

C 株ではアポトーシス刺激に対して抑制的に働く何らかの因子が有る可能性が考えられた。今後、HBV が関わるアポトーシス抵抗性について検討を行い、そこに関わ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することで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) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. World J Gastroenterol, in press.

### 2. 学会発表

1) 山田典栄, 四柳宏, 池田裕喜, 小林稔, 奥瀬千晃, 森屋恭爾, 安田清美, 鈴木通博, 伊東文生, 加藤孝宣, 脇田隆字, 小池和彦. 国内感染と考えられるB型急性肝炎genotype Hの一例. 第17回日本肝臓学会大会. 東京. 2013. 10. 9-10.

2) 山田典栄, 加藤孝宣, 四柳宏. B型急性肝炎症例におけるHBV S領域のアミノ酸変異の検討. 第40回日本肝臓学会西部会. ワークショップ4 ; 急性B型肝炎. 岐阜. 2013. 12. 6-7.

3) Yamada N, Sugiyama R, Yotsuyanagi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Amino acid polymorphisms of S region of hepatitis B virus in acute hepatitis B patients in Japan. The 64th Annual Meeting of the

American Association for the Study of Liver Diseases, Washington DC, USA. 2013. 11. 1-5.

## 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

TCRクローニングとTCRを用いた細胞治療

分担研究者：村口 篤 富山大学医学薬学研究部免疫学講座 教授

**研究要旨：**我々はヒト末梢血中の抗原特異的プライマリーT細胞から単一細胞レベルで、迅速にヒトTCRを取得するための技術 (hTEC10: human TCR efficient cloning within 10 days)を開発した (Nat Med. 2013 Nov;19(11):1542-6)。しかし、これまでのhTEC10では抗原特異的プライマリーT細胞の検出に抗原ペプチド/MHC四量体を用いており、これら四量体は作製に時間がかかるなど利用に制限があった。そこで、本年度はIFN- $\gamma$ 分泌や活性化マーカーであるCD137 (4-1BB)を指標に抗原特異的プライマリーT細胞の検出およびTCR遺伝子の取得を試みた。その結果、IFN- $\gamma$ 分泌やCD137を指標に取得したTCR  $\alpha/\beta$  遺伝子のうち、85%程度が四量体を用いて取得したTCR  $\alpha/\beta$  遺伝子と一致した。よって、IFN- $\gamma$ 分泌やCD137発現を指標にした検出法でもhTEC10を応用可能であることが確認できた。また、TCR遺伝子の増幅方法をこれまでの5' RACE法からLeader primer法に変更することでクローニング効率を大幅に改善することができた。したがって、本技術はHBV抗原特異的TCRの解析・取得に有効であることが確認された。

A. 研究目的

抗原特異的プライマリーT細胞1個1個からTCR  $\alpha/\beta$  遺伝子をペアで取得できる技術 (hTEC10) の改良を行う。改良点として、1) 抗原ペプチド/MHC四量体を用いない抗原特異的T細胞の検出方法を確立する。2) TCR遺伝子増幅の高効率法を検討する。1) と2) により、hTEC10を用いたHBV抗原特異的TCRの迅速化・効率化を行う。

B. 研究方法

健常人ドナー末梢血リンパ球 (PBL) を抗原ペプチドで刺激し、IFN- $\gamma$  産生やCD137 発現を指標に、抗原特異的 T 細胞を検出・回収した。回収した単一の細胞より

TCR cDNA を増幅した。増幅した TCR 遺伝子の配列を決定し、抗原ペプチド/MHC 四量体を用いて取得した TCR 遺伝子配列と比較した。また、Leader primer を用いる遺伝子増幅法を検討した。

(倫理面への配慮)

血液提供者には、説明文書を用いて研究内容・危険性について十分に説明し、同意を得た (インフォームドコンセント)。また、これらの実験については、富山大学倫理委員会の承認を得て、富山大学医の倫理に関する規則等に従って行った。

C. 研究結果

抗原特異的 T 細胞の検出方法として、

IFN- $\gamma$  産生や CD137 を指標にした場合でもペプチド/MHC 四量体を用いた場合と同様に TCR の取得が可能であることが明らかになった。さらに、TCR 遺伝子増幅に Leader primer 法を用いることで、クローニング効率を大幅に改善することができた。

#### D. 考察

昨年度確立したヒト TCR 遺伝子を迅速且つ効率良く取得する技術 (hTEC10) の更なる高効率化を行った。これにより、本技術は HBV 標的抗原特異的 TCR の解析・取得に応用可能であることが確認された。

#### E. 結論

HBV 感染細胞に対する免疫の状態を明らかにするために、改良した hTEC10 を用いて、HBV 標的抗原に特異的な TCR の同定を進める。同定した TCR のレパトア解析および機能解析を行うことにより、HBV 感染細胞に対する宿主の免疫状態への理解が深まることが期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi E., Kishi H., Ozawa T., Horii M., Hamana H., Nagai T., Muraguchi A.: Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- 2) Kobayashi E., Kishi H., and Muraguchi A.: A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology*, 3(1):

e27258, 2014.

- 3) Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nagai T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., and Muraguchi A.: A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. *Nature Medicine*, 19(11): 1542-1546, 2013.

##### 2. 学会発表

- 1) Kobayashi E, Nakagawa H, Hamana H, Kishi H, Ozawa T, Jin A, Muraguchi A. Cloning and functional analysis of human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-specific TCRs from peptide-vaccinated patients. 第42回日本免疫学会学術集会；2013 Dec 11-13；千葉.
- 2) Hamana H, Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Nakagawa H, Jin A, Muraguchi A. hTEC4 system that enable us to clone TCR cDNA from antigen specific single T cells with in 4 days. 第42回日本免疫学会学術集会；2013 Dec 11-13；千葉.
- 3) Nakagawa H, Kobayashi E, Hamana H, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A. Comparison of  $\alpha$ -fetoprotein-specific TCR repertoires from hepatocellular carcinoma patients after peptide vaccine treatment and healthy donors. 第42回日本免疫学会学術集会；2013 Dec 11-13；千葉.
- 4) 小林栄治, 水腰英四郎, 岸 裕幸, 金子周一, 村口 篤. がん抗原特異的TCR 遺伝子の迅速クローニング法. 第72回日本癌学会学術総会；2013 Oct 3-5；横浜.
- 5) 岸 裕幸, 小林栄治, 水腰英四郎, 小澤龍彦, 浜名 洋, 長井輝美, 中河秀俊,

金 艾順, 金子周一, 村口 篤. 末梢血リンパ球中の抗原特異的CD8<sup>+</sup> T細胞およびT細胞受容体の網羅的・迅速解析. 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会; 2013 Aug 24; 名古屋.

6) Kobayashi E, Mizukoshi E, Kishi H, Hamana H, Nagai T, Ozawa T, Nakagawa H, Jin A, Kaneko S, Muraguchi A. Cloning of human antigen-specific TCRs can confer the candidates for cancer gene therapy. 15<sup>th</sup> International Congress of Immunology; 2013 Aug 22-27; Milan.

#### 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

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
分担研究報告書

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

分担研究者：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NY-ESO-1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。②MAGE-A4特異的TCR遺伝子導入T細胞輸注療法の臨床試験検体を用いて、輸注療法の効果を予測する候補因子を同定した。③独自開発の内因性TCRに対するsiRNAを搭載した新規レトロウイルスベクターを用いて、非自己リンパ球を用いたTCR遺伝子導入リンパ球輸注療法が可能と

なることを検証した。

(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

①各種固形腫瘍や一部の白血病に発現する腫瘍抗原である NY-ESO-1 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、該当する抗原を発現するヒト腫瘍細胞の成長抑制を確認し、TCR 遺伝子改変 T 細胞輸注療法のインビボ

評価系を改良した。②MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入 T 細胞輸注療法の登録患者の血清中 IL-6, IL-8, IFN-g の濃度が輸注療法の効果と負の相関を示すことが示唆された。③独自開発の内因性 TCR に対する siRNA を搭載した新規レトロウイルスベクターを用いて NY-ESO-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した非自己リンパ球は導入 TCR を発現し腫瘍特異的反応性を獲得するとともに、内因性 TCR 発現低下に伴う非自己反応性の抑制を示し、GVHD の発症抑制が示唆された。

### 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改良され、輸注療法の効果を予測する因子が同定された。また、非自己のリンパ球を用いた TCR 改変 T 細胞輸注療法の可能性が示された。以上の成果は今後本研究にて同定される HBV 感染細胞特異的 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の改良と臨床試験における有効性を期待される患者選別法が示された。また非自己のリンパ球利用の可能性も示された。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) Kageyama S, Wada H, Muro K, Niwa Y,

- Ueda S, Miyata H, Takiguchi S, Sugino S, Miyahara Y, Ikeda H, Imai N, Sato E, Yamada T, Osako M, Ohnishi M, Harada N, Hishida T, Doki Y, Shiku H. Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients. *J. Transl. Med.*, 11:246, 2013.
- 2) Iwami K., Natsume A., Ohno M., Ikeda H, Mineno J., Nukaya I., Okamoto S., Fujiwara H., Yasukawa M., Shiku H., Wakabayashi T. Adoptive transfer of genetically modified Wilms' tumor 1-specific T cells in a novel malignant skull base meningioma model. *Neuro. Oncol.* 15(6):747-58, 2013.
- 3) Asai H, Fujiwara H, Kitazawa S, Kobayashi N, Ochi T, Miyazaki Y, Ochi F, Akatsuka Y, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Ikeda H, Shiku H, Yasukawa M. Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury. *J Hematol Oncol.* 7:3, 2014.
- 4) 池田裕明、珠玖洋 T細胞輸注療法 – TIL, T細胞クローン, 遺伝子改変T細胞実験医学 増刊 第31巻第12号 179-184 羊土社 2013.
- 5) 池田裕明、今井奈緒子 T細胞輸注療法別冊 医学のあゆみ がんの免疫制御 – 研究と臨床の最前線 117-123 医歯薬出版株式会社 2014.
2. 学会発表
- 1) Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Naoko Imai, Yoshihiro Miyahara, Mikiya Ishihara, Naoyuki Katayama, Hirofumi Yoshioka, Daisuke Tomura, Ikuei Nukaya, Junichi Mineno, Kazuto Takesako, Hiroshi Shiku. In vivo persistence of adoptively transferred TCR gene-transduced lymphocytes with anti-tumor reactivity in patients with MAGE-A4 expressing esophageal cancer. 28<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer. National Harbor, MD, USA, 2013.
- 2) Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Naoko Imai, Yoshihiro Miyahara, Mikiya Ishihara, Yasuhiro Nagata, Naoyuki Katayama, Hirofumi Yoshioka, Daisuke Tomura, Ikuei Nukaya, Junichi Mineno, Kazuto Takesako, Hiroshi Shiku. Adoptively transferred TCR gene-transduced lymphocytes persist with anti-tumor reactivity in patients with MAGE-A4<sup>+</sup> esophageal cancer. ESGCT and SETGyC collaborative congress, Madrid, Spain, 2013.
- 3) Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Makiko Yamane, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazuto Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene therapy with allogeneic T cells. The 4<sup>th</sup> JSH international symposium 2013, Ehime, Japan 2013.
- 4) 池田裕明 T細胞輸注療法 — 遺伝子改変T細胞の利用 — 第17回日本がん分子標的治療学会学術集会 京都 2013.
- 5) 池田裕明 遺伝子改変T細胞輸注療法のトランスレーショナルリサーチ 第41回 日本臨床免疫学会総会 下関 2013.
- 6) Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazuto Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene therapy with allogeneic T

cells 第17回日本がん免疫学会総会  
宇部 2013.

7) Hiroaki Ikeda Adoptive cell therapy with  
antigen receptor engineered T cells. 第72  
回日本癌学会学術総会 横浜 2013.

8) Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Naoko  
Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno,  
Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene  
therapy with allogeneic T cells. 第42回日  
本免疫学会学出総会 幕張 2013.

#### 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

分担研究者：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。前年度（平成24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が、本年度（平成25年度）は新規CTL誘導型ワクチンアジュバントの開発に成功した。

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

Toll 様受容体のリガンドである CpG オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) は、ワクチンのアジュバントとして期待されている。しかしながら、強く自然免疫応答を誘導する CpG ODN は容易に凝集してしまい、臨床試験は限られた CpG ODN でのみ行われて来た。今回我々は、新たに  $\beta$  グルカンである シゾフィラン (SPG) で CpG をくるんだ凝集塊のないナノサイズの新規 CpG ODN の作製に成功した。この CpG と SPG の複合体、CpG-SPG はヒト抹消血単核球に作用し、強力に IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  の産生を誘導した。実際に CpG-SPG はマウスにおいて強力なワクチンアジュバントとして働き、興味深い事にタンパク抗原と混ぜるのみで、強い CTL 活性を誘導する事が出来た。同様にペプチド抗原と混合するのみでの免疫でも非常に強い CD8 T 細胞を誘導することができた。また、この複合体はカニクイザルにおいても、強力なアジュバント活性を示した。

#### D. 考察

今年度は当初の目的であったペプチドワクチンに対する有効なアジュバントの検索とキャラクターゼーションを行うことができたことで、予定より研究が早く進んだ。次年度からは

- 1) 上記新規免疫療法開発の準備：前臨床試験、臨床研究の準備
- 2) ウイルスcccDNAに対する新規免疫療法の in vitro 効果判定のための評価法開発を積極的に進めていく。

#### E. 結論

上記の通り、ペプチドワクチンに最適化されたSPG-CPG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) Kobiyama K, Jounai N, Aoshi T, Tozuka M, Takeshita F, Coban C and Ishii KJ. "Innate Immune Signaling by, and Genetic Adjuvants for DNA Vaccination" *Vaccines* 2013, 1, 278-292; doi:10.3390/vaccines1030278.
- 2) Kuroda E, Coban C, Ishii KJ. Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects. *Int Rev Immunol*. 2013;32(2):209-20.
- 3) Halder SK, Matsunaga H, Ishii KJ, Akira S, Miyake K, Ueda H. Retinal cell type-specific prevention of ischemia-induced damages by LPS-TLR4 signaling through microglia. *J Neurochem*. 2013 126(2):243-60.
- 4) Palacpac NM, Ntege E, Yeka A, Balikagala B, Suzuki N, Shirai H, Yagi M, Ito K, Fukushima W, Hirota Y, Nsereko C, Okada T, Kanoi BN, Tetsutani K, Arisue N, Itagaki S, Tougan T, Ishii KJ, Ueda S, Egwang TG, Horii T. Phase 1b randomized trial and follow-up study in Uganda of the blood-stage malaria vaccine candidate BK-SE36. *PLoS One*. 2013 28;8(5):e64073.
- 5) Kobiyama K, Kawashima A, Jounai N, Takeshita F, Ishii KJ, Ito T, Suzuki K. Role of Extrachromosomal Histone H2B on Recognition of DNA Viruses and Cell Damage. *Front Genet*. 2013 May 23;4:91.
- 6) Tang CK, Aoshi T, Jounai N, Ito J, Ohata K, Kobiyama K, Dessailly BH, Kuroda E, Akira S, Mizuguchi K, Coban C, Ishii KJ. The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant. *PLoS One*. 2013;8(3):e60038. doi:10.1371/journal.pone.0060038.
- 7) Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. DNA vaccines: A simple DNA sensing matter? *Hum Vaccin Immunother*. 2013 2;9(10).
- 8) 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]

9) 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]

10) 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.

## 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

特許出願

発明人: 石井健 小檜山康司 青枝大貴

発明の名称: 免疫賦活活性を有するオリゴヌクレオチド含有複合体及びその用途

出願番号: 特願2013-1962062. 実用新案登録

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特になし

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

分担研究者：水腰 英四郎 金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授

**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治療法を開発を行う。本年度はこれらの研究を遂行するために、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を開発を行う。

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い、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た。これらのペプチドを用いて、エピトープのスクリ

ーニングとしてインターフェロン $\gamma$  ELISPOT アッセイ法を行い、HBV 感染患者末梢血リンパ球に高頻度に認識されるエピトープを同定した。次に、上記検討にて同定されたエピトープについてCTL アッセイを行い、患者末梢血において細胞傷害活性を有するCTLが誘導できるエピトープを選定した。また、ペプチドを用いて、HLA-A24 分子への結合親和性を Binding assay にて検証した。さらに、核酸アナログ製剤によるB型慢性肝炎の治療を受けた症例においては、治療前後における免疫反応の変化をインターフェロン $\gamma$  ELISPOT アッセイ法にて検討した。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しており、本研究に関しては、研究施設

内の倫理委員会として、医学倫理審査委員会の承認を昨年度に取得した。

### 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 種類のエピトープを、結合予測スコアが高い順に選択し、免疫学的解析に用いるためのペプチドを作製した。また陽性コントロールとしてサイトメガロウイルス由来のペプチドを 1 種類と、すでにこれまでに CTL エピトープとして報告されている HBV 由来のペプチドを 4 種類作製した。また、これらのペプチドと 42 例の HBV 感染患者のリンパ球を用いて、ELISPOT アッセイを行った。これまでの結果では、93 種類の HBV 由来ペプチドのうち 47 種類において、少なくとも 1 人以上の患者において陽性反応を認めた。また、このうち 3 例以上において高頻度に陽性反応が認められたペプチドは 6 種類であった。陰性コントロールの HIV 由来ペプチドの陽性率は 0%、陽性コントロールの CMV 由来ペプチドに対する陽性率は 39%であった。上記 6 種類のペプチドを用いて、1つのペプチドにつき、少なくとも 10 例以上の症例で CTL の誘導を試みたところ、2つのペプチドにおいて、CTL の誘導が可能であった。ELISPOT アッセイで計測された末梢血中 CTL の frequency と CTL アッセイにおいて計測された細胞傷害活性の程度は、これまでに報告されているウイルス由来エピトープに対するものと比較して同等であった。20 例の HBV 非感染

者における ELISPOT アッセイによる検討では、HBV 感染者と比べ、ペプチドに対する陽性反応の頻度は低かった。

核酸アナログ製剤による治療前後の免疫反応の検討を 12 例において行ったところ、治療前には陽性反応が見られなかったエピトープに対して、治療後には陽性反応を認めるものが、5 種類のペプチドにおいて観察された。

### D. 考察

本年度の研究結果からは、HBV 由来の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープは、既報のものに加え、さらに多くのものが存在する可能性が示唆された。ELISPOT アッセイ、CTL アッセイ、Binding assay の結果からは、現時点において 2 種類のペプチドが、今後、ワクチンの候補となると考えられた。核酸アナログ製剤による治療は、HBV に対する免疫反応を改善する可能性があり、同治療を受けている症例においてエピトープの検索を行うことが、より効率のよいエピトープスクリーニングになる可能性が示唆された。

### E. 結論

HBV 感染に対する免疫治療の確立のために有用と考えられるエピトープとして、2 種類が候補として選定された。より免疫原性の強いエピトープをさらに対象症例を広げて検索するとともに、これらのペプチドワクチンとしての有用性を今後 HLA-A24 トランスジェニックマウスを用いて検証していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi E., Mizukoshi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nagai T., Nakagawa H., Jin A., Kaneko S., and Muraguchi A.: A novel cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. Nature Medicine, 19(11): 1542-1546, 2013.

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

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
池田裕明、 今井奈緒子	T細胞輸注療法	河上裕	別冊 医学 のあゆみ がんの免疫 制御 -研究 と臨床の最 前線	医歯薬出版 株式会社	東京	2014	117-123
池田裕明、 珠玖洋	T細胞輸注療法 -TIL, T細胞クローン ,遺伝子改変T細胞	河上裕	実験医学 増刊 第31巻 第12号	羊土社	東京	2013	179-184

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M Honda, (金子)	Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes.	Hepatology	-	-	(in press)
T Terashima, (金子)	Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib.	Hepatol Res	-	-	(in press)
M Honda, (金子)	Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma.	BMC Cancer	-	-	(in press)
H Takayama, (金子)	Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P gene via an AMPK-FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes.	J Biol Chem	289(1)	335-345	2014
SS Zeng, (金子)	The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma.	J Hepatol	60(1)	127-134	2014
E Kobayashi, (金子、村口、 水腰)	A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days.	Nat Med	19(11)	1542-1546	2013
M Higashimoto, (金子)	Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression.	Eur J Immunol	43(11)	2956-2968	2013



H Takamura, (金子)	Evaluation of eligibility criteria in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma by $\alpha$ -SMA-positive cancer-associated fibroblasts.	Oncol Rep	30(4)	1561-1574	2013
A Seki, (金子)	Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model.	Hepatology	58(3)	1133-1142	2013
F Arihara, (金子、中本)	Increase in CD14(+)/HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis.	Cancer Immunol Immunother	62(8)	1421-1430	2013
K Kimura, (金子)	Histidine augments the suppression of hepatic glucose production by central insulin action.	Diabetes	62(7)	2266-2277	2013
T Shirasaki, (金子、村上)	MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells.	J Virol	87(9)	5270-5286	2013
T Ueda, (金子)	Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling.	Genomics	101(4)	238-248	2013
T Yamashita, (金子、中本)	Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57(4)	1484-1497	2013
E Mizukoshi, (金子)	Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57(4)	1448-1457	2013
Y Hodo, (金子)	Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C.	Clin Cancer Res	19(7)	1827-1837	2013
T Otda, (金子)	Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver.	Diabetes	62(3)	811-824	2013
T Oze, (金子)	A multicenter survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan.	Hepatol Res	43(1)	35-43	2013
T Yamashita, (金子)	Treatment strategies for hepatocellular carcinoma in Japan.	Hepatol Res	43(1)	44-50	2013

Kosaka K, (今村)	A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of HBV and HCV infections.	Biochem Biophys Res Commun	441	230-235	2013
Nakagawa H, (中本)	In vivo immunological antitumoreffect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequencyablation.	Cancer Immunol Immunother	-	-	(in press)
Hashimoto S, (橋本)	Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells.	J Immunology	190	4076-4091	2013
Komori Y, (石川)	Ursodeoxycholic acid inhibits overexpression of P-glycoprotein induced bydoxorubicininHepG2 cells.	Eur J Pharmacol	724	161-167	2014
Hayashi K, (石川)	A pediatric case of hepatitis B virus subgenotype A2 in Japan.	Clin J Gastroenterol	6	383-385	2013
Hayashi K, (石川)	Pegylated interferon monotherapy in patients with chronic hepatitis C with low viremia and its relationship to mutations in the NS5A region and the single nucleotide polymorphism of interleukin-28B.	Hepatology Res	43	580-588	2013
Honda T, (石川)	Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders.	J Med Virol	85	228-234	2013
Matsubara T, (考藤)	TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepato-cellular carcinoma correlates with angiogenesis.	Hepatology	57	1416-1425	2013
Kodama T, (考藤)	The Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-only Proteins Bim and Bid Are Functionally Active and Restrained by Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins in Healthy Liver.	J Biol Chem	288	30009-30018	2013
Wieland SF, (高橋)	Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro.	Journal of Virology	88(1)	752-757	2014
Yamada N, (加藤)	Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection.	World J Gastroenterol	-	-	(in press)

Kobayashi E, (村口)	Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells.	Biochem Biophys Res Commun	-	-	(in press)
Kobayashi E, (村口)	A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy.	Oncoimmunology	3(1)	e27258	2014
Asai H, (池田)	Adoptive transfer of genetically engineered WT1-specific cytotoxic T lymphocytes does not induce renal injury.	J Hematol Oncol	7	3 (on line)	2014
Iwami K, (池田)	Adoptive transfer of genetically modified Wilms' tumor 1-specific T cells in a novel malignant skull base meningioma model.	Neuro Oncol	15(6)	747-758	2013
Kageyama S, (池田)	Dose-dependent effects of NY-ESO-1 protein vaccine complexed with cholesteryl pullulan (CHP-NY-ESO-1) on immune responses and survival benefits of esophageal cancer patients.	J Transl Med	11	246 (on line)	2013
Kobiyama K, (石井)	Innate Immune Signaling by, and Genetic Adjuvants for DNA Vaccination.	Vaccines	1	278-292	2013
Kuroda E, (石井)	Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects.	Int Rev Immunol	32(2)	209-220	2013
Kobiyama K, (石井)	Role of Extrachromosomal Histone H2B on Recognition of DNA Viruses and Cell Damage.	Front Genet	4	91	2013
Tang CK, (石井)	The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant.	PLoS One	8(3)	e60038	2013
Coban C, (石井)	DNA vaccines: A simple DNA sensing matter?	Hum Vaccin Immunother	2	9(10)	2013

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷