

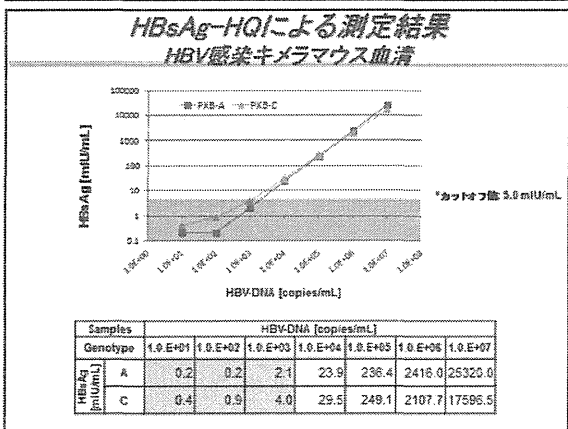
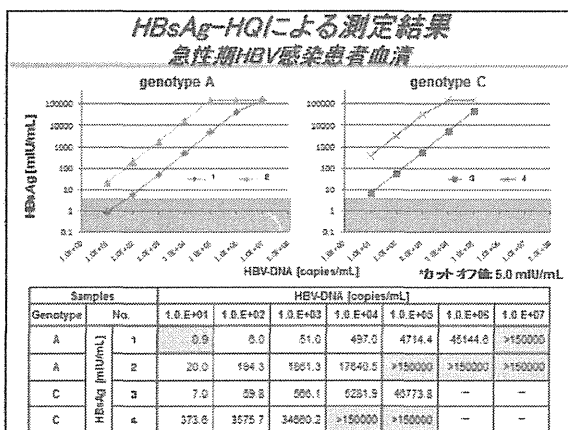
HBs 抗原測定系 (ICT-CLEIA (シスメックス) ; Takeda et al, J Clin Microbiol. 2013)により HBs 抗原が検出できるかを検討した。

(倫理面への配慮)

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

1) 高感度 HBs 抗原測定系による測定の結果、HBV-DNA 量と HBsAg 値は相関を示した。特に患者血清には個体差があり、必ずしもウイルス量に対する HBsAg 値は一定ではないが、患者血清では 10 copy/mL、キメラマウス血清では 10³ copy/ml まで検出できた。



2) 超高感度 HBs 抗原測定系を用いた結果、HBV-DNA を確認したツパイ血清は 2-3 倍希釈で液量を調整することにより HBs 抗原を検出することができた。

D. 考察

高感度および超高感度 HBs 抗原測定系により、低ウイルス量サンプルの HBs 抗原評価の可能性を確認した。今回の検討において患者血清でウイルス量に対する HBsAg 値に個体差が認められた。これは、感染の時相や HBs 抗体価の違いによるものであると示唆された。

HBV 感染キメラマウスにおいては、血清 1-2 μl を測定に用いた。実験動物より経時的に採取が可能な血液量は少量であるため、サンプルを希釈して測定できるこの系は極めて有用である。また、感染初期からの観察が期待できる。

ツパイによる HBV 高感染モデル・肝炎モデルを確立するため、今後はこの測定系を用いてツパイへの高感染 HBV 株の選定を行う。

E. 結論

ツパイより採取できる血液量は少量であるが、微量血清からの HBV 感染評価系として HBs 抗原の超高感度測定系は有効である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami

- S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, Tanaka Y. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in thai population. PLoS One. 2014; 9 (1): e86007.
- 2) Shinkai N, Matsuura K, Sugauchi F, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Ogawa S, Nojiri S, Joh T, Tanaka Y. Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance. J Clin Microbiol. 2013; 51(11): 3484-91.
- 3) Elkady A, Aboufotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, Tanaka Y. Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt. World J. Gastroenterol. 2013; 19 (37): 6214-20.
- 2) 林佐奈衣, 村上周子, 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人: HBV genotype Fにおける肝細胞癌特異的ウイルス変異の同定. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 2013, 神戸市.
- 3) Murakami S, Watanabe T, Omagari K, Inoue T, Iijima S, Hamada-Tsutsumi S, Hayashi S, Tajiri K, Kishi H, Tanaka Y. A novel three-dimensional long-term culture system of primary human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver for hepatitis B virus infection. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai, China.
- 3) Elkady A, Aboufotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, Tanaka Y. Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt. World J. Gastroenterol. 2013; 19 (37): 6214-20.

2. 学会発表

- 1) Hayashi S, Khan A, Simmons B, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Watanabe T, Tanaka Y. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus genotype F in Alaska: A retrospective case-control study. Asian Pacific Association for The Study of the Liver. Mar. 12-15, 2014. Brisbane, Australia.

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

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）

肝細胞を標的とした薬物送達システムの開発

櫻井遊、北海道大学大学院薬学研究院、特任助教

研究要旨：これまで独自の脂質であるYSK05と呼ぶ脂質を用いてきたが、保存安定性に欠けるという問題があった。そのため、リノレイン酸を出発物質として、新規の脂質YSK13の合成を行い、活性の比較を行った。MENDのsiRNAキャリアとしての活性は健常マウスであるICRマウスに対して肝臓実質で発現している血清第七因子に対するsiRNAを投与し、24 h後の血清中の第七因子活性を測定することで評価した。その結果、YSK05の肝臓における50%有効量ED₅₀は0.06 mg/kgであった。HBVのpre-genomic RNA (pgRNA) に対するsiRNAを封入し、細胞に10-90 nMとなるように添加したのちの、HBV-DNA量を測定した。HBV感染ヒト肝臓キメラマウスに対しては、siRNA量として5.0 mg/kgとなるように静脈内投与を行い、2週間血清中HBV-DNA量の測定を行った。また、長期保存安定性試験のために、調製したMENDを4°Cで105日間まで保存し、上記と同様の方法でICRマウスの肝臓での血清第七因子のノックダウン効果を指標として評価した。105日間保存したYSK13を含むMENDは、調製当初と粒子径などの物性に变化は見られなかった。また、このものをマウスに投与した際の血清第七因子の抑制活性も調製当初と変化がなく、保存安定性に優れたシステムの開発に成功した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）感染感受性小動物モデルの開発にあたり、宿主・ウイルスの遺伝子発現を自在に操作し、遺伝子の表現型解析を行うためのツールは非常に重要となる。これまで、*in vitro* の遺伝子の表現型解析において、small interfering RNA (siRNA) が多用されてきた。我々は、*in vivo* の肝臓へと siRNA を送達する技術（MEND）の開発を進めている。健常マウス以外の MEND を用いて siRNA を送達させた実績はない。従来用いてきたシステムを上回る活性を有するシステムの創製により、

ヒト肝臓キメラマウスやツパイの肝臓で遺伝子ノックダウンを誘導可能な siRNA キャリアの開発を目的とした。

B. 研究方法

これまで独自の脂質である YSK05 と呼ぶ脂質を用いてきたが、保存安定性に欠けるという問題があった。そのため、リノレイン酸を出発物質として、新規の脂質 YSK13 の合成を行い、活性の比較を行った。MEND の siRNA キャリアとしての活性は健常マウスである ICR マウスに対して肝臓実質で発現している血清第七因子に対する siRNA を

投与し、24 h 後の血清中の第七因子活性を測定することで評価した。HBV の pre-genomic RNA (pgRNA) に対する siRNA を封入し、細胞に 10-90 nM となるように添加したのち、HBV-DNA 量を測定した。HBV 感染ヒト肝臓キメラマウスに対しては、siRNA 量として 5.0 mg/kg となるように静脈内投与を行い、2 週間血清中 HBV-DNA 量の測定を行った。また、長期保存安定性試験のために、調製した MEND を 4°C で 105 日間まで保存し、上記と同様の方法で ICR マウスの肝臓での血清第七因子のノックダウン効果を指標として評価した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験に関しては、実験前に国立大学法人北海道大学動物実験委員会の審査を受け、実験計画が承認されている。

C. 研究結果

始めに、従来脂質の YSK05 および新規脂質 YSK13 の血清第七因子の阻害活性を比較した。その結果、YSK05 の肝臓における 50%有効量 ED₅₀ は 0.06 mg/kg であった。一方で、YSK13 は 0.015 mg/kg と約 4 倍の活性を示すことが明らかとなった。YSK13 を含む MEND に HBV pgRNA に対する siRNA を搭載し、細胞系およびヒト肝臓キメラマウスにおけるウイルスの抑制活性を評価した。その結果、in vitro・in vivo の両方において約 2 週間ウイルス抑制効果が認められた。また、105 日間保存した YSK13 を含む MEND は、従来の YSK05 の場合とは異なり調製当初と粒子径などの物性に变化は見られなかった。また、このものをマウスに投

与した際の血清第七因子の抑制活性も調製当初と変化がなく、保存安定性に優れたシステムの開発に成功した。

D. 考察

新規に合成した YSK13 は構造的に体内の分解酵素や加水分解の影響を受け辛いことが考えられる。このため、従来の脂質と比較して in vivo の環境でより高活性であり、また溶液での保存で安定性を示したと考えられる。

E. 結論

新規に合成した脂質を含有する MEND は長期保存安定性に優れていることを明らかとした。また、HBV の pgRNA を標的とする siRNA を搭載した MEND を用いることで、in vitro HBV 感染肝細胞および HBV 感染ヒト肝臓キメラマウスにおいて、ウイルス感染を抑制することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yu Sakurai, Hiroto Hatakeyama, Yusuke Sato, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, Noritaka Ohga, Kyoko Hida, Hideyoshi Harashima. RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system. *J Control Release*, 173;110-118 (2014).
- 2) Hiroto Hatakeyama, Manami Murata, Yusuke Sato, Mayumi Takahashi, Noriaki Minakawa, Akira Matsuda, Hireyoshi Harashima, The systemic administration of

an anti-miRNA oligonucleotide encapsulated pH-sensitive liposome results in reduced level of hepatic microRNA-122 in mice. *J Control Release*, 173;43-50 (2014)

- 3) Afsana Akhter, Yasuhiro Hayashi, Yu Sakurai, Noritaka Ohga, Kyoko Hida, Hideyoshi Harashima. A liposomal delivery system that targets liver endothelial cells based on a new peptide motif present in the ApoB-100 sequence. *Int J Pharm*, 456(1):195-201 (2013)
- 4) Hidetaka Akita, Ryohei Ishiba, Hiroto Hatakeyama, Hiroki Tanaka, Yusuke Sato, Kota Tange, Masaya Arai, Kazuhiro Kubo, Hideyoshi Harashima. A neutral envelope-type nanoparticle containing pH-responsive and SS-cleavable lipid-like material as a carrier for plasmid DNA, *Adv Healthc Mater*, 2(8);1120-1125 (2013)
- 5) Mayumi Takahashi, Naoki Yamada, Hiroto Hatakeyama, Manami Murata, Yusuke Sato, Noriyuki Minakawa, Hideyoshi Harashima, Akira Matsuda, in vitro optimization of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside-modified anti-microRNA oligonucleotides and its targeting delivery to mouse liver using a liposomal nanoparticle. *Nucleic Acids Res*, 41(22); 10659-10667 (2013)
- 6) Yu Sakurai, Hiroto Hatakeyama, Yusuke Sato, Mamoru Hyodo, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harashima. Gene silencing via

RNAi and siRNA quantification in tumor tissue using MEND, a liposomal siRNA delivery system., *Mol Ther*, 21(6):1195-1203 (2013)

2. 学会発表

- 1) Manami Murata, Hiroto Hatakeyama, Yusuke Sato and Hideyoshi Harashima, Development of a systemic anti-miRNA oligonucleotide (AMO) delivery system to liver, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Hawaii, USA (2014)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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）

ツパイを用いたB型肝炎治療ワクチンによる免疫療法の確立

分担研究者 日浅陽一 愛媛大学大学院消化器・内分泌・代謝内科学講座 教授

研究要旨：B型肝炎慢性肝炎に対してHBs抗原消失を意図した免疫治療法の確立を、HBV感染ツパイを用いて確立することを目的とした。まず臨床的検討として、B型肝炎慢性肝炎の患者に対してHBs抗原+HBc抗原治療ワクチンを投与したところ、HBV-DNAが治療終了時に63.5%の患者で陰性化し、治療後24週でも62.5%の症例で陰性化が持続し、免疫治療効果がみられた。一過性のALT上昇がみられたものの、重篤な副作用はみられなかった。一方、ペグインターフェロン投与群ではHBV-DNAが治療終了時に73.3%の症例で陰性化した。治療後24週では33%にとどまった。基礎的検討では、HBV感染ツパイにHBs抗原+HBc抗原治療ワクチン投与したところ、未接種群に比べて明らかにHBsおよびHBc抗体の発現がみられた。同治療ワクチンの投与により、免疫治療効果が得られることがツパイHBV感染モデルで確認された。

共同研究者

渡辺崇夫 愛媛大学 研究員
 徳本良雄 愛媛大学 講師
 ファズレ・アクバル 東芝病院 研究部

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は持続感染し、慢性肝炎を発症し、炎症の持続と肝線維化の進展により肝硬変になり、肝細胞癌の発生にいたる。核酸アナログ製剤の登場、インターフェロン治療によりHBVの複製阻害、ウイルス量の減少が得られるようになったが、HBVの排除は臨床困難である。申請者は、HBV排除をめざした、HBVに対する免疫療法の確立を意図しているが、HBVはヒトおよびチンパンジーにしか感染せず、HBVが持続感染して、なおかつ免疫機能の解析が可能な小動物が得られないことが、研究の支障になっていた。

本班会議の研究班では、研究班に所属している多施設共同研究により、ツパイを用いてヒトと同じくHBVが持続感染する小動物モデルを作成することを目的としている。ツパイを用いたHBV持続感染モデルは、免疫機能が正常であり、免疫療法の確立、治療機序の解析、そして病態進展と肝発癌における免疫機能の役割についての解析に用いることが可能である。我々は、同モデルの開発と同時に、B型肝炎治療ワクチンを用いた免疫療法の試みをしているが、同モデルを用いて、より効果的、かつ安全な免疫療法を確立することを研究の目的とする。それにより、現在標準的な治療法である核酸アナログ製剤やインターフェロン治療ではなしえない高効率なHBs抗原陰性化、ウイルス排除を来しうる免疫治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

研究は、臨床的検討と基礎的検討を行った。

我々は、過去にHBs抗原ワクチンを治療に用いた臨床研究をしており、通常のHBs抗原ワクチン投与でHBs抗体ができない無反応者に対して、HBs抗原パルス樹状細胞を投与して、HBs抗体の誘導に成功した症例や(図1)、HBs抗原パルス樹状細胞をHBV感染者に投与して投与して、HBs抗原の陰性化およびHBs

HBs抗原パルス樹状細胞治療によるHBs抗体の反応

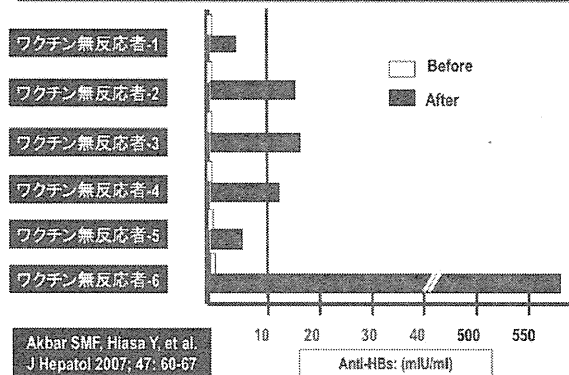


図1: ワクチン無反応者へのHBs抗原投与効果

抗体陽転に成功した症例(図2)を経験している。また、HBV遺伝子を持続発現するトランスジェニックマウスを用いて、HBs抗原投与により、同抗原特異的なCTLを誘導できること証明している。また、HBs抗原に加えて、HBc抗原の投与により、HBc抗原特異的なCTLの誘導や、それに伴うHBV-DNAの低下作用が報告されている。

HBs抗原パルス樹状細胞を用いた治療によるAST/ALTの低下

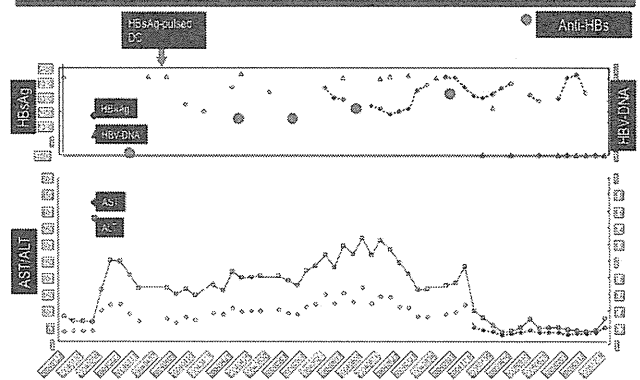


図2: HBs抗原パルス樹状細胞投与による治療効果

このような背景から、まず臨床的検討として、GMP グレードの HBs 抗原および HBe 抗原治療ワクチンの投与を、ペグインターフェロン(peg-IFN)治療と比較して行い、ワクチンによる免疫効果および治療効果について検討した。対象は B 型慢性肝炎と診断された患者で、同意を取得後無作為に、HBs 抗原+HBe 抗原治療ワクチン群(ワクチン群)と Peg-IFN 治療群(IFN 群)の 2 群に振り分け治療を行った。ワクチン群は HBs 抗原 100mg+HBe 抗原 100mg を 2 週ごとに 5 回経鼻投与し、その後 5 回経鼻投与に皮下注射を加えて投与した。また、IFN 群は peg-IFN 180mg を 48 週投与した。治療後の HBV-DNA の変化、HBe 抗原/抗体の陽性率の変化、ALT 値の推移について検討し、また末梢血リンパ球(PBMC)と樹状細胞(DC)のサイトカイン産生、抗原特異的 T 細胞についても検討した。

また、基礎的研究として、HBV を持続感染させたツパイに、HBs 抗原+HBe 抗原治療ワクチンを 30 µg を投与して、14 日後の HBs および HBe 抗体の発現について検討し、免疫治療効果を見た。

(倫理面への配慮)

臨床的検討については、倫理委員会の承認のもとバングラデシュで実施し、Bangabandhu Sheikh Mujib 医科大学の Dr. Mamun Al-Mahtab との共同研究で行われた。また解析は愛媛大学との共同研究で行った。

C. 研究結果

臨床的検討において、登録された症例は、B 型慢性肝炎と診断された患者 151 名であり、HBs 抗原+HBe 抗原治療ワクチンを投与したワクチン群は 75 名、Peg-IFN を投与して治療した IFN 群は 76 名であった。

ワクチン群に有害事象はみられず、IFN 群の約 25% に発熱、倦怠感がみられた。ワクチン群 63.9% は治療終了時に HBV-DNA が陰性(<250 copies/ml)、治療後 24 週でも 62.5% が陰性であった(図 3)。

HBsAg+HBeAg ワクチン投与群の HBV-DNA の変化

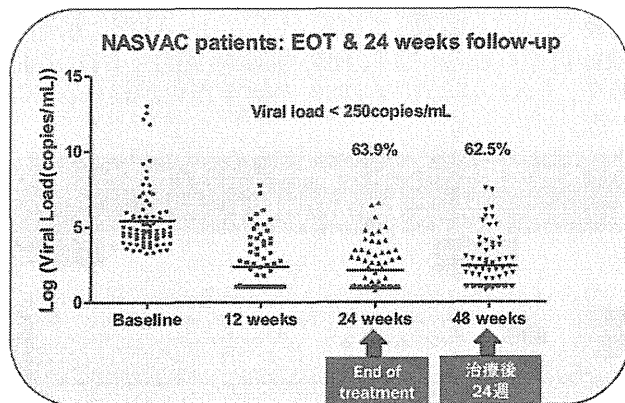


図 3: HBs+HBe 抗原投与群の HBV-DNA の変化

一方、IFN 群では 73.3% が治療終了時に HBV-DNA が陰性化したが、治療後 24 週では 33% に HBV-DNA 陰性化率は低下した(図 4)。血清 ALT 値は基準値の 2-5 倍の一過性の上昇(<225U/ml)がワクチン群の 90% に投与開始後 12 週でみられたが、治療終了時 24 週に

は 95% が正常化した。IFN 群では ALT 上昇は投与開始後 12 週で 60%、治療終了時では 80% が正常化した(図 5)。HBe 抗原/抗体セロコンバージョン率はワクチン群が高かったものの有意差はみられなかった。ワクチン群患者から単離した PBMC および DC の培養上清中の炎症性サイトカイン(IL-2, IL-12, IL-8, TNF- α , IFN- γ)は IFN 群に比べて有意に増加した($p < 0.05$)。また HBs 抗原および HBe 抗原特異的 T 細胞の有意な増殖がみられた($p < 0.05$)。

Peg-IFN 投与群の HBV-DNA の変化

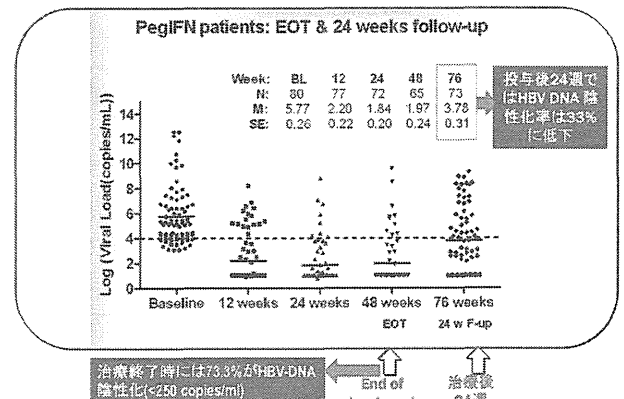


図 4: Peg-IFN 投与群の HBV-DNA の変化

治療中の ALT の推移

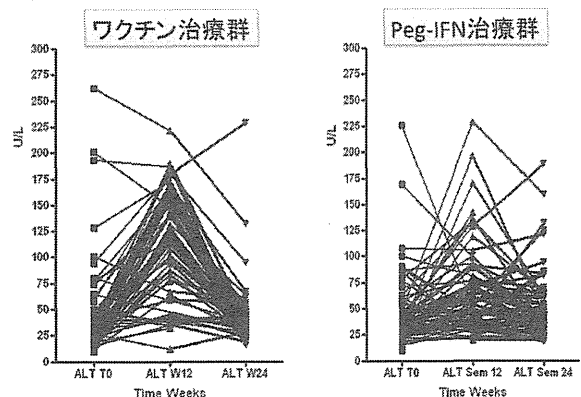


図 5: 治療中の ALT の推移

基礎的検討では、HBV を投与して HBV-DNA が検出できているツパイのうち、9 匹に HBs 抗原+HBe 抗原治療ワクチンを投与し(抗原投与群)、コントロールとして同治療ワクチンを接種していない 7 匹(抗原未接種群)と比較して、HBs および HBe 抗体の発現について検討した。抗体の測定は投与した抗原ワクチンを用いた ELISA 用プレートを作成して比色定量した。定量は投与前の血清と、投与後 14 日の血清で行い、その定量値の差をグラフにして示す(図 6)。その結果、抗原投与群では未接種群に比べて明らかに HBs および HBe 抗体の発現がみられており、同治療ワクチンの投与により免疫修飾され、効果的に抗体の発現が得られることがツパイモデルで証明された。

HBs、HBc抗原投与による特異的抗体の誘導

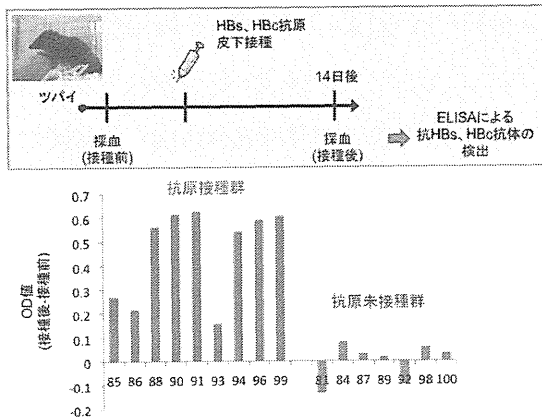


図 6: HBV 感染ツパイへの HBs+HBc 抗原投与による抗体の発現

D. 考察

今回行った、HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンを用いた免疫治療により、IFN 治療に比べて、高率の HBV-DNA の陰性化、およびその作用の持続が得られることがわかった。また、副作用として ALT 上昇がみられるものの重篤例はなく、一過性であり、治療後はむしろ ALT の持続陰性化がみられ、肝炎の治療として有効であり、かつ高い安全性が確認された。過去に行った我々の HBV 発現トランスジェニックマウスを用いた検討でも HBc 抗原による HBs 抗体の誘導賦活作用が確認されており、HBs 抗原に HBc 抗原を加えることで、より強い免疫治療となることが示唆されている。

また、ツパイを用いた基礎的検討では、まずツパイに HBV が感染し、感染が持続することが確認され、その動物検体を用いて、HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンを投与することで、同抗原に対する抗体が 1 回の投与で確認された。このことは、HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンが免疫治療として有効であることを動物モデルで証明したと同時に、今後、さらに有効な治療プロトコルの作成や、抗原投与後の免疫機序の解析、HBs 抗原が HBs 抗体産生を促すメカニズムについての解析が、この HBV 持続感染ツパイモデルを用いて可能であることを示している。

今後は、さらに HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンを複数個体に追加投与し、血液のみならず、肝臓、骨髄を含む検体を採取して、ワクチン治療効果を解析し、至適投与量の設定、効果的なアジュバントの同定、そして免疫誘導機序の解析と、さらに肝炎、肝線維化および発癌に対する影響について解析していく。

E. 結論

HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチン接種による免疫治療は安全で、かつ HBV-DNA および ALT を持続陰性化する治療法となりうることが証明された。また、HBV 持続感染ツパイモデルでも効率の良い HBs および HBc 抗体誘導が確認された。今後、同 HBV 持続感染ツパイモデルを用いて、HBs 抗原+HBc 抗原の治療ワクチンの免疫機序を解析していくとともに、ワクチンの投与量、投与方法を含めた、より治療効果の高い治療法の確立を目指す。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 学会発表

Akbar SMF, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Aguilar CJ. Nature of pathogenic and protective immunity in chronic hepatitis B virus infection. American Association of Study for Liver Diseases. 2013.11 Washington D.C., USA.

Akbar SMF, Al-Mahtab M, Rahman S, Aguilar CJ, Hiasa Y, Mishiro S. A phase III clinical trial with a therapeutic vaccine containing both HBsAg and HBcAg administered via both mucosal and parenteral routes in patients with chronic hepatitis B. American Association of Study for Liver Diseases. 2013.11 Washington D.C., USA.

2. 論文発表

Akbar SMF, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, et al. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 2012; 96:59-64.

Miyake T, Hiasa Y, Hirooka M, Tokumoto Y, et al. High serum palmitic acid is associated with low antiviral effects of interferon-based therapy for hepatitis C virus. *Lipids.* 2012; 47:1053-62.

Uesugi K, Hiasa Y, Koizumi Y, Hirooka M, et al. Wilms' tumor 1 gene modulates Fas-related death signals and anti-apoptotic functions in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2013; 48:1069-80.

Takeji S, Hirooka M, Koizumi Y, Hiasa Y, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin identified by P-11 and P-16 antibodies reflects prognosis for patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013; 28:671-7.

Watanabe T, Hiasa Y, Hirooka M, et al. Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. *PLoS One.* 2013; 8:e67750.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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レイアウト（参考）

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
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	科学評論社		2013	454-462

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
Arai M. et al. (小原)	Isolation and characterization of highly replicable hepatitis C virus genotype 1a strain HCV-RMT	<i>PLoS ONE</i>	8(12)	e82527	2013
Katsume A. et al. (小原)	A Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes	<i>Gastroenterology</i>	145(4)	865-73	2013
Shiogama k. et al. (小原)	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	<i>Int. J. Hepatol.</i>	2013	ID249535	2013
Nakagawa S. et al. (小原)	Targeted induction of interferon- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection	<i>PLoS ONE</i>	8(3)	e59611	2013
Watanabe T. et al. (小原)	Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene	<i>Gut</i>	62(9)	1340-6	2013

Aoki J. et al. (小原)	Kinetics of peripheral hepatitis B virus-specific CD8+ T cells in patients with onset of viral reactivation	<i>J. Gastroenterology</i>	48(6)	728-37	2013
Yasui F. et al. (小原)	Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication	<i>J. Medical Virology</i>	85(2)	241-9	2013
Watanabe K. et al. (保富)	Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune responses by intranasal immunization	<i>Vaccine</i>	-	-	(in press)
Kobiyama K. et al. (保富)	A non-agonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multivalent nano-particulate TLR9 agonist.	<i>Proc.Natl.Acad Sci. USA</i>	-	-	(in press)
Wada T. et al. (保富)	DNA vaccine expressing the non-structural proteins of hepatitis C virus diminishes the expression of HCV proteins in a mouse model.	<i>Vaccine</i>	31	5968-5974	2013
Kitagawa H. et al. (保富)	Intranasally administered antigen 85B gene vaccine in non-replicating human Parainfluenza type 2 virus vector ameliorates mouse atopic dermatitis.	<i>PLoS One</i>	8	e66614	2013
Shimozawa N. et al. (保富)	Cynomolgus monkey induced pluripotent stem cells established by using exogenous genes derived from the same monkey species.	<i>Differentiation</i>	85	131-139	2013

Tajiri K. et al. (保富)	Pitavastatin regulates helper T-cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice.	<i>Cardiovasc Drugs Ther.</i>	27	413-424	2013
Yoshida T. et al. (保富)	Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection.	<i>Arch Virol</i>	158	1209-1220	2013
Tougan T. et al. (保富)	TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in non human primate models.	<i>Hum Vaccin Immunother.</i>	9	283-290	2013
Kasama, Y. et al. (小原恭子)	B-cell-intrinsic Hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- κ B signaling.	<i>PLOS One</i>	-	-	(in press)
Ezzikouri S. et al. (小原)	Recent Insights into Hepatitis B Virus-Host Interactions	<i>J. Med. Virology</i>	-	-	(in press)
Katsume A. et al. (小原恭子)	A Serine Palmitoyltransferase Inhibitor Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatocytes.	<i>Gastroenterology</i>	145(4)	865-73	2013
Tsukiyama-Kohara K. et al. (小原恭子)	4E-BP1 regulates the differentiation of white adipose tissue.	<i>Genes Cells</i>	Jul;18(7)	602-607	2013
Nakagawa S. et al. (小原恭子)	Targeted induction of interferon- λ in humanized chimeric mouse liver abrogates hepatotropic virus infection.	<i>PLOS One.</i>	8(3)	e59611	2013
Salem NE. et al. (小原恭子)	Genomic polymorphisms in 3 β -hydroxysteroid Δ 24-reductase promoter sequences.	<i>Microbiol Immunol.</i>	Mar;57(3)	179-184	2013

Kobiyama K. et al. (石井)	Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist	<i>Proc Natl Acad Sci USA</i>	-	-	(In press)
Kobiyama K. et al. (石井)	Innate Immune Signaling by, and Genetic Adjuvants for DNA Vaccination	<i>Vaccines</i>	1	278-292	2013
Kuroda E. et al. (石井)	Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings, and future prospects	<i>Int Rev Immunol</i>	32(2)	209-20	2013
Tang CK. et al. (石井)	The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant	<i>PLoS One</i>	8(3)	e60038	2013
Suzuki T. et al. (押海)	Cell-type specific subcellular localization of phospho-TBK1 in response to cytoplasmic viral DNA	<i>PLoS One</i>	8(12)	e83639	2013
Shime H. et al. (押海)	Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models.	<i>J. Innate Immun.</i>	Oct29 Epub ahead of print		2013
Takaki H. et al. (押海)	MAVS-dependent IRF3/7 bypass of interferon β -induction restricts the response to measles infection in CD150 Tg mouse bone marrow-derived dendritic cells.	<i>Mol. Immunol.</i>	57(2)	100-110	2014

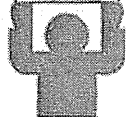
Takaki H. et al. (押海)	The MyD88 pathway in plasmacytoid and CD4+ dendritic cells primarily triggers type I IFN production against measles virus in a mouse infection model.	<i>J.Immunol.</i>	191 (9)	4740-4747	2013
Oshiumi H. et al. (押海)	A distinct role of Riplet-mediated K63-linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses.	<i>PLoS Pathog.</i>	9(8)	e1003533	2013
Matsumoto M. et al. (押海)	Toll-IL-1-receptor containing adaptor molecule-1: a signaling adaptor linking innate immunity to adaptive immunity	<i>Prog Mol Biol Transl Sci</i>	117	487-510	2013
Posuwan N. et al. (村上)	Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population.	<i>PLoS One.</i>	9 (1)	e86007	2014
Shinkai N. et al (村上)	Application of a newly developed high-sensitivity HBsAg chemiluminescent enzyme immunoassay for hepatitis B patients with HBsAg seroclearance.	<i>J Clin Microbiol.</i>	51 (11)	3484-3491	2013
Elkady A. et al. (村上)	Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt.	<i>World J. Gastroenterol.</i>	19 (37)	6214-6220	2013
Sakurai Y. et al (櫻井)	RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system	<i>J Control Release</i>	173	110-118	2014

Hatakeyama H. et al. (櫻井)	The systemic administration of an anti-miRNA oligonucleotide encapsulated pH-sensitive liposome results in reduced level of hepatic microRNA-122 in mice	<i>J Control Release</i>	173	43-50	2014
Akhter A. et al. (櫻井)	A liposomal delivery system that targets liver endothelial cells based on a new peptide motif present in the ApoB-100 sequence	<i>Int J Pharm</i>	456(1)	195-201	2013
Akita H. et al. (櫻井)	A neutral envelope-type nanoparticle containing pH-responsive and SS-cleavable lipid-like material as a carrier for plasmid DNA	<i>Adv Healthc Mater</i>	2(8)	1120-1125	2013
Takahashi M. et al. (櫻井)	in vitro optimization of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside-modified anti-microRNA oligonucleotides and its targeting delivery to mouse liver using a liposomal nanoparticle	<i>Nucleic Acids Res</i>	41(22)	10659-10667	2013
Sakurai Y. et al. (櫻井)	Gene silencing via RNAi and siRNA quantification in tumor tissue using MEND, a liposomal siRNA delivery system	<i>Mol Ther</i>	21(6)	1195-1203	2013
Miyake T. et al. (日浅)	High serum palmitic acid is associated with low antiviral effects of interferon-based therapy for hepatitis C virus.	<i>Lipids</i>	47 (11)	1053-62	2012

Uesugi K. et al. (日浅)	Wilms' tumor 1 gene modulates Fas-related death signals and anti-apoptotic functions in hepatocellular carcinoma.	<i>Journal of Gastroenterology</i>	48 (9)	1069-80	2012
Takeji S. et al. (日浅)	Des-gamma-carboxy prothrombin identified by P-11 and P-16 antibodies reflects prognosis for patients with hepatocellular carcinoma.	<i>Journal of Gastroenterology and Hepatology</i>	28 (4)	671-7	2013
Watanabe T. et al. (日浅)	Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection.	<i>PLoS One</i>	8 (7)	e67750	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Lecture



解説

TLRとレクチンの共同作用*

小檜山康司^{**} 石井 健^{**}

Key Words : TLRs, CLRs, innate immune response

はじめに

微生物はいくつもの成分を含む複合物であり、さまざまな構造をとっている。これら特徴的な成分、構造は免疫細胞に発現している自然免疫受容体によって認識される。宿主内では微生物を排除するための機構が働き、自然免疫受容体は主に炎症性サイトカインやケモカイン産生を惹起することで、獲得免疫応答を誘導している。自然免疫受容体であるToll-like receptors (TLRs) やC-type lectin receptors (CLRs)は、特異的に病原体の構成成分を認識し自然免疫応答を惹起する。近年、個々の病原体をいくつかの自然免疫受容体が認識し、異なるシグナルを活性化させることで、お互いの自然免疫応答を増強。または抑制することが報告されている。本稿では、自然免疫受容体、特にTLRsとCLRsによる自然免疫、獲得免疫応答の誘導における共同作用について解説する。

自然免疫と獲得免疫

宿主は、ウイルスや細菌、真菌などの病原体に対する免疫応答を有しており、自然免疫と獲得免疫に大別することができる。自然免疫応答は病原体感染後、迅速に誘導される生体防御反応であり、昆虫から哺乳類まで広く保存されている。一方で、獲得免疫応答は哺乳類などの高

等動物のみが有している機能であり、病原体の再感染に対する長期的な生体防御反応である。これらの免疫応答は密接にかかわっており、自然免疫応答なしに病原体特異的な獲得免疫応答の誘導は行われない。このことは新たなワクチン開発においても重要な点であり、実際にナイーブマウスに精製された抗原のみを投与した際には、抗原は抗原提示細胞に取り込まれ、抗原提示は行われるものの、抗原特異的抗体や、細胞性免疫応答は誘導されず、免疫寛容となってしまう。一方で、自然免疫シグナルが入ることで、抗原特異的免疫応答の誘導、さらには免疫記憶が形成される。これらのことから、現在ではワクチン開発において自然免疫応答を惹起することが重要視されており、自然免疫を強く誘導する成分(アジュバント)の開発研究が行われている。

自然免疫応答を誘導するために、宿主の細胞は自然免疫受容体(パターン認識受容体とも呼ばれる)を備えている。これまでに、多くの自然免疫受容体が報告されており、5つのグループに分けられている。TLRs, CLRs, RIG-I-like receptors (RLRs), nucleotide-binding oligomerization domain containing (Nod)-like receptors (NLRs), AIM2-like receptors (ALRs)である¹⁾。1990年代後半のTLRsの発見を機に、急速に自然免疫学研究が進み、詳細なシグナル伝達経路が明らかとさ

* Collaboration between the innate immune receptors.

** Kouji KOBAYAMA, Ph.D. & Ken J. ISHII, M.D., Ph.D.: 大阪大学免疫学フロンティア研究センターワクチン学研究室(☎565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1); Laboratory of Vaccine Science, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

*** 独立行政法人医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト

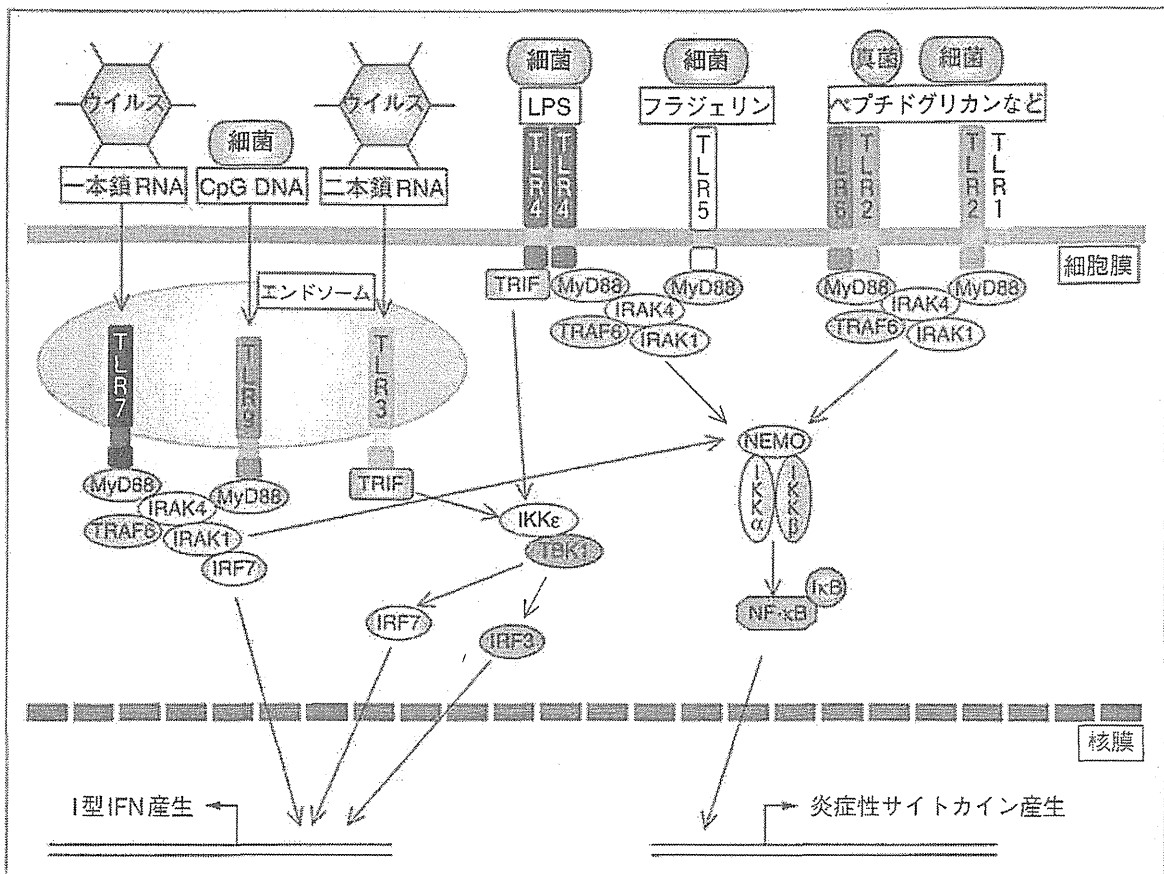


図1 TLRsの自然免疫シグナル

れ、生体反応への関与も明らかとなりつつある。また、活性化される自然免疫応答によって、その後誘導される獲得免疫応答にも特徴がある。TLRsのリガンドは主としてTh1型の免疫応答を誘導し、CLRのリガンドは主としてTh17型の免疫応答を誘導することが報告されている。Th2型の免疫応答を誘導するアルミニウムアジュバントはNLRsによって認識され、自然免疫応答を活性化することが報告されているが、獲得免疫応答誘導にはNLRsによる自然免疫応答は関与していないことが報告されている²⁾。これらの背景から、自然免疫応答を詳細に明らかにすることが、病原体排除、さらには新規ワクチン開発のために非常に重要であると考えられている。次に自然免疫受容体であるTLRsとCLRについて解説する。

TLRs

TLRsはショウジョウバエのToll遺伝子と相同

性が高いことからToll-like receptorsと名づけられた。TLRsはこれまでに13種類、ヒトでは10種類が同定されており、病原体のさまざまな成分(核酸、蛋白質、多糖、鞭毛など)を認識する³⁾。TLRsは主に免疫細胞である樹状細胞、マクロファージ、B細胞などに発現しており、病原体が感染後、その構成成分を認識することで自然免疫シグナルを活性化し、サイトカイン産生や共刺激分子などの発現を増強させる。結果として、抗原提示細胞が取り込んだ抗原を、ナイーブT細胞に提示することが可能となる。これにより強い獲得免疫応答を惹起することができる。

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6は細胞膜に局在しており、TLR3, TLR7/8, TLR9はエンドソーム膜に局在している(図1)。それぞれ認識できるリガンドが異なっており、そのことがさまざまな病原体に対する早期免疫応答の誘導、排除に役立っている。

TLR2はTLR1やTLR6とヘテロダイマーを形成

し、グラム陽性細菌や真菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポプロテイン、リポタイコ酸などを認識する。Macrophage-activating lipopeptide 2 (MALP-2) はTLR2とTLR6のヘテロダイマーによって認識され、また合成リポペプチドであるPam₂CSK₄はTLR2とTLR1のヘテロダイマーによって認識され自然免疫応答を活性化する。これらの自然免疫応答はアダプター分子であるmyeloid differentiation factor 88 (MyD88) によって制御されており、転写因子であるNF- κ Bを介してIL-6やTNF- α などの炎症性サイトカイン産生を誘導する。

TLR3はウイルス感染細胞内で複製された、ウイルス由来の二本鎖RNAをエンドソーム内で認識することで、自然免疫応答を活性化する。アダプター分子であるToll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) を介し、転写因子であるIRF3をリン酸化することでI型インターフェロン(IFN)産生を誘導する。その結果として、強くTh1型免疫応答を誘導する。

TLR4はグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)を認識することで自然免疫応答を活性化する。TLR4はMyD88, TRIF両方のアダプター分子を介してI型IFNや炎症性サイトカイン産生を惹起する。

TLR5は細菌の鞭毛中のフラジェリンという蛋白質を認識することでMyD88を介した自然免疫応答を活性化する。フラジェリンは強力にTh1型免疫応答のみを誘導するのではなく、Th2型免疫応答をも誘導することができることが報告されている。

TLR7/8はウイルス由来の一本鎖RNAや、合成低分子であるイミダゾキノリンなどを認識し、リガンドをエンドソーム内で認識後、MyD88を介して強力にI型IFN産生を誘導する。ヒトにおいては、TLR7とTLR8は発現している細胞が異なっており、両者に対するアゴニストを用いることで、樹状細胞やB細胞を活性化し、Th1型免疫応答、CTL反応、抗原特異的抗体産生を誘導することができる。

TLR9は細菌やウイルス由来の非メチル化CpG配列を含んだDNAを認識する。哺乳類のDNAは、CpGがメチル化修飾を受けているためにTLR9の

リガンドとして働かない。合成核酸であるCpG oligodeoxynucleotide (ODN) もメチル化修飾されていないために、強力に自然免疫応答を活性化することが可能である。TLR9はエンドソーム内でこれらリガンドを認識し、I型IFN産生を誘導する。CpG ODNは現在大きく4つのグループに分けることができ、K/B, D/A, C, Pがある。それぞれのCpG ODNは異なる配列、骨格を有しており、誘導される自然免疫応答も異なっている。K型のCpG ODNは単独でがんやアレルギーなどを含めたさまざまな疾患への治療が期待されており、現在も臨床試験が行われている⁴⁾。

CLRs

C-type lectin-likeドメイン(CTLD)を含む蛋白質はC-typeレクチンと呼ばれ、これまでに1,000種類以上のC-typeレクチンが報告されており、その多くは遺伝子上でクラスターを形成している。CTLDの主な機能はカルシウムイオン依存性に糖鎖と結合することである。いくつかのC-typeレクチンはCLRsとも呼ばれており、骨髄系細胞での発現が確認されている。CLRsの機能は多岐にわたっており、細胞接着や組織の再構築、補体の活性化、病原体の認識などさまざまである⁵⁾。

Dectin-1(ヒト: *CLEC7A*)はマクロファージ、樹状細胞、単球、好中球などの細胞膜上に発現しており、真菌の細胞壁成分である β -グルカンを認識することで自然免疫応答を誘導する。Dectin-1は細胞内モチーフとしてimmunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)モチーフ(YxxL/I配列)を一つ有しているためにhemITAMと呼ばれている(通常のITAMはタンデムに2つのモチーフが並んでいる)。Dectin-1がリガンドを認識するとアダプター分子であるspleen tyrosine kinase (Syk)をリン酸化することで、自然免疫応答を活性化し炎症性サイトカイン産生を誘導する⁶⁾。最近の報告で、Dectin-1は粒子状の β -グルカンを認識する際に、抑制性脱リン酸化酵素であるCD45とCD148を含まないクラスターを形成することで、自然免疫シグナルを活性化することが示された⁷⁾。可溶性の β -グルカンではこのクラスター形成が行われず、CD45とCD148によりSykのリン酸化が抑制され、自然免疫シグナルを誘導す