

HBV高感受性ツパイ系統の樹立・獲得免疫系の解析

分担研究者 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長）

研究協力者 高野 淳一郎（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・研究員）

塩釜ゆみ子（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・特任研究員）

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は難治性の疾患であり、有効な治療法も現在のところ確立されていない。HBVのこれらの問題を解決するためには有効な動物モデルの存在が必要であり、現時点ではヒト肝細胞を持つ免疫不全マウスが唯一のモデルとして用いられている。本研究ではHBVの持続感染を示すことが報告されているツパイ (*Tupaia belangeri*) を用いてHBVの感染動態や病態についての解析を行うことを目的に、HBV高感受性ツパイコロニーの作製とその個体における免疫学的な解析を行うことを目的として、ツパイの繁殖・育成方法の検討とHBV感染実験を行ったところ、飼育管理・繁殖・育成方法の確立について良好な結果が得られた。また、HBV感染の成立も確認され、HBV分子クローンも作製された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっている。HBVはヒトと類人猿以外では、ヒト肝細胞キメラマウスでの感染系が知られているが、キメラマウスにおいては機能的な免疫機能が存在しないために、ヒトでの感染を示しているとは考えられない。本研究では、作製したHBV分子クローンもしくはHBV感染ヒト肝細胞キメラマウスの血清を用いて、ヒトと類人猿以外で唯一HBVに自然状態で感受性があり、機能的な免疫系を保持したままでHBV感染を示す

ツパイ (*Tupaia belangeri*) でのHBV持続感染モデルの確立を目的とした。また、ヒトの場合、HBVが垂直感染を起こすため、ツパイにおいても垂直感染が成立するHBV持続感染ツパイ系統の作出も試みる。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、肝障害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

1) 飼育管理

雄10頭と雌20頭を中国より輸入し、こちらの環境に順化させた。通常は昨年度作製した特性ケージにて個別飼育を行っている。飼料は新世界ザル用の固型飼料を基本とし、嗜好性のある副食として、リンゴ、バナナ、ウズラ卵を与えている。固型飼料については、予め粉ミルクとハチミツを混ぜたぬるま湯でふやかして柔らかくしてから給餌している。

(2) ケージ及び巣箱の改良

交配のための雌雄同居の際に、雌が雄から攻撃された場合に逃げ込む場所を確保するため、巣箱が2ヶ所に設置可能な交配時専用のケージの作製を試みた。巣箱についても中の状態が確認しやすく、腐食しにくいプラスチック製巣箱の作製を試みた。

(3) 繁殖・育成

出産予定日がある程度予測する必要性と雄から雌への攻撃の可能性を少なくするため、交配時の雌雄同居は5日間とした。妊娠期間が42～45日であるが、妊娠が成立した場合は4週目から体重が増加するため、体型の変化と合わせて妊娠を確定した。分娩後は仔ツパイの体重を毎日測定すると共に、授乳状況によって人工哺育を行っている。

(4) HBV 感染実験

接種するウイルス株は肝細胞キメラマウス血清で高い力価を持つ Genotype A のウイルス株を用いた。生後24時間以内の仔ツパイの腹腔内もしくは皮下へ 1×10^7 コピー/100 μ L のウイルスを接種した。生後約2ヶ月の仔ツパイでは、静脈内投与により 1×10^7 コピー/100 μ L のウイルスを接種した。接種後、定期的に採血を行い、血清は

使用するまで -80°C で保管した。

血中ウイルス量の検出はS遺伝子に設計された Taqman PCR によって実施した (J Med Virol 2004)。

(5) HBV 分子クローンの作製

ツパイに接種したウイルス株から DNA を抽出した。48クローンの全長 DNA 配列を決定し、コンセンサス配列の決定を試みた。得られたコンセンサス配列を基にして PCR 法によって、2種類の断片のクローンを作製した後に、pUC19ベクターに同時にライゲーションし、HBV ゲノム全長の1.24倍長の分子クローンの作製を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究では動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

(1) 飼育管理

施設にツパイを導入した直後に数頭が死亡したが、それ以降はF1個体も含めて安定して飼育方法が確立された。

(2) ケージ及び巣箱の改良

交配時の雌雄同居用のケージとして、巣箱を2ヶ所に設置可能なケージを作製した。現時点では、同居時の怪我は確認されていない。巣箱の改良によって内部の観察が容易になり、保育行動にも変化は認められていない。

(3) 繁殖・育成

中国より輸入した個体をF0として交配計画を立て実施した。これまでの出生数は68頭、死産・流産を含む死亡数は21頭で、

保育中を含めて離乳できた個体は47頭（雄23頭、雌24頭）であった（表1）。妊娠が確認されていない雌2頭を除くと、妊娠までの平均交配数は1.9回、平均出生数は約3頭で、離乳率は約70%であり、良好な繁殖が確立された。

育成については1頭が保育拒否により、生後3日目から完全な人工保育となった。他の38頭の平均体重と比較して、生後4週辺りまでは低い体重増加であったが、離乳時には同程度まで増加した（図1）。離乳は生後35日を目安に実施した。

(4) HBV 感染実験

生後24時間以内または生後約2ヶ月の個体に、腹腔内、皮下もしくは静脈内に 1×10^7 コピー/ $100 \mu\text{L}$ のウイルスを接種した。これまでに接種した個体数は、34頭で、13頭は非接種のコントロール群とした。接種後は、定期的に採血し血清サンプルを -80°C にて冷凍保存した。そのうち血中ウイルス量の定量解析が終了した9頭では、2個体から HBV ゲノム DNA が検出され、定量結果は 8.2×10^1 コピー/ml と 8.0×10^1 コピー/ml であった。

(5) HBV 分子クローンの作製

ツパイに接種しているウイルス株から全長ゲノム DNA を増幅し、塩基配列決定を行ったところ、48 クローン中 24 クローンが同一配列であった。GenBank に登録されている Genotype A と比較した結果、Subgenotype A2 であると確認された。得られたコンセンサス配列を基に、2 種類の断片を作製し、pUC19 ベクターに組み込むことで分子クローンを作製した（図 2）。

D. 考察

免疫機能を有したまま唯一 HBV 感染モデルと成りえるツパイであるが、実験動物としては確立されていない状態である。本研究では、安定的にツパイを飼育管理・繁殖・育成方法について良好な結果が得られたことにより、安定的にツパイでの研究が推進可能となった。

解析の途中ではあるが、ウイルス接種を行った個体の一部では血中からウイルスゲノムが検出され、HBV 高感受性ツパイ系統の樹立に大きく期待できる。また、遺伝子配列の明らかな分子クローンが作製できたことから、今後は均一な品質のウイルスを使用していくことで、HBV のツパイに対する感受性の詳細な解析が行えると期待できる。

E. 結論

HBV に対して自然免疫を維持したまま感受性を持つツパイにおいて飼育管理・繁殖・育成方法を確立した。また、HBV 感染の成立も確認され、HBV 分子クローンも作製されたことから、HBV 高感受性ツパイ系統の樹立に向けて大きく期待できることとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe K., Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K. and Yasutomi Y. Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by

- intranasal immunization. Vaccine in press
- 2) Kobiyama K., Aoshi T., Narita H., Kuroda E., Hayashi M., Tetsutani K., Koyama S., Mochizuki S., Sakurai K., Katakai Y., Yasutomi Y., Saijo S., Iwakura Y., Akira S., Coban C. and Ishii KJ. A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nano-particulate TLR9 agonist. Proc.Natl.Acad Sci. USA in press
 - 3) Wada T, Kohara M, Yasutomi Y.DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model. Vaccine 2013;31;5968-5974.
 - 4) Kitagawa H, Kawano M, Yamanaka K, Kakeda M, Tsuda K, Inada H, Yoneda M, Sakaguchi T, Nigi A, Nishimura K, Komada H, Tsurudome M, Yasutomi Y., Nosaka T, Mizutani H. Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis. PLoS One. 2013 8(7): e66614
 - 5) Shimozawa N, Ono R, Shimada M, Shibata H, Takahashi I, Inada H, Takada T, Nosaka T, Yasutomi Y.Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species. Differentiation. 2013 85:131-139.
 - 6) Tajiri K, Shimojo N, Sakai S, Machino-Ohtsuka T, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Tsujimura Y, Kimura T, Sato A, Yasutomi Y., Aonuma K.Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice. Cardiovasc Drugs Ther. 2013, 27:413-424.
 - 7) 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. J Gen Virol. 2013 Jun;94(Pt 6):1318-24.
 - 8) 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. Arch Virol. 2013,158:1209-20.
 - 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. 20139(2) 283-290.
 - 10) 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 Infect. 2013 5:56-65.
2. 学会発表
 - 1) Watanabe K, Matsuo K, Yasutomi Y. Intranasal immunization with recombinant

vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed mycobacteria-specific immunity. 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉

- 2) TSUJIMURA Yusuke, YASUTOMI Yasuhiro. The recognition mechanisms of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, in vivo 第42回日本免疫学会学術集会, 2013年, 千葉
- 3) 加藤誠一 保富康宏 松尾和浩. BCGウレアーゼ欠損株を用いたエイズワクチン第3回感染症若手フォーラム 長崎 2014
- 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 抗酸菌分泌抗原を組み込んだ弱毒エイズウイルスの霊長類カニクイザルにおける細胞性免疫反応の解析第61回日本ウイルス学会 神戸 2013年11月10日-12日
- 5) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏. 産地別SPFカニクイザルを用いたサル免疫不全ウイルスのエイズ病態に関する研究第27回日本エイズ学会 熊本 2013年11月20 - 22日
- 6) 保富康宏 インフルエンザウイルス感染におけるヘルパーT細胞 (Th) の病態への関与 「シンポジウム: もっと効くインフルエンザワクチンを目指して」 第54回日本臨床ウイルス学会 2013年6月8-9日 倉敷
- 7) 保富康宏 教育講演: 「ワクチン開発のストラテジー: HIVワクチン・結核ワクチン開発の経験から」 ワクチン開発に必要な研究を取り巻く環境の重要性 第17

回日本ワクチン学会 2013年11月30日-12月1日 津

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

表 1

♀个体番号	♂个体番号	出生数	死亡数	離乳数	保育中
T011305012	T021305001	4	1	3	
	T021305001	3	0	3	
T011305016	T021305003	3	3	0	
	T021305003	2	1	1	
T011305017	T021305002	3	0	3	
	T021305002	3	0	3	
T011305018	T021305004	4	4	0	
	T021305004	3			3
T011305019	T021305005	4	0	4	
	T021305001	3	0	3	
T011305020	T021305004	3	0	3	
	T021305004	3	0	3	
T011305021	T021305010	3	3	0	
T011305023	T021305009	1	0	1	
	T021305009	3			3
T011305024	T021305001	2	2	0	
T011305026	T021305002	4	1	3	
	T021305002	3	2	1	
T011305028	T021305005	4	0	4	
	T021305005	3	0	3	
T011305029	T021305004	3	3	0	
	T021305003	3			3
T011305030	T021305001	1	1	0	
		68	21	38	9

図1 育成期間中仔ツパイの体重の変化

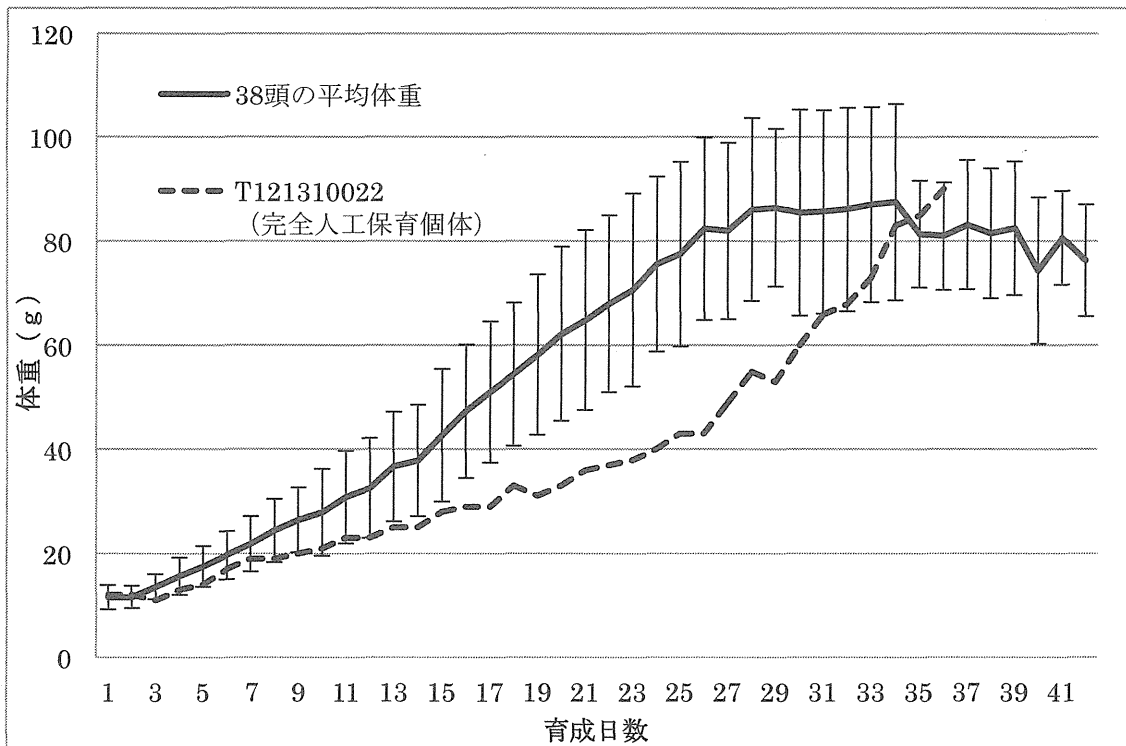
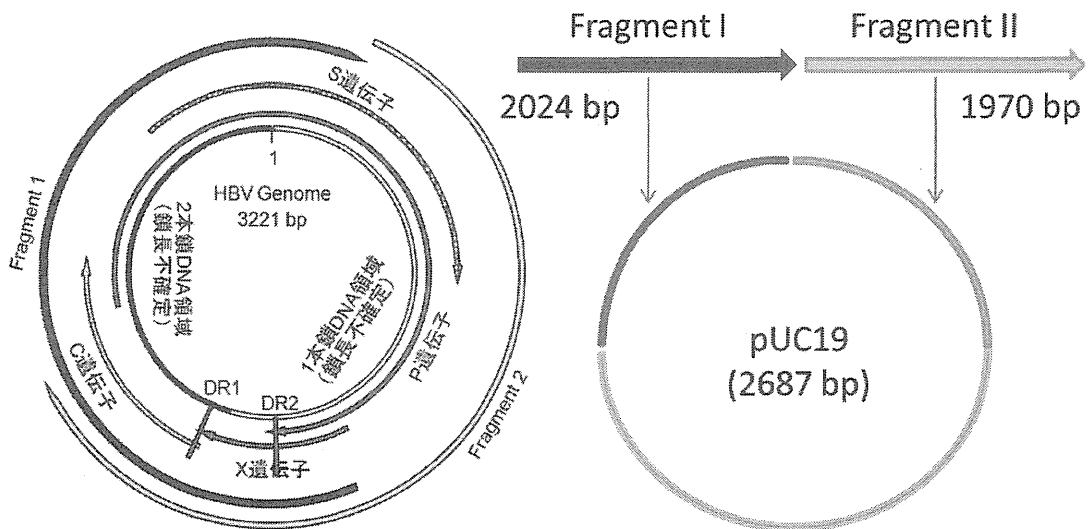


図2 HBV genotype A/ subgenotype A2 の分子クローンの構築



ツパイ免疫学的解析系の確立、感染・発症評価系の改良、効率の良いHBV-ツパイ感染実験
モデルの確立

小原 恭子 鹿児島大学 教授

研究要旨：研究代表者とともにツパイの全ゲノム解析を進め、2匹のツパイの全ゲノム情報を明らかにした。さらに、B型肝炎ウイルス（HBV）感染ツパイのトランスクリプトーム解析を行い、ヒト肝臓との比較を行ってツパイの有用性を明らかにする予定である。また、ゲノム情報にもとづいて免疫反応解析に必要なサイトカイン・ケモカイン・細胞表面マーカー・細胞内シグナル分子など118種類の抗体を作成し、解析用のFACSも導入した。一方でツパイの飼育・繁殖法も確立でき、全ての♀個体から出産できた。また、HBV持続感染系を確立するため、新生児にHBVを接種した。ウイルスの接種による新生児食殺の防止や、ウイルスの接種法の改良など今後効率良いHBV持続感染系の確立に必要ないくつかの課題も明らかとなった。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の動物感染モデルはチンパンジーのみであり、感染実験はヒト肝臓キメラマウスで行われているが、免疫系が不全であり、その反応を研究する事が困難である。ツパイがこれらに変わる動物実験モデルとなれば、ワクチン開発や創薬において極めて強力なツールとなる。本研究では、ヒトに近いゲノム情報を持つツパイを**B型肝炎の実験動物**として樹立する。**B型肝炎の病態解析**が進み、新規治療薬やワクチン、診断薬の開発に大きく貢献すると期待される。

B. 研究方法

2匹のツパイ肝臓からDNAを抽出し、次世代シーケンサーで全ゲノム配列の決定

を行った。これらから予測されるcDNAに基づき、各種免疫系・シグナル分子に対するペプチド抗体を作成した（118種）。

ツパイの繁殖には♀15匹、♂10匹を使用した。♀は15匹全頭出産できたが、♂は10頭中8匹であった。

FACSの解析機器はFACSVerse™(Becton Dickinson)を導入した。

新生児へのHBV接種は、生後0日目に $10^6 \sim 2 \times 10^7$ のHBV, genotype A2, C, Jの腹腔内接種を行った。一部個体では、その後腹腔内か静脈内にHBVの追加接種を行った。生後4週目から各個体0.5mL採血を行ってウイルス量とALT値の測定をした。HBV量は定量PCRで、ALTは測定キット（和光）を用いた。その後2週間隔で測定を継続している。

(倫理面への配慮)

ヒト肝臓細胞を用いた宿主遺伝子発現解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(H16. 12. 28)、組換えDNA実験については、組換えDNA実験指針(H14. 1. 3 1)に基づき、実施する。遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、鹿児島大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会 (H25年 月; 承認番号25010 B型肝炎ウイルスの感染性クローンの作出とORF遺伝子の発現) の承認並びに大臣確認 (H25年12月17日25受文科振第2170号; 遺伝子組換えB型肝炎ウイルスの感染性クローンの作出と実験動物感染) を得ている。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」(H18. 6. 1)に従う。

C. 研究結果

作成した抗体は全てアフィニティー精製され、力価も 50 万倍程度(ELISA 価)のものが得られた。今後は FACS など免疫反応の解析などに主に使用していく。

今年度までに生まれたツパイは 60 匹であり、HBV genotype A2(patient1, patient 4), genotype J, genotype C を接種した。A2 patient1 は 3 匹接種し、A2 patient 4 は 6 匹である。また、J は 3 匹、C は 1 匹接種後、2 週間おきに採血をおこなった。また、生後 18 週になった genotype C 接種個体 1 匹あるいは J 接種個体 2 匹を解剖して解析したところ、全ての個体で脾臓又は肝臓に HBV-DNA が検出された。その他の個体については、さらに血

中のウイルス DNA 量と ALT を継続して測定している。

また、HBV genotype A2 patient 4 の感染クローン作成を行い、90%の核酸配列を決定した。

D. 考察

今年度はツパイの繁殖の確立に成功した。

今年度はツパイでのウイルスの感染を定量 PCR で検出したが、村上班員らによる超高感度 HBs 抗原測定系の感度が良いという結果が得られているため、今後この系を用いてツパイ体内のウイルス遺伝子量と抗原蛋白量の動態を解析する必要がある。

同時に新生児には今年度は主に HBV を腹腔内に接種を行ったが、皮下接種も報告されており、今後投与法の検討を行う予定である。

さらに、ツパイ肝細胞への分化や将来的な遺伝子改変を見据えてツパイ iPS 細胞の樹立にも着手した。

E. 結論

今年度はツパイ免疫系解析に必要な抗体の樹立、FACS の導入を行った。またツパイの繁殖法を確立し、新生児への接種を始めた。今後はより効率の良いツパイ接種法とウイルス検出法を確立すると同時に免疫解析系を樹立する。ゲノム解析の結果も参考にしながら、ツパイをより優れた HBV 感染モデル動物として開発していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kasama, Y., Mizukami, T., Kusunoki, H., Peveling-Oberhag, J., Nishito, Y., Ozawa, M., Kohara, M., Mizuochi, T., Tsukiyama-Kohara, K. B-cell-intrinsic Hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- κ B signalling. *PLOS One*, 2014 accepted.
 - 2) Ezzikouri S, Ozawa M, Kohara M, Elmdaghri N, Benjelloun S, Tsukiyama-Kohara K. Recent insights into hepatitis B virus-host interactions. *J Med Virol.*, 2014 accepted.
 - 3) Katsume A, Tokunaga Y, Hirata Y, Munakata T, Saito M, Hayashi H, Okamoto K, Ohmori Y, Kusanagi I, Fujiwara S, Tsukuda T, Aoki Y, Klumpp K, Tsukiyama-Kohara K., El-Gohary A, Sudoh M, Kohara M. A Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes. *Gastroenterology* 2013, 145(4):865-73.
 - 4) Tsukiyama-Kohara K., Katsume A, Kimura K, Saito M, Kohara M. 4E-BP1 regulates the differentiation of white adipose tissue. *Genes Cells*. Jul;18(7):602-607, 2013.
 - 5) Nakagawa S, Hirata Y, Kameyama T, Tokunaga Y, Nishito Y, Hirabayashi K, Yano J, Ochiya T, Tateno C, Tanaka Y, Mizokami M, Tsukiyama-Kohara K., Inoue K, Yoshiba M, Takaoka A, Kohara M. Targeted induction of interferon- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection. *PLOS One*. 8(3) e59611, 2013.
 - 6) Salem NE, Saito M, Kasama Y, Ozawa M, Kawabata T, Harada S, Suda H, Asonuma K, El-Gohary A, Tsukiyama-Kohara K. Genomic polymorphisms in 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase promoter sequences. *Microbiol Immunol*. Mar;57(3) 179-184, 2013.
2. 学会発表
 - 1) Tsukiyama-Kohara K., Amako Y, Kohara M. Chronic hepatitis C virus model in *Tupaia belangeri* (招待講演), Symposium HCV Animal models and vaccine development, 2013年 5月 (エストニア).
 - 2) 小原 恭子 「C型肝炎ウイルス誘導性酸化ストレスによる肝細胞腫瘍原性亢進」(招待講演), 第24回日本生体防御学会, 2013年 7月 (熊本).
 - 3) Tsukiyama-Kohara, K., Hirata, Y., Sanada T, Yamamoto N., Yasui F, Kohara, M, Development of *tupaia nelangeri* for small animal infection model of hepatitis B virus, according to the genomid research, HBV2013, 2013年 10月 (上海).
 - 4) 金澤伯弘、川畑淑子、永野希織、小原道法、小澤真、小原恭子 ツパイとヒトとの遺伝的相同性の検証, 第156回日本獣医学会学術集会, 2013年 9月 (岐阜大学).
 - 5) Tsukiyama-Kohara, K., Hirata, Y., Sanada T, Yamamoto N., Sayeh, E., Yasui F, Kohara, M. Development of *Tupaia belangeri* for small animal infection model of hepatitis B virus, according to the genomic research 第36回日本分子生物学会 12月 (神戸)
 - 6) Tsukiyama-Kohara K., Kohara M. Tumorigenicity induced by hepatitis C virus.

(招待講演) 第4回新学術領域 発がんス
パイラル国際シンポジウム 2月 (札
幌)

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

ツパイ免疫学的解析系の確立、動物モデルの評価

石井 健 医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクトプロジェクトリーダー

研究要旨：現在、世界中で感染症ワクチンの開発が行われているが、感染症の根絶に資する手法は未だ確立されていない。B型肝炎ウイルスに対するワクチンは存在しており、現在も接種されている。しかしながら、現状のワクチンでは効果が十分ではなく、数回の接種が必要である。そのため、より効果的で安全なワクチンの開発のために、新規アジュバントの開発が重要であると考えられる。本研究では、核酸アジュバントであるCpG ODNと多糖であるβグルカンを用いて、新規アジュバントの開発を試みた。実際に核酸と多糖の複合体が、強力なアジュバントとして働く事をマウスとサルを用いた実験によってあきらかとなった。同時にヒト細胞においても、強力に自然免疫応答を誘導したことから、ヒトへの応用も可能だと考えられる。

A. 研究目的

新たなワクチン開発のため、現在世界中で新規アジュバントの開発が試みられている。実際に、国内ではアルミニウム塩のみがワクチンアジュバントとして用いられている。しかしながら、ウイルスなどの病原体を排除する為の十分な免疫応答を誘導する事が困難であり、新たなアジュバント、特にCTLを誘導し得るアジュバントの開発が行われている。本研究では、新規B型肝炎ワクチン開発を目的とし、核酸と多糖を用いて新たなアジュバントの開発を試みた。

B. 研究方法

本研究では、自然免疫受容体であるToll様受容体9（TLR9）のリガンドであるCpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)と、多糖であるβグルカンとの複合体を作製し

た。この複合体（CpG-SPG）をヒト細胞に処理し自然免疫活性化能を解析した。動物実験として、マウスまたはカンクイザルにインフルエンザスプリットワクチンと共に接種し、アジュバント効果を評価した。マウスにおいては、免疫後インフルエンザウイルスを感染させる事で、感染防御能を評価した。

（倫理面への配慮）

使用された実験動物は、医薬基盤研究所動物実験委員会規程に基づき飼育され、日本動物学会が定めた、苦痛の軽減等に配慮した指針に従って実験を行った。ヒト細胞に関しては、医薬基盤研究所倫理委員会の承認を得た上で、倫理面に配慮し、実験を行った。

C. 研究結果

TLR9のリガンドであるCpG 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βグルカンであるシズフィラン(SPG)でCpG ODNをくんだ凝集塊のないナノサイズの新規複合体の作製に成功した。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- α やIFN- γ 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。インフルエンザワクチンとCpG-SPGをマウスに接種する事で、その後の致死量のインフルエンザウイルス感染を完全に防ぐ事に成功した。CpG ODNに関しては、マウスと霊長類での反応性の違いが懸念されていたため、カンクイザルにインフルエンザワクチンとCpG-SPGを接種し、その後の獲得免疫応答を検討した。その結果、カンクイザルにおいても強力なアジュバントとして働くことがあきらかとなった。

D. 考察

本研究で新たに開発した核酸多糖複合体(CpG-SPG)は強力なアジュバントとして働く事を、マウスとカンクイザルを用いた実験により示した。実際に、臨床で使用されているインフルエンザワクチンのアジュバントとしても効果が高かったことから、新規ワクチンのアジュバントとして有用であると考えられる。また、カンクイザルでの

効果と、ヒト細胞における強力な自然免疫活性化能から、ヒトへの応用も期待される。しかしながら、安全性に関しては証明する事が困難であり、今後製剤化と共に安全性の確立が重要な課題である。また、インフルエンザワクチンのみならず、他のウイルスワクチンへの応用可能かをあきらかにしていくことが、今後の課題である。

E. 結論

今回の研究により、新規アジュバントの開発に成功した。このアジュバントはマウスと霊長類における反応性の違いを克服出来た事から、ヒトへの応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, Kuroda E, Hayashi M, Tetsutani K, Koyama S, Mochizuki S, Sakurai K, Katakai Y, Yasutomi Y, Saijo S, Iwakura Y, Akira S, Coban C, Ishii KJ. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. Proc Natl Acad Sci USA. 2014 Feb 10.
- 2) Ono C, Ninomiya A, Yamamoto S, Abe T, Wen X, Fukuhara T, Sasai M, Yamamoto M, Saitoh T, Satoh T, Kawai T, Ishii KJ, Akira S, Okamoto T, Matsuura Y. Innate Immune response induced by baculovirus attenuates transgene expression in Mammalian cells. J Virol. 2014;88(4):2157-67.
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. DNA vaccines: A simple DNA sensing matter? *Hum Vaccin Immunother.* 2013 2;9(10).
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Tetsutani K, Ishii KJ. Adjuvants in influenza vaccines. *Vaccine*. 2012 30(52):7658-61.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 小檜山康司、石井健. 「TLR とレクチンの共同作用」 *臨床免疫・アレルギー科*, 2013 60(40):454-462
- 21) 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*
- 22) 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)*
- 23) 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)*
- 24) 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*
- 25) 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*
- 26) 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*
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- ## 2. 学会発表
- 1) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG is a novel nanoparticulate CpG oligodeoxynucleotide complex with robust interferon induction and adjuvanticity. 2013 日本免疫学会総会・学術集会. 幕張. 2013.12.11-13.
- 2) Kobiyama K, Ishii KJ. A Dectin-1-assisted APC-targeting TLR9-agonist as an adjuvant. 15th International Congress of Immunology. MILAN, ITALY. Aug 22-27, 2013.
- ## G. 知的所有権の出願・取得状況
- ### 1. 特許取得
- 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

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（平成25年度）

ツパイ自然免疫系の解析

押海裕之、北海道大学大学院医学研究科、講師

研究要旨：自然免疫応答はウイルスの排除に重要である一方で、ウイルスは宿主の自然免疫応答を抑制し感染を成立させる。小型動物モデルとしてのツパイはヒトと同様にHBVに感染できる利点がある。そこで、このツパイ感染モデルを用い、HBV感染時の自然免疫応答について研究を行った。HBV感染後のツパイの各臓器別の自然免疫応答を詳細に調べると、興味深いことに、通常、ウイルス感染後に最初に生じる自然免疫応答であるI型インターフェロン産生は、殆ど観察されなかった。これはヒトの肝細胞を用いた試験管内の実験でも観察されており、これらの結果は、HBVが感染初期のI型インターフェロン産生を抑制する能力が高いことを示している。一方で、我々は、HBVに対する自然免疫応答としてDDX60分子に依存した経路が特に強く活性化していることを発見し、試験管内の反応からDDX60がHBVの複製を抑制することを発見した。今後、このDDX60分子を標的とした治療法の開発が有効であると期待される。

A. 研究目的

自然免疫応答はウイルスの排除に重要であり、また、治療用ワクチンの為の、新たなアジュバント開発に於いても非常に重要である。ツパイはヒトと同様にHBVに感染する小動物である。今回、このツパイ小動物モデルを用い、HBV感染時の生体内における自然免疫応答機構と、HBVによる宿主自然免疫抑制機構の解明を目的として研究を実施した。また、同時に、HBV感染の小動物モデルとしてのツパイの有用性を検討した。さらに、HBVによる自然免疫抑制機構を解明することで、治療用ワクチンに用いる新たなアジュバントとしてどのような自然免疫経路を活性化することが有効であるかどうかについても検討を行った。

B. 研究方法

ツパイにHBVを感染させ、感染後の各臓器に於ける自然免疫関連遺伝子の発現プロファイルを調べ、生体レベルでの自然免疫応答を解明した。また、ヒトやツパイ由来の肝細胞等を用い、HBV感染時の自然免疫応答を試験管内のレベルでも検証した。

（倫理面への配慮）

動物実験は北海道大学の実験動物指針に基づいて行い、遺伝子組換え実験も北海道大学の遺伝子組換え実験指針に基づいて行った。本年度の研究に於いては、ヒトのサンプルを用いておらず、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

HBV 感染後のツパイの各臓器別の遺伝子発現を詳細に調べたところ、通常のウイルス感染で最初に生じる I 型インターフェロンの遺伝子発現上昇は、HBV 感染では観察されなかった。これは、HBV が I 型インターフェロン産生を生体内において効率よく抑制することを示唆している。一方で、自然免疫のどの経路が活性化しているかを詳細に検討したところ、ウイルス DNA を認識する経路は殆ど活性化しておらず、ウイルス由来の RNA を認識する DDX60 経路が肝臓特異的に活性化していることを発見した。また、ヒトの肝細胞を用いた試験管内の反応から、DDX60 分子が HBV の抑制に働くことを示唆する結果を得た。

また、HBV による自然免疫抑制機構についてヒト培養細胞を用いて詳細に調べたところ、細胞質内 DNA 認識経路が抑制されているのに対し、MyD88 依存的な経路は殆ど抑制されていなかった。

ウイルス感染時の自然免疫応答に於いて、TBK1 分子が非常に重要な働きをすることが知られている。我々はツパイとヒトとマウスの細胞を用い、TBK1 分子のリン酸化を活性化の指標として比較検討したところ、この TBK1 の活性化機構には細胞特異性や種得異性があることを発見した。これにより、TBK1 のリン酸化を指標とすることで、ツパイの臓器や組織や細胞のそれぞれに於ける自然免疫活性化機構を特定できると期待される。今後、TBK1 のリン酸化を指標として、HBV 感染後のツパイの各細胞での自然免疫応答経路の活性化状態を検討していく予定である。

D. 考察

ツパイ小動物モデルを用いた実験から、HBV は感染初期から宿主の自然免疫応答を抑制することが示された。一方で、DDX60 分子に依存した経路は、HBV 感染時の肝臓特異的に活性化が観察されたことから、DDX60 を分子標的とした薬剤が、HBV 感染患者に有効であると期待される。

また、HBV による自然免疫抑制の経路を詳細に調べた結果、細胞質内のウイルス DNA 認識経路が抑制されているのに対し、MyD88 に依存した経路はあまり抑制されていなかった。これは、TLR2, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 等の MyD88 によって自然免疫を活性化する経路が B 型肝炎患者に於いても十分に働いていることを示唆しており、上記の TLR を活性化するアジュバントが治療用ワクチンにとって重要であると期待される。

E. 結論

ツパイ動物モデルを用いた解析から、HBV は感染初期から自然免疫応答を抑制し特に I 型インターフェロン産生を阻害していることが解明された。また、HBV 感染初期の自然免疫応答として DDX60 分子に依存した経路は抑制を受けず活性化していた。

培養細胞を用いた試験管内の解析から、MyD88 の経路が抑制を受けておらず、今後、ツパイ動物モデルを用いた生体内での解析により、MyD88 の機能が HBV 感染時に抑制を受けないかどうかの検証が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Suzuki T, Oshiumi H, Miyashita M, Aly HH, Matsumoto M, Seya T. Cell-type specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA. *PLoS One* 8(12): e83639 2013
 - 2) Shime H, Kojima A, Maruyama A, Saito Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J. Innate. Immu.* Oct29 Epub ahead of print 2013
 - 3) Takaki H, Honda K, Atarashi K, Kobayashi F, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M, Shingai M, Seya T. MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150 Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Mol. Immunol.* 57(2): 100-110 2014.
 - 4) Takaki H, Takeda M, Tahara M, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model. *J. Immunol.* 191 (9): 4740-4747 2013
 - 5) Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog.* 9(8) e1003533 2013
 - 6) Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. Toll-IL-1-receptor containing adaptor molecule-1: a signaling adaptor linking innate immunity to adaptive immunity *Prog Mol Biol Transl Sci* 117:487-510 2013
2. 学会発表
 - 1) Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Hepatitis C virus degrades Riplet ubiquitin ligase to escape host innate immune response. International Congress of Immunology Milan (Italy) 2013
 - 2) Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. Hepatitis C virus NS3-4A protease cleaves Riplet ubiquitin ligase to abrogate RIG-I-mediated type I interferon production. 日本免疫学会 千葉 2013
 - 3) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocyte and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. 日本免疫学会 千葉 2013
- G. 知的所有権の出願・取得状況
 1. 特許取得
該当無し
 2. 実用新案登録
該当無し
 3. その他
該当無し

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（平成25年度）

ツパイ高感染性HBVの馴化・選択

村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任助教

研究要旨：ツパイによる新規 B 型肝炎ウイルス（HBV）感染モデル動物の確立を目的として、HBV 高感染株および感染評価系の検討を行っている。特に、HBV 接種後の感染評価において。実験動物より経時的に採取可能な血液量は限られており、極めて少量であることから、微量の血清によるHBV感染評価系を確立した。実際に HBVを感染させたツパイ血清の測定を行ったところ、HBs抗原陽性であることを確認した。

共同研究者氏名

田中靖人

名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス（HBV）には、A-J までの遺伝子型が特定されており、それぞれの臨床病態は異なる。HBV の病態を解析し、新規治療薬を開発するためには、HBV 各遺伝子型を感染させた肝炎モデル動物による長期的かつ詳細な解析が必須である。

今回の研究班では、ツパイを宿主とする HBV 感染試験を行う。現在までに我々は、ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた HBV の感染実験を展開し、クローンによる感染・複製効率の違いや薬剤感受性の違いを検討してきた。この経験に基づき、ツパイへの HBV 感染源候補として、およびツパイにおける HBV 感染の評価系の確立について検討を行うことを目的としている。

前年度までの研究において、ヒト HBV 遺伝子型 J がウイルス遺伝子分子系統解

析の結果、旧世界ザルであるギボンに感染する HBV に近いことが示されたことから、ツパイに遺伝子型 J が感染することを期待して感染源として準備した。また、ヒト HBV 遺伝子型 A は、慢性化しやすいことが明らかにされており、ツパイにおける HBV 慢性持続感染モデルの感染源として遺伝子型 A を候補とした。今年度は、感染評価系のひとつとして、最近開発された高感度および、超高感度 HBs 抗原測定系を用いて微量検体から検出が可能かどうかを検討した。

B. 研究方法

1) HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスより採取した血清と、急性期のHBV 感染患者血清について、HBV-DNA 量を揃えて高感度 HBs 抗原測定系 (HBsAg-HQ (富士レビオ) ; Shinkai N, et al. J Clin Microbiol. 2013) を用いて測定した。

2) ツパイに HBV を接種後、HBV-DNA を検出した血清サンプルについて、超高感度