

201423016A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業  
(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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 27(2015)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業  
(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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小原 道法

平成 27(2015)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	シニア研究員
<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・獣医学部・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・人獣共通感染症リサーチセンター	准教授
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	----- 9
-------	---------

#### 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	-----17
-------	---------

#### 3. ツパイ自然感染モデルでの発症・治療評価

小原 恭子	-----27
-------	---------

#### 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	-----30
-------	---------

#### 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	-----33
-------	---------

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----41
---------------------	---------

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----47
-----------------	---------

# 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

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・シニア研究員

**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。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。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。HCVによる持続感染機構は十分に解明されていない。そこで、HCVによる宿主免疫抑制を回避し、特異的免疫賦活化による根治を目指す。

本研究では細胞性免疫を効果的に誘導できるDNAワクチンとHCV遺伝子組換えワクシニアワクチン(HCV-rVV)を組み合わせたPrime/Boostワクチンの手法を用いることで強力な治療効果が認められた。PrimeとBoostにおいて一部の遺伝子のみが重複するPrime/Boostワクチン接種方法が、全てのHCV遺伝子の重複するワクチンよりCTLの誘導およびHCV core蛋白の排除に非常に効果的であった。本発見について特許申請を行った(特願2014-229283)。さらにPrime/Boostワクチンに加えて、炎症を惹起しないアジュバントを併用し、より強力な治療効果の取得を目指す。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。このC型肝炎モデル動物に治療ワクチンを用いることで、感染者における免疫反応の解析と治療効果の評価を行う。

HCV粒子構成蛋白質のみから構成される1回感染型HCV粒子(HCVtcp)の効率の良い産生系を確立することにより、ワクチンで誘導される抗体の各種遺伝子型HCVに対する中和抗体の探索及びエピトープの解析を進めた。幅広い遺伝子型のHCVに対して中和活性を有する抗体を探索したところ、1a,1b,2a,3aの複数の遺伝子型のHCVtcpに対して中和活性を示す抗E1モノクローナル抗体を見だし、この抗体のエピトープ領域を同定した。

特異的免疫反応は一度誘導されれば長期にわたり効果が持続することから、少ない投与回数で効果の持続が期待でき、薬剤耐性や重篤な副作用の問題も克服できるものと期待される。

### 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。

本研究者らは、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蛋白質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、治療ワクチン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- $\alpha$ 、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 $\phi$ )やM2マクロファージ(M2M $\phi$ )の分布変化について解析した。

さらに、マクロファージ枯渇実験、抗IL-6受容体抗体によるIL-6シグナル阻害実験、PD-1抗体とrVV-N25のコンビネーション実験、DNAワクチンとrVV-N25のコンビネーション実験を進めた。

### 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<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>), RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>(図1A)、C57BL/6マウスを用いた。HCV-Tgマウスはpoly(I:C)を投与後、HCV蛋白質を3ヶ月間持続的に発現させた後に、実験に使用した。CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスはHCV遺伝子の一部を、RzCN5-15<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>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の外殻蛋白領域(CoreE1E2NS2)あるいは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(CN2-DNA, N25-DNA)をそれぞれprimeワクチンとして使用した(図1A)。また、DNAワクチンに組み込んだ配列と同じ配列をワクチニアウイルスLC16m8株に組み込んだ組換えワクチニアウイルス(rVV)であるrVV-CN2およびrVV-N25をboostワクチンとして使用した(図1A)。

#### (3) 免疫方法

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投与完了後2週にワクシニアウイルスを皮内投与した。(図1B)。(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( $1 \times 10^5$ )または、脾細胞を磁気ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いて分離したCD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>細胞のHCV抗原特異的IFN- $\gamma$ 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 core ELISA アッセイキット(Xpress Bio)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・エオジン染色およびズダンブラック染色を行った。

#### (6) ワクチン投与マウスからの脾臓細胞移入実験

CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスに prime/boost ワクチンを予め投与し、最後の投与から2週間後に、脾臓を採取し、CD11c<sup>+</sup>細胞を分離後、HCV-NS3 ペプチド(GAVQNEITL)を5時間パルスし、C57BL/6 もしくは CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスの足蹠に投与( $2 \times 10^5$  cells)し、2週後に脾臓中のHCV抗原特異的IFN- $\gamma$ 産生細胞についてELISPOT法を用いて解析した(図5A)。

#### 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 genotype 1a, 1b, 2a, 4aのウイルスを $5 \times 10^4$ – $2 \times 10^8$ 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( $5 \times 10^4$ )のHCVを腹腔内に接種した。HCVの接種法は皮下接種も行い、比較し

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。HCV量の測定は定量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。

#### 研究分担者(押海裕之)

マウス肝細胞、樹状細胞は既報に準じて調整した。HCV感染モデルマウスは小原博士より恵与を受けた。他のKOマウスは当研究室で樹立した。TLR3アゴニスト(合成RNAとpolyI:C)は既報に調製法を記載した。

#### 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、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 JFH-1株の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領域の遺伝子型1bおよび2aのアミノ酸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 (SVP)を産生させた。

##### (4) ウイルス粒子と抗体の反応

HCVエピトープ配列を持ったウイルス粒子とHCV E1抗体との結合は、ウイルス粒子と抗体を混合し、その後、AlexaFluor488標識2次抗体を混合し、FCS-101B(浜松ホトニクス



(株)で相関解析を行うに事より評価した。

(5) HCV 中和エピトープを持つ SVP を分泌する細胞株の樹立と粒子の精製

HCV の E1 由来中和エピトープ配列を挿入した SVP と GFP をダイシストロニックに発現するレトロウイルスを作製し、293T 細胞に感染させて GFP 高発現細胞をソートする事により、SVP 高発現細胞株を樹立した。樹立した細胞を無血清培地で培養し、その上清から限外ろ過およびゲル濾過クロマトグラフィーを用いてウイルス粒子を精製した。

(6) ウイルス粒子の免疫

マウス(Balb/c、5週齢メス)に20  $\mu$ gの抗原をアジュバント(Alum + CpG)とともに腹腔内免疫を開始した。2週おきに計3回免疫した後に、血清の中和活性を評価する計画である。

### (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。

(1)慢性肝炎状態のHCV-Tg マウスにHCV遺伝子組換えワクシニアワクチンrVV-N25を単回皮内接種し、接種後のマウス肝臓を解析した。接種後、肝臓において壊死性細胞浸潤、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性といった慢性肝炎の病態の正常化が認められ、また肝臓内のHCV 蛋白の減少がみられた。

(2)HCV蛋白の減少時にALT値の上昇やCTLなどによるHCV発現細胞の排除が認められなかったことから、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され、この機序の解析を進めている。

(3)慢性肝炎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M1マクロファージではなく、慢性炎症部位に見られる炎症性サイトカイン(IL-6, TNF $\alpha$ )を発現するM2マクロファージが優位に存在している事を明らかにした。このM2マクロファージをクロドロネートで除去すると肝炎が沈静化した。このマウスにrVV-N25 を接種し、接種後の免疫細胞を解析したところ、肝臓におけるM2マクロファージが減少し、肝炎を沈静化する事が明らかとなった。

### 研究分担者(保富康宏)

(1)C型肝炎モデルマウスを用いてHCV-DNAワクチンの治療効果の検討を行った。HCV蛋白を3ヶ月間持続的に発現させ、慢性肝炎を発症したHCV-TgマウスにHCV-DNAワクチンを投与し、HCV-N25投与群において肝臓中コア蛋白発現量が有意に減少していることを確認した。

(2)HCV-DNAワクチンとワクシニアウイルスのprime/boostワクチン併用療法について、WTマウス、HCV-Tgマウスを用いた評価を行った。併用することにより、細胞性免疫反応が増強し、肝臓中コア蛋白発現量の減少が見られ、治療効果が上がることを確認した。

(3) PrimeとBoostにおいて一部の遺伝子のみが重複するPrime/Boostワクチン接種方法が、全てのHCV遺伝子の重複するワクチンよりCTLの誘導およびHCV core蛋白の排除に非常に効果的であった。本発見について特許申請を行った(特願2014-229283)。

(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<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>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<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>マウスにワクチンを投与し、脾臓細胞中の特異的IFN- $\gamma$ 産生能を測定した。CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(+/-)</sup>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)

成獣ツパイにHCVの各種遺伝子型(1a, 1b, 2a, 4a)株を接種した。いずれも感染が成立し、特に2aは最も高いウイルス価を示した。一方で、4aは最も頻回ウイルスの増殖を示した。そこで、新生児への感染は4a株を用いて行った。また、HCVを皮下接種する事で効率良く感染が成立しており、現在経過を観察している。これまでに、ツパイの全ゲノム解析から、ヒトと近いゲノム情報を持つ事が明らかとなった。また、マウスとは異なり、IFN14遺伝子を持つ事も明らかとなった。HCV1a, 1b, 2a, 4aを感染させた成獣ツパイ肝臓での発現を解析したところ、2aを感染させた個体の肝臓においてIFN14遺伝子の発現が検出された。IFN14は、マウスやラットは持たない事が知られており、ツパイがよりヒトに近い自然免疫系を持つ可能性が明らかとなった。さらに、フランス松の樹液から作成された天然物であるピクノジュノールがHCVに抗ウイルス効果があり、特にプロテアーゼ阻害剤であるテラプレビル耐性のHCVにも抗ウイルス活性がある事を示した。

#### 研究分担者(押海裕之)

(1)HCV ワクチンに用いるTh1 優位アジュバントの化学合成に成功した。ヒト樹状細胞(BDCA3+DC, 抗原提示細胞)ではpolyI:C

(TLR3 agonist)が最善のTh1 極性を持つことが示されたが毒性(サイトカイン血症)の問題があつて棄却されている。毒性が極小のRNAアジュバントを開発するため多数の核酸アジュバントを化学合成した。その結果、非炎症性アジュバントARNAX (DNA/RNA hybrid)のデザインと完全化学合成に成功した。化学合成RNAアジュバントはTLR3特異的な(RIG-I/MDA5を活性化しない)構成にデザインした。KOマウス、担がんマウスの系でCTL誘導とNK活性化(IFN-g産生)、腫瘍退縮が証明できた(Nat Commun 2014)。

(2)マウスを用いたワクチン治療効果の解析系の作製に成功した。OT-1 (CD8 T細胞)との共培養系でCTL増殖を見る系を作製し、class I tetramerの入手可能な抗原(Survivin, OVA)でin vivoのTh1応答(CD4 Tの増殖)と抗原特異的CTL誘導を解析した。まず、polyI:CでOT-1増殖、CD4.Tの増殖がCpG, Pam2より優位に発動した。また、NKにおいてもkillingそのものよりIFN-gなどがエフェクターになりうる。

#### 研究分担者(鈴木亮介)

(1)より適切なHCVの中和抗体の評価が可能となる1回感染性トランスパッケージング型HCV粒子(HCVtcp)産生系を確立した。遺伝子型1a, 1b, 2a, 3a由来の7株のエンベロープ蛋白質を用いてHCVtcpの産生に成功した。  
(2)幅広い遺伝子型のHCVに対して中和活性を有する抗体を探索したところ、1a,1b,2a,3aの複数の遺伝子型のHCVtcpに対して中和活性を示す抗E1モノクローナル抗体を見だし、この抗体のエピトープ領域を同定した。  
(3)1b/E1 に対するモノクローナル抗体が1a,1b,2a,3aを中和できるエピトープを同定した。この領域を標的とするパントロピックワクチンの可能性が開かれた。このエピトープ配列を日本脳炎ウイルス(JEV)のエンベロープ蛋白質中に挿入し、HCV中和エピトープを有するJEV subviral particle産生細胞株を樹立した。

## D. 考察

H26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。

### 研究代表者(小原道法)

HCV感染による肝傷害と病態進行は、HCV特異的CD8T細胞を介した宿主免疫反応により進行すると考えられている。しかし我々の研究ではC型慢性肝炎は肝臓内マクロファージ(Mac)により産生されるTNF- $\alpha$ 、IL-6を介することが示唆された。この違いを明らかにするために、C型慢性肝炎におけるMacの役割について明らかにした。HCV-Tgマウスの肝臓および脾臓ではCD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Macが増加しており、Macを枯渇することで肝臓の病態が正常化したことから、MacがC型慢性肝炎の原因であることを結論づけた。慢性肝炎を呈するHCV-Tgマウスの肝臓ではM1 Macではなく、M2 Mac数がおよそ10倍増加しており、高レベルのTNF $\alpha$ 、IL-6を産生していることを明らかにした。また、M2 Macは肝臓で限局的に増加していることが示唆された。

rVV-N25は肝臓内の炎症性サイトカインを産生するM2 Mac数を減少させるが、rVV-N25がどのように減少させるかについてはわかっていない。rVV-N25接種後のマクロファージの減少はアポトーシスの増加によるものではないことが分かった。C型慢性肝炎におけるM2 Mac数の増加とrVV-N25によるM2 Macの減少機序についてはさらに実験が必要とされる。

さらにrVV-N25によるウイルス抗原排除効果を上げるために、PD-1抗体による肝臓内T細胞免疫反応の活性化を試みた。HCV-Tgマウスを用いた実験から、PD-1抗体/rVV-N25との組合せによる肝臓内T細胞免疫反応の活性化は認められず、HCV-Tgマウスでは、PD-1抗体投与によるrVV-N25のウイルス抗原排除効果に影響しないことが示唆された。HCV

感染チンパンジーの報告でも、PD-1に無反応の個体も存在することが知られており、さらにPD-1抗体の投与をやめるとウイルスRNAが元に戻ることから、rVV-N25接種によるウイルス抗原排除効果を上げるさらなる試みが必要であると考えられる。

### 研究分担者(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。現在行われている手法ではPrimeとBoostを違うワクチンにより行う、Prime/Boostの手法が最も効果が高いと考えられている。この手法の利点は組み換えウイルス等のベクターに対する反応を考慮すること無く、追加接種できる点にある。これらの場合はいずれもワクチン抗原はPrimeとBoostで全く同じものが使用されるのが通常である。我々の結果はこの点において全く新しい知見を与えるものとなった。抗原の重複されるNS2に対する細胞性免疫の誘導が増強されたのはNS2のみが重複している場合のみであり、それ以外の部位は重複しない場合であった。これらの知見は他に報告されていないものであり、今後のこの機序の解明は他にも応用できる可能性を示した。

### 研究分担者(小原恭子)

ツパイの妊娠期間は40日程度であり、離乳までの期間が60日程度である。年間3-4回の繁殖が可能である。これから計算すると、1匹あたり、年間10-15匹の産子が得られる。調べた全てのHCV株に感染感受性を示したが、持続感染を成立させるためには、4a株の皮下接種が良いと考えられた。また、ツパイのHCV感染感受性システムを今後確立していく必要がある。

## 研究分担者(押海裕之)

IFN-IはIFN-a/bと異なり、樹状細胞のNK細胞活性化能とcross-presentation能を上げない(Okamoto JI 2014)。これに対し、polyI:CはIRF3依存性に樹状細胞の細胞性免疫を起動する。従って、IFN-IよりIRF3を活性化するRNAアジュバントを開発し、TLR3経路の活性化を目指すことを本開発の目標にした。

PolyI:C投与の問題点はTLR3/TICAM-1経路以外にMAVS経路に働いてin vivoでサイトカイン血症を誘発することである(Seya, EOTT 2013)。マウスのpolyI:C i.p.モデルではIFN-a/bの他にIL-6, TNF-a, IL-10,が大量に出る。慢性肝炎にサイトカイン血症は重大な悪性因子となりうる(Kohara et al., PLoS ONE 2013)。一方、今回開発したRNAアジュバントはTLR3を特異的に活性化しMAVS経路は活性化しないためこの問題を克服している。マウスへの外用投与でサイトカイン血症を全く誘発せずに強力なCTL増殖を可能にした(Nat Commun 2015)。

今後、ヒトへの外挿性を解析する必要があるが、基本的にマウスとヒトのTLR3とRNA認識機構は保存されているため、ヒトで再現データが取れることが期待される。

## 研究分担者(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。E1蛋白質のHCVの感染初期過程における役割を明らかにする上でも、本結果は興味深い。

また、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を確認した。中和活性を示したモノクローナル抗体は、遺伝子型2a由来の配列を挿入

した粒子には結合しなかったものの、遺伝子型1b由来の配列を挿入した粒子には結合した事から、少なくとも遺伝子型1bのエピトープ配列は粒子の外側に露出していると考えられた。オーバーラッピングペプチドを用いたエピトープ解析では、用いた抗E1抗体は遺伝子型2a由来のペプチド配列にも強く結合が認められたため、1bと2aの若干のアミノ酸配列の違いが粒子表面のペプチドの構造を変化させている可能性が考えられた。

現在、この抗原を精製してマウスに免疫しており、今後は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。HCV-Tgマウスの肝臓では、M1 MacでなくM2 MacがIL-6, TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生する事でC型慢性肝炎を呈しており、M1 Macのような機能を持つM2 Macについての初めての知見が得られた。さらにrVV-N25は、炎症性サイトカイン産生M2 Macを減少させることで肝臓の病態を改善し、治療ワクチンとしての効果を発揮することが明らかとなった。

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の構造蛋白領域もしくは非構造蛋白領域を発現するDNAワクチンと組み換えワクシニアウイルスを用いて一部領域が重複させた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、各ワクチ

ン単独投与に比べて、また同じ領域をコードする prime/boost の組み合わせ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、特に HCV 全長遺伝子をコードさせたマウスにおける HCV に対する免疫抑制機構についての解析をさらに行い、prime/boost ワクチンの効果検討を進めていきたい。

TLR3/TICAM-1 特異アゴニストを開発し、HCV ワクチンにアジュバントとして適用することを目指した。毒性の少ない非炎症性アジュバントの開発が見込まれる。本アジュバントの成功は多くの感染症ワクチンに福音をもたらすかも知れない。

ツパイの飼育法も確立し、持続感染を成立できる HCV の株は 4a である事が明らかとなった。また、接種法は皮下が良い事も明らかとなった。HCV 感染に感受性が良い個体も存在し、これらを系統化する事で、より良い評価系の確立が可能となった。今後は、この様なツパイ HCV 持続感染系を用いてワクチンや薬剤候補物質の評価を行っていく予定である。

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、さらに遺伝子型 1b および 2a 由来のこのエピトープ配列を有する JEV SVP の産生に成功した。少なくとも遺伝子型 1b のエピトープを有する粒子については、エピトープ配列を粒子の外側に露出していると考えられ、抗体を誘導するワクチン抗原として期待できる。

## F. 健康危険情報

特になし

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

各分担研究報告書を参照

### 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

研究分担者 小原道法 東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト シニア研究員  
研究協力者 大槻貴博 東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト 研究員

**研究要旨:** C型肝炎ウイルス(HCV)の免疫学的病態解析および根治治療ワクチンの開発に向けて、病態進行に関与するHCVトランスジェニックマウス(Tgマウス)の肝臓内炎症性マクロファージ(Mac)について免疫学的解析を行い、HCV非構造蛋白質発現組換えワクシニアウイルス(rVV-N25)接種後の肝臓内MΦの動態を調べることでrVV-N25の作用機序解析を試みた。HCV-Tgマウスの肝臓内では同週齢のマウスと比べCD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup>のM2様マクロファージ(M2 Mac)数が増加しており、加えてM2Mφが主にIL-6, TNF-α産生していることがわかった。rVV-N25接種により肝臓内炎症性サイトカイン産生M2 Mac数が減少し肝臓の病態を正常化した。これらの結果はM2Macにより産生された炎症性サイトカインがHCV-TgマウスにおいてC型慢性肝炎の誘導に寄与することを示唆している。さらにrVV-N25は肝臓内炎症性M2 Mac数を減少させる事で肝臓の正常化に寄与することが示された。

### A. 研究目的

HCVは感染後、慢性C型肝炎、肝硬変、肝細胞癌に進展する。近年効果的な抗ウイルス剤が開発されているが、現在までに根治治療的ワクチンはなく、開発が強く望まれている。慢性C型肝炎においてMacはIL-6, TNF-αなどの炎症性サイトカインを産生し、病態進行に関与する事が知られている。我々はHCV-Tgマウスを用いた実験から、IL-6, TNF-αを産生するMacがC型慢性肝炎を引き起こしていること、さらにrVV-N25が肝臓のMacの活性化を抑制することでC型慢性肝炎を改善し、CD4, CD8T細胞依存的に肝臓内ウイルス抗原を排除することを報告してきた。これはrVV-N25が免疫賦活化する事でC型慢性肝炎に対する治療ワクチンとして働くことを示唆している。今回我々は病態進行に関与するHCV-Tgマウスの肝臓内炎症性Macについて免疫学的解析を行い、rVV-N25接種後の肝臓内Macを調べることで

rVV-N25の作用機序解析を試みた。さらにC型慢性肝炎下では免疫寛容状態になっておりウイルス特異的なCD8T細胞が不活性化状態になっておりPD-1を高発現するCD8T細胞によるT-cell exhaustionと呼ばれる状態になっていることが報告されている。いくつかの論文ではPD-1抗体の投与により、この状態が打破され、本来の正常な免疫反応に戻ることが報告されている。そこでrVV-N25とPD-1抗体の組み合わせにより、さらなるウイルス抗原排除効果について検討を試みた。

### B. 研究方法

#### (1) マウス

HCV-Tgマウス(CN2-29<sup>(+/-)</sup>/Mx1-Cre<sup>(+/-)</sup>)作製のためにHCV遺伝子を持つR6CN2HCV-Tgマウス(CN2-29<sup>(+/+)</sup>)と、インターフェロン応答性にCreを発現するMX1-Cre Tgマウスを交配させた。8週齢のHCV-Tgマウスにpoly(I:C)を2日毎に3回腹腔内

投与して HCV 遺伝子を誘導発現し、C 型慢性肝炎を呈する 3 ヶ月後に実験に使用した。同週齢マウス Non-Tg マウス (CN2-29<sup>+/+</sup>/MxCre<sup>-/-</sup>) も同様に poly(I:C) を投与し実験に使用した。

#### (2) HCV-Tg への rVV-N25 接種方法

poly(I:C) 投与後 3 ヶ月の HCV-Tg マウスまたは Non-Tg マウスに、rVV-N25 または rVV-Emp (空の rVV ベクター) を  $1 \times 10^8$  PFU/50  $\mu$  l でマウスに皮内接種した。

#### (3) マクロファージ枯渇実験

慢性肝炎を呈する HCV-Tg マウスにおける Mac の役割を解析するために、rVV-N25 接種前日および接種 3 日後に clodronate-liposome を静脈内投与した。rVV-N25 接種 7 日後に血清、肝臓、脾臓を採材した。

#### (4) 抗 IL-6 受容体抗体による IL-6 シグナル阻害実験

抗マウス IL-6 受容体ラットモノクローナル中和抗体 (MR16-1) は中外製薬より分与された。MR16-1 の腹腔内投与によりマウス IL-6 受容体への IL-6 結合が阻害され、IL-6 によるシグナルが阻害される。そこで MR16-1 あるいはコントロールとしてラット IgG1 を HCV-Tg マウスに 0.5mg/0.1ml を 7 日毎に 2 回腹腔内投与して最終投与 7 日後に採材した。

#### (5) PD-1 抗体と rVV-N25 のコンビネーション実験

HCT-Tg マウスに 3 日毎に 250ug/0.1ml を 5 回腹腔内投与し、最初の PD-1 抗体投与 7 日後に rVV-N25 を皮内投与した。rVV-N25 接種 28 日後に採材した。

#### (6) 血清の解析

心採血により全血から血清を分離し、血清中の炎症性サイトカインを Bioplex (Bio-Rad) により解析した。

#### (7) 肝臓の組織病理解析と評価

肝臓の組織病理解析のために、採材した肝臓はホルマリン固定後、パラフィン包埋し、薄切後に H&E 染色を行った。Histology Activity Index (HAI) score により肝臓の病態を数値化

する事で評価した。

#### (8) 免疫染色

採材した肝臓は OCT コンパウンドで包埋凍結し、薄切後 AlexaFluoro555 標識 CD206 および FITC 標識 F4/80 により M2 Mac の免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。10 視野を観察し、共局在している陽性細胞をカウントして平均化した。

#### (9) FACS 解析

肝臓からの白血球は、DNase I, Collagenase IV 消化後に Lympholyte-M により分離した。脾臓からは cell strainer を通すことで白血球を分離した。その後、recombinant IL-2 (50U/200  $\mu$  l), LPS (0.5  $\mu$  g/ml)、Golgiplug 存在下で 37°C、4 時間刺激した。細胞内サイトカイン染色を行うために CD16/32 により Fc block 後、F4/80, CD11b, CD206, CD11c, CD4, CD8 抗体で細胞表面を染色した。固定後さらに細胞内サイトカイン抗体 (IL-6, TNF- $\alpha$ ) で染色して、CantoII (BD) により FACS 解析を行った。

#### (10) 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 IHL と Splenocytes ( $1 \times 10^5$ ) 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/emp, EL-4/CN2, EL-4/N3-4A) ( $1 \times 10^4$ ) で刺激し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 48 時間培養、HCV 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生細胞を ELISPOT 法により測定した。

#### (11) 肝臓内ウイルス抗原の定量

凍結肝臓を RIPA buffer 存在下でセラミックビーズとともに攪拌する事で肝臓組織抽出液の作製した。肝臓組織抽出液中の HCV コア蛋白質発現量は市販の HCV core ELISA アッセイキット (Xpress Bio) を用いて定量した。

#### (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

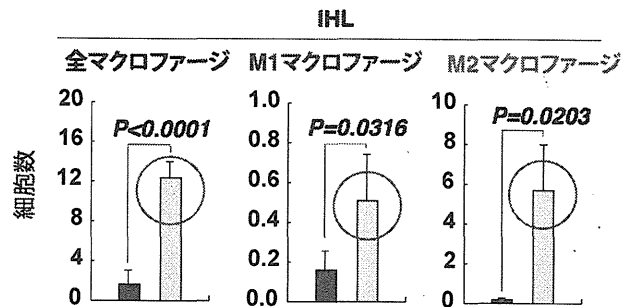
#### (1) マクロファージ枯渇により HCV-Tg マウスの肝臓の病態は改善する

これまでにMacにより産生される炎症性サイトカイン(IL-6とTNF- $\alpha$ )が慢性肝炎を呈するHCV-Tgマウスにおいて病態進行に深く関与することを報告してきた。肝炎におけるMacの役割についてさらに解析するために、HCV-Tgマウスにclodronate liposomeあるいはVehicle (PBS)を4日毎に2回静脈内投与してMacを枯渇させ、同時にrVV-N25あるいはrVV-Empを皮下接種し、7日後に採材した。M $\Phi$ 枯渇による血清中の炎症性サイトカインへの影響を調べたところ、clodronate liposomeを投与したマウスでは血清中のIL-6およびTNF- $\alpha$ の産生が減少した。FACSによりclodronate liposome投与後のCD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>肝臓内Mac数をカウントしたところ、clodronate liposome投与により約91%が減少した。rVV-N25接種群もまた肝臓内Mac数は減少し、clodronate liposome投与との組合せる事でさらに肝臓内Mac数が減少した。肝臓の病理学的変化をH&E染色後にHAI scoringにより評価したところ、clodronate liposome投与マウスは肝臓の病態が改善し、HAI scoreが減少した。これはMacがC型慢性肝炎に寄与することを示唆している。さらにFACS解析の結果と一致して、免疫染色でもclodronate liposome投与群ではF4/80陽性Macが減少した。

#### (2) M2マクロファージはC型慢性肝炎を呈するHCV-Tgマウスの肝臓と脾臓で増加する

肝臓におけるHCV蛋白質の発現がマクロファージの極性に影響するかどうか調べるために、HCV-TgマウスとNon-Tgマウスの肝臓、脾臓におけるM $\Phi$ の数、極性、炎症性サイトカイン産生について解析した。FACS解析によりCD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>MacをCD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>陽性M1様マクロファージ(M1 Mac)とCD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>陽性M2様マクロファージ(M2 Mac)に分類し、産生されるIL-6、

TNF- $\alpha$ の発現を調べた。HCV-Tgマウスの肝臓ではNon-Tgマウスと比べて約3倍Mac数が増加していた。C型肝炎を呈するHCV-Tgマウス肝臓ではM2 Macが主に増加していた。



さらにNon-Tgマウスに比べてM1 Mac, M2 MacからのIL-6, TNF- $\alpha$ 産生が有意に増加していた。これまでの報告では炎症性サイトカインは主にM1 Macから産生されることが知られていたが、興味深いことにHCV-Tgマウスの肝臓では主にM2 MacがIL-6, TNF- $\alpha$ を産生していた。免疫染色の結果からもHCV-Tgマウスの肝臓ではF4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>M2 Macの増加していたことから、IL-6, TNF- $\alpha$ 産生するM2MacがC型慢性肝炎の進展に関与することが示唆された。

#### (3) rVV-N25は肝臓内M2マクロファージの数およびサイトカイン産生を減少させる

rVV-N25はHCV-Tgマウスの肝臓においてMacを減少させ、さらに肝臓の病態を正常化することを示した。M2 MacにおけるrVV-N25の効果を調べるために、rVV-N25あるいはrVV-EmpをHCV-Tgマウスに接種し、7日後の肝臓および脾臓におけるM1/M2 Mac数とサイトカイン産生を解析した。血清中のIL-6はrVV-N25接種後有意に減少した。さらにFACS解析の結果から、rVV-N25接種によりHCV-Tgマウスの肝臓および脾臓のM2 Macの数およびIL-6産生が減少していた。rVV-N25接種後のHCV-Tgマウスの肝臓でのM2Mac数の減少は、免疫染色の結果とも一致していた。これらの結果は、M2 MacがrVV-N25の治療ワクチンの標的であることを示唆し

ている。対照的に肝臓ではM1 Mac数に有意差は認められなかった。

(4) 抗PD-1抗体投与ではウイルス抗原特異的CD8T細胞の活性化に影響を与えない

近年、C型慢性肝炎を呈するHCV感染者ではPD-1を高発現するエフェクター機能を欠損したCD8T細胞が増加しており、このCD8T細胞が増えることでウイルスを排除できずに慢性感染が持続するT cell exhaustionと呼ばれる状態になっていることが報告されている。HCVが慢性感染したチンパンジーの実験からPD-1抗体投与により肝臓内CD4、CD8T細胞の免疫反応を回復し、非細胞傷害性にウイルスRNAを減少することが報告された。そこでHCV-TgマウスにPD-1抗体を投与し、肝臓内のT細胞免疫を回復したところで、rVV-N25を接種する事でウイルス抗原特異的なCD4、CD8T細胞の活性化とウイルス抗原の排除が促進されるどうか調べた。PD-1抗体の単独投与では肝臓の病理像の改善は認められなかったが、rVV-N25単独およびPD-1抗体/rVV-N25の組合せで投与した時肝臓の病態が正常化した。さらに肝臓および脾臓から分離したリンパ球を、ウイルス抗原を発現するEL-4で刺激したところ、PD-1抗体単独およびPD-1抗体/rVV-N25の組み合わせでもウイルス抗原特異的なIFN- $\gamma$ 産生は見られなかった。さらにFACS解析によりCD4T、CD8T細胞におけるT細胞活性化を調べたところ、CD4T細胞はPD-1抗体を投与により有意にIFN- $\gamma$ の産生が上昇し活性化が認められた。実際に肝臓中のウイルス抗原(core)が減少するかどうかELISA kitで定量したところ、rVV-N25およびPD-1抗体/rVV-N25の組合せのみ有意にウイルス抗原の減少が認められた。

#### D. 考察

HCV感染による肝傷害と病態進行は、HCV特異的CD8T細胞を介した宿主免疫反応により進行すると考えられている。実際に強いCD8T細胞反応はHCV感染を排除した患者

で観察される。しかし我々の研究ではC型慢性肝炎は肝臓内マクロファージにより産生されるTNF- $\alpha$ 、IL-6を介することが示唆された。この違いを明らかにするために、C型慢性肝炎におけるMacの役割について明らかにした。HCV-Tgマウスの肝臓および脾臓ではCD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Macが増加しており、Macを枯渇することで肝臓の病態が正常化したことから、MacがC型慢性肝炎の原因であることを結論づけた。実際にクッパー細胞由来のIL-18、TNF- $\alpha$ のレベルがHCV患者の病態と関連することが報告され、HCV感染によりIL-1 $\beta$ 、IL-18などのtype I炎症性サイトカインの産生を誘導するが、HCVにより誘導されるマクロファージの極性についてin vitro, in vivoの両方で調べた報告はこれまで殆ど無い。我々は慢性肝炎を呈するHCV-Tgマウスの肝臓ではM1 Macではなく、M2 Mac数がおよそ10倍増加しており、高レベルのTNF $\alpha$ 、IL-6を産生していることを明らかにした。M2 Macは炎症の抑制や組織修復の促進に関与するので、M2 MacへのスイッチはHCVによる肝傷害を制御するための宿主の防御反応であるかもしれないが、一般的にはTNF- $\alpha$ やIL-6を産生するのはM1 Macである。IL-4、IL-10、IL-13のようなTh2サイトカインの産生については調べていないが、今回の結果からM2 Macがある条件下でTh1サイトカインを産生することが示唆された。これらの知見はM2 Macが慢性肝炎下では優位であり、Macの極性が肝臓の病態に依存して変化することを示している。最近、HBVが慢性感染したヒト化マウスモデルでも、M2 Macが優位であることが報告された。我々の実験から抗IL-6受容体に対する中和抗体の投与ではM2 Mac数に影響を与えなかった。Macに直接的IL-6シグナリングの阻害は行っていないが、M2 MacへのシフトにおけるIL-6の役割についてはさらに調べる必要がある。HCV-Tgマウスは脂肪変性を引き起こすが、脂肪酸と同族受容体のPPAR $\gamma$ 、PPAR $\delta$ はM2 Macの成熟を誘導する事が知られており、脂肪変

性がM2 Macの集積に関与するかもしれない。データは示さないがHCV-Tgマウスの肝臓でのM2 Mac数の増加を調べるために、骨髄のCD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup>陽性炎症性単球の相対率を解析したところ、HCV蛋白質の発現の有無で炎症性単球に有意な差は認められなかったことから、M2 Macは肝臓で限局的に増加していることが示唆された。

rVV-N25は肝臓内の炎症性サイトカインを産生するM2 Mac数を減少させるが、rVV-N25がどのように減少させるかについてはわかっていない。rVV-N25接種後のマクロファージの減少はアポトーシスの増加によるものではないことが分かった。さらに、rVV-N25がマクロファージに感染するかどうかPCR解析したところ、ワクチニアウイルスDNAは接種した皮膚だけに存在し、マクロファージが浸潤した肝臓、脾臓では検出されなかった。これらの結果はマクロファージの減少が、ワクチニアウイルスのマクロファージへの直接的な感染による細胞毒性ではなく、接種後の宿主免疫反応に起因していることが示唆された。C型慢性肝炎におけるM2 Mac数の増加とrVV-N25によるM2 Macの減少機序についてはさらに実験が必要とされる。

さらにrVV-N25によるウイルス抗原排除効果を上げるために、PD-1抗体による肝臓内T細胞免疫反応の活性化を試みた。HCV-Tgマウスを用いた実験から、PD-1抗体/rVV-N25との組合せによる肝臓内T細胞免疫反応の活性化は認められなかった。PD-1抗体単独でCD4T細胞のIFN- $\gamma$ 産生が有意に上昇したが、CD8T細胞の活性化にはつながらなかった。そのため、PD-1抗体/rVV-N25接種群はrVV-N25単独接種と比べて有意な差が認められなかった。すなわちHCV-Tgマウスでは、PD-1抗体投与によるrVV-N25のウイルス抗原排除効果に影響しないことが示唆された。HCV感染チンパンジーの報告でも、PD-1に無反応の個体も存在することが知られており、さらにPD-1抗体の投与をやめるとウイルス

RNAが元に戻ることから、rVV-N25接種によるウイルス抗原排除効果を上げるさらなる試みが必要であると考えられる。

## E. 結論

HCV-Tgマウスの肝臓では、M1 MacでなくM2 MacがIL-6, TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生する事でC型慢性肝炎を呈しており、M1 Macのような機能を持つM2 Macについての初めての知見が得られた。さらにrVV-N25は、炎症性サイトカイン産生M2 Macを減少させることで肝臓の病態を改善し、治療ワクチンとしての効果を発揮することが明らかとなった。

今後治療ワクチンの安全性を高めるために、rVV-N25のNS3プロテアーゼ、ヘリケース活性部位およびNS5BのRNA依存性RNAポリメラーゼ活性領域に変異を入れたワクチンをGMPに準拠して作製する。加えてさらなるrVV-N25の作用機序解明するため、NS2単独あるいはE1-NS5B (E1N5)を発現するrVV-HCVを作製し、治療ワクチン効果に必要な部位を決定したい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yutaka Amako, Tsubasa Munakata, Michinori Kohara, Aleem Siddiqui, Chris Peers and, Mark Harris. Hepatitis C virus attenuates mitochondrial lipid  $\beta$ -oxidation by down-regulating mitochondrial trifunctional protein expression . J. Virology (2015) in press.

2. Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus.

Immunity 2015 Jan 20;42(1):123-32.

3. Sayeh Ezzikouri, Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, Soumaya Benjelloun, Yoichiro Kino, Kazuaki Inoue, Akira Matsumori, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Inhibitory Effects of Pycnogenol® on Hepatitis C Virus Replication. *Antiviral Research* 2015 Jan;113:93-102.
  4. Kyoko Tsukiyama-Kohara and Michinori Kohara. *Tupaia belangeri* as an experimental animal model for viral infection. *Experimental Animals* 2014 Oct 30;63(4):367-74. Epub 2014 Jul 22.
  5. Chao-Kuen Lai, Vikas Saxena, Chung-Hsin Tseng, King-Song Jeng, Michinori Kohara, and Michael M. C. Lai. Nonstructural Protein 5A Is Incorporated into Hepatitis C Virus Low-Density Particle through Interaction with Core Protein and Microtubules during Intracellular Transport. *PLoS One*. 2014; 9(6): e99022.
  6. Tsubasa Munakata, Makoto Inada, Yuko Tokunaga, Takaji Wakita, Michinori Kohara, and Akio Nomoto. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclin-dependent kinase inhibitors. *Antiviral Research* 2014 Aug;108:79-87.
  7. Masaaki Arai, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asako Takagi, Yoshimi Tobita, Kazuaki Inoue and Michinori Kohara. Resistance to cyclosporin A derives from mutations in Hepatitis C virus nonstructural proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 23;448(1):56-62.
  8. Tsunamasa Watanabe, Hiroto Hatakeyama, Chiho Matsuda-Yasui, Yusuke Sato, Masayuki Sudoh, Asako Takagi, Yuichi Hirata, Takahiro Ohtsuki, Masaaki Arai, Kazuaki Inoue, Hideyoshi Harashima and Michinori Kohara. *In vivo* therapeutic potential of Dicer-hunting siRNAs targeting infectious hepatitis C virus. *Scientific Reports* 2014 Apr 23;4:4750.
  9. Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Masahiro Kitabatake, Toru Nishiwaki, Hideki Fujii, Chise Tateno, Misako Yoneda, Kouichi Morita, Kouji Matsushima, Shigeo Koyasu, Chieko Kai. Phagocytic cells contribute to the antibody-mediated elimination of pulmonary-infected SARS coronavirus. *Virology* 454-455:157-68. (2014).
  10. Sayeh Ezzikouri, Makoto Ozawa, Michinori Kohara, Naima Elmdaghri, Soumaya Benjelloun, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Recent Insights into Hepatitis B Virus-Host Interactions. *J. Med. Virology* 86(6):925-32. doi: 10.1002/jmv.23916. Epub 2014 Mar 6. (2014).
  11. 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- $\kappa$ B signaling. *PLoS ONE* 9(3):e91373. doi: 10.1371/journal.pone.0091373. eCollection 2014. (2014).
  12. Haru Ogiwara, Fumihiko Yasui, Keisuke Munekata, Asako Takagi-Kamiya, Tsubasa Munakata, Namiko Nomura, Futoshi Shibasaki, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Yoshihiro Sakoda, Hiroshi Kida and Michinori Kohara. Histopathological evaluation of the diversity of cells susceptible to H5N1 virulent avian influenza virus. *The American Journal of Pathology* 184(1):171-83 (2014).
2. 学会発表
1. 徳永優子、小原道法、須藤正幸: Non-DAA セリンパルミトイル基転移酵素阻害剤とDAA 併用による薬剤耐性株の出現を押さえた強力なHCV複製阻害 第50回日本肝臓学会総会 2014.5.29 (東京)
  2. 小原道法: 「免疫の賦活化によるウイルス性肝炎治療及び肝線維症治療に向けて」 第9回高輪ウイルス肝炎フォーラム 2014.6.14 (東京) (招待講演)
  3. 藤幸知子、堀江 亮、米田美佐子、倉石武、安井文彦、宗片圭祐、池田房子、基礎友里、権賢 貞、石井美穂、佐藤宏樹、服部正策、喜田 宏、小原道法、甲斐知恵: 霊長類感染モデルを用いた高病原性鳥インフルエンザウイルス抗原発現組換え麻疹ウイルスの防御効果の解析 第61回日本実験動物学会 2014.5.15-5.17(札幌)