1 モノクローナル抗体を見いだした。この抗体のエピトープ領域を同定し、さらにこのエピトープ配列を有する JEV subviral particle の産生に成功した。

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

な し

2. 実用新案登録

な し

3. その他

II. 分担研究報告

慢性肝炎病態とワクチン治療効果の解析

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： HCV HCV遺伝子をスイッチング発現させたCre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスは、急性肝炎から慢性肝炎状態に移行した。Cre/loxP/HCV-MxCre Tgマウスは正常な免疫応答下で持続的にHCV蛋白を発現させることができ、慢性肝炎を発症させることができるHCV持続感染モデルとして非常に有用であり、これまで困難とされていたHCVの持続感染化と宿主の免疫応答の関係を解析することを可能にした。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HCV遺伝子組換えワクチニアウイルス（HCV-rVV）を構築し、このHCV-rVVをHCV/Cre-Tgマウスに接種した。接種後1週で慢性肝炎の病態が改善し、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組織異常の正常化がみられた。さらに、肝臓内HCV蛋白質を肝障害を起こすことなく著しく減少させることができ、これはHCVに対する治療ワクチンの有効性を示唆していた。この慢性C型肝炎の病態はIL-6R抗体やTNF抗体を投与したところ正常化した事から、肝臓における炎症性サイトカイン（IL-6, TNF α ）がC型慢性肝炎に関与していることがわかった。さらにrVV-N25はIL-6, TNF α を産生するM2M ϕ を肝臓内から減少させていることが明らかとなった。

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) を発症する事をこれ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。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。

(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

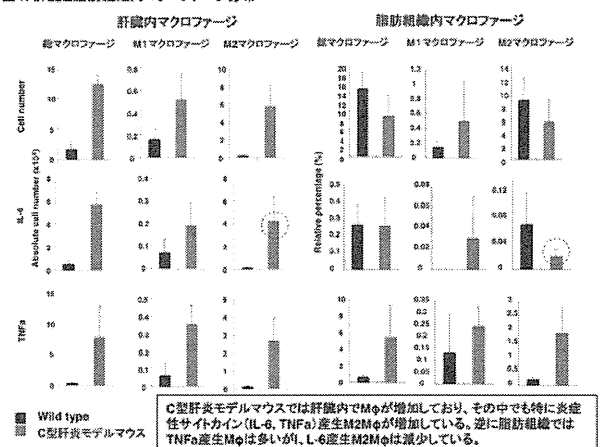
ALTの上昇を認めた。約90日後ではリンパ球の浸潤像、steatosisなどの慢性肝炎の所見を肝組織でみとめ、600日後では雄に有意に肝細胞癌が発症していた。

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。

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) を発現する M2M ϕ が優位に存在している事が示された (図1)。

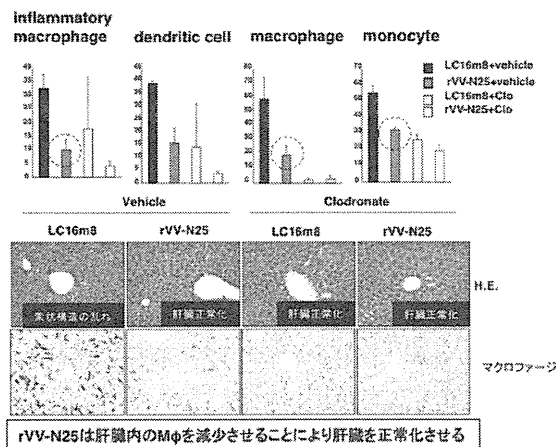
図1. 肝臓と脂肪組織内マクロファージ分布



C型肝炎モデルマウスでは肝臓内でM ϕ が増加しており、その中でも特に炎症性サイトカイン (IL-6, TNF α) 産生M2M ϕ が増加している。逆に脂肪組織ではTNF α 産生M ϕ は多いが、IL-6産生M2M ϕ は減少している。

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 M2Mφ 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 (c1o) で枯渇させたところ、肝臓の病態が改善し、さらに rVV-N25 と C1o との併用でも肝臓の病態が正常化する事が明らかとなった (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では、本来抗炎症に働くと考えられていた M2Mφ が炎症性サイトカインを産生していた。

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 M2Mφ 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蛋白排除機構が働いていることが示唆された。

また、慢性肝炎症状の正常化は肝臓における M2Mφ の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) Yuri Kasama, Takuo Mizukami, Hideki Kusunoki, Jan Peveling-Oberhag, Yasumasa Nishito, Makoto Ozawa, Michinori Kohara, Toshiaki Mizuochi, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. B-cell-intrinsic Hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- κ B signaling. *PLoS ONE* (2014) in press.
- 2) Masaaki Arai, Yuko Tokunaga, Asako Takagia, Yoshimi Tobita, Yuichi Hirata, Yuji Ishida, Chise Tateno, Michinori Kohara. Isolation and characterization of highly replicable hepatitis C virus genotype 1a strain HCV-RMT. *PLoS ONE* 8(12):e82527. (2013).
- 3) Takeshi Wada, Michinori Kohara and Yasuhiro Yasutomi. : DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. *Vaccine* 31(50):5968-74 (2013)
- 4) Asao Katsume, Yuko Tokunaga, Yuichi Hirata, Tsubasa Munakata, Makoto Saito, Hitohisa

- Hayashi, Koichi Okamoto, Yusuke Ohmori, Isamu Kusanagi, Shinya Fujiwara, Takuo Tsukuda, Yuko Aoki, Klaus Klumpp, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Ahmed El-Gohary, Masayuki Sudo, Michinori Kohara : A Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes. *Gastroenterology* 145(4):865-73 (2013)
- 5) Kazuya Shiogama, Ken-ichi Inada, Michinori Kohara, Hidemi Teramoto, Yasuyoshi Mizutani, Takanori Onouchi and Yutaka Tsutsumi. : Demonstration of hepatitis C virus RNA with high sensitivity in situ hybridization employing a locked nucleic acid probe in humanized liver of infected chimeric mice and in needle-biopsied human liver. *Int. J. Hepatol.* ID249535, 7pages doi.org/10.1155/2013/249535 (2013)
- 6) Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Kazuhiro Kimura, Masayuki Saito and Michinori Kohara: 4E-BP1 regulates the differentiation of white adipose tissue. *Genes to Cells* 18(7):602-607 (2013) DOI: 10.1111/gtc.12059
- 7) Shinichiro Nakagawa, Yuichi Hirata, Takeshi Kameyama, Yuko Tokunaga, Yasumasa Nishitoh, Kazuko Hirabayashi, Junichi Yano, Takahiro Ochiya, Chise Tateno, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Kazuaki Inoue, Makoto Yoshida, Akinori Takaoka and Michinori Kohara: Targeted induction of interferon- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLoS ONE* 8(3):e59611(2013)
- 8) Watanabe T., Sugauchi F, Tanaka Y., Matsuura M., Yatsushashi H., Murakami S., Iijima S., Iio E., Sugiyama M., Shimada T., Kakuni M., Kohara M., Mizokami M. 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* 62(9):1340-6 (2013)
- 9) Aoki J., Kowazaki Y., Ohtsuki T., Okamoto R., Ohashi K., Hayashi S., Sakamaki S., Kohara M., Kimura K. : Kinetics of peripheral hepatitis B virus-specific CD8⁺ T cells in patients with onset of viral reactivation. *J. Gastroenterology* 48(6):728-37 (2013)
- 10) Yasui F., Sudoh M., Arai M., Kohara M.: Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication. *J. Medical Virology* 85(2):241-9 (2013)
2. 学会発表
1. Kyoko Tsukiyama-Kohara., Yutaka Amako., Michinori Kohara.: Chronic hepatitis C Virus model in *Tupaia belangeri*. HCV Animal Models and Vaccine Development 2013.5.17 Tallinn (Estonia)
2. Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Tomoko Fujiyuki, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Yasushi Itoh, Kazumasa Ogasawara, Shosaku Hattori, Chieko Kai, Michinori Kohara: Protection of cynomolgus monkeys from H5N1 HPAI virus challenge by recombinant influenza vaccine based on vaccinia virus vector. Options for the Control of Influenza VIII 2013.9.5-10. Cape Town (South Africa)
3. 徳永優子、平田雄一、棟方翼、斉藤誠、須藤正幸、小原恭子、小原道法：宿主因子阻害剤NA808と直接的複製阻害剤の併用による抗HCV活性 第72回日本癌学会学術総会 2013. 10. 3-5. パシフィコ横浜
4. Yuko Tokunaga, Asao Katsume, Tsubasa Munakata, Makoto Saito, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara : Anti-HCV activity of host inhibitor NA808 with DAAs. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2013.10.6-10. Melbourne (Australia)
5. Tsubasa Munakata, Takeshi Haraguchi, Hideo Iba, Michinori Kohara. : A crosstalk between HCV replication and host lipogenesis is mediated by miRNAs. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2013.10.6-10. Melbourne (Australia)
6. Takahiro Ohtsuki, Kiminori Kimura, Yuko Tokunaga, Michinori Kohara. Tissue macrophages are responsible for inflammatory liver disease in the hepatitis C virus transgenic mice. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2013.10.6-10. Melbourne (Australia)
7. Naoki Yamamoto, Yuichi Hirata, Tsubasa Munakata, Chihiro Yamasaki, Chise Tateno, Michinori Kohara. : Establishment of efficient HBV infection and replication system *in vitro*. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 2013.10.21. Shanghai (China)
8. Kyoko Tsukiyama-Kohara, Yuichi Hirata, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara. Development of *Tupaia belangeri* for small animal infection model of hepatitis B virus, according to the genomic

research. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses 2013.10.20-23. Shanghai (China)

9. Makoto Saito, Makoto Ozawa, Fumihiko Yasui, Toru Sasaki, Tsubasa Munakata, Yoshimi Tobita, Risa Ito, Keisuke Munekata, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Akira Sakurai, Futoshi Shibasaki, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida, Patrick C Reid, Kiichi Kubota, Hiroaki Suga, Michinori Kohara: Influenza viral hemagglutinin-targeted macrocyclic peptides as an antiviral agent. 7th Vaccine & ISV Congress 2013.10.27-29 Barcelona (Spain)

10. 棟方 翼、原口 健、伊庭英夫、小原道法：マイクロRNAによるC型肝炎ウイルス複製制御と宿主脂肪酸合成経路のクロストーク 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 10 神戸

11. 安井文彦、桑原一彦、飛田良美、棟方 翼、斉藤 誠、七戸新太郎、迫田義博、喜田 宏、阪口薫雄、小原道法：GANPトランスジェニックマウスを用いたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスHA に対する汎クレード高親和性中和単クローン抗体の開発 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 10 神戸

12. 安井文彦、桑原一彦、飛田良美、棟方 翼、斉藤 誠、七戸新太郎、迫田義博、喜田 宏、阪口薫雄、小原道法：GANPトランスジェニックマウスを用いたH5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスHAに対する汎クレード高親和性中和単クローン抗体の開発 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 10 神戸

13. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、小原道法、松岡雅雄：組換えウイルスを用いた抗HTLV-1ワクチンの作製とMacaque属での応用 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 10 神戸

14. 徳永優子、棟方 翼、斉藤 誠、勝目朝夫、須藤正幸、小原道法：肝臓選択的セリンパルミトイル基転移酵素阻害剤による抗HCV作用 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 12 神戸

15. 大槻貴博、木村公則、徳永優子、林 幸子、小原道法：C型肝炎トランスジェニックマウスにおいて肝臓内組織炎症性M2マクロファージが慢性肝炎を引き起こす 第61回日本ウイルス学会 2013. 11. 12 神戸

16. 安井文彦、宗片圭祐、倉石 武、服部正策、藤幸知子、米田美佐子、迫田義博、喜田 宏、甲斐知恵子、小原道法：カニクイザルのH5N1高病原性トリインフルエンザ組換えワクチニアワクチンの単回接種による長期防御効果の検討 第17回日本ワクチン学会 2013. 11. 30-12. 1 三重

17. 宗片圭祐、安井文彦、伊藤 靖、石井孝司、七戸新太郎、喜田 宏、小笠原一誠、小原道法：ワクチニアウイルスDis株を母体としたインフルエンザHA組換えワクチンの混合接種によるカニクイザルでの発症防御効果 第17回日本ワクチン学会 2013. 11. 30-12. 1 三重

18. 小原道法：ワクチニアLC16m8株 (HCV, SARS, Influenza) ベクター 第17回日本ワクチン学会学集会 2013. 11. 30 (三重)

19. Naoki Yamamoto, Tsubasa Munakata, Yasumasa Nishito, Yuji Ishida, Michinori Kohara: Analysis of HBV persistent infection and replication *in vitro*. 第36回日本分子生物学会 2013.12.3-6 神戸

20. Kimura Kiminori, Kohara Michinori: Tissue macrophages are responsible for inflammatory liver disease in the hepatitis C virus transgenic mice. 第42回日本免疫学会 2013.12.12 千葉

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

なし