

201423037A

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服実用化研究事業  
(B型肝炎創薬実用化等研究事業)

# HBV cccDNAの制御と排除を目指す 新規免疫治療薬の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

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  
(B型肝炎創薬実用化等研究事業)

HBV cccDNAの制御と排除を目指す  
新規免疫治療薬の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成27(2015)年 3月

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

研究組織

<u>研究代表者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系	教授
<u>研究分担者</u>		
今村 道雄	広島大学病院 消化器・代謝内科	診療講師
中本 安成	福井大学医学部内科学 (2)	教授
橋本 真一	金沢大学医学保健研究域医学系	特任教授
村上 清史	金沢大学医薬保健研究域医学系 分子遺伝学	研究員
石川 哲也	名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学専攻	教授
考藤 達哉	国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療研究室	室長
高橋 健	京都大学医学部附属病院・消化器内科	助教
加藤 孝宣	国立感染症研究所ウイルス第二部	室長
村口 篤	富山大学医学薬学研究部免疫学講座	教授
池田 裕明	三重大学大学院医学系研究科	教授
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	プロジェクト リーダー
水腰 英四郎	金沢大学医薬保健研究域医学系	准教授

# 目 次

## I. 総括研究報告

### HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

金子 周一	-----	01
-------	-------	----

## II. 分担研究報告

### 1. HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

金子 周一	-----	15
-------	-------	----

### 2. HBV感染マウスを用いたHBV cccDNA制御に関する研究

今村 道雄	-----	20
-------	-------	----

### 3. 抗HBV反応を増強する免疫賦活分子の探索

中本 安成	-----	22
-------	-------	----

### 4. HBV感染細胞のエピゲノム

橋本 真一	-----	26
-------	-------	----

### 5. HBVccc肝細胞株の樹立とHBVcccの制御機構

村上 清史	-----	29
-------	-------	----

### 6. HBV特異的免疫応答誘導の高効率化の試み

石川 哲也	-----	32
-------	-------	----

7. HBV感染症におけるNK-DC相互作用の解析		
考藤 達哉	-----	27
8. B型肝炎における自然免疫応答の解明		
高橋 健	-----	38
9. B型肝炎ウイルス感染が宿主のアポトーシスに与える影響の解析		
加藤 孝宣	-----	40
10. TCRクローニングとTCRを用いた細胞治療		
村口 篤	-----	43
11. TCR遺伝子導入リンパ球の作製とそれを用いた細胞療法の開発		
池田 裕明	-----	46
12. ペプチド+アジュバント併用療法の開発		
石井 健	-----	50
13. B型肝炎ウイルス由来細胞傷害性T細胞エピトープの同定と ペプチドワクチンの開発		
水腰 英四郎	-----	56
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	59
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	63

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金

[肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）]

総括研究報告書

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 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。本研究は免疫を用いて、cccDNAに対する新たな治療法の開発研究を行っている。本研究は大きく3つの課題、1) cccDNAの存在様式、および遺伝子発現調節機構の研究、2) cccDNA感染細胞に対する免疫監視機構の研究、3) cccDNA感染細胞に対する免疫治療法を開発を設定して進めている。核酸投与時を含めたcccDNAの存在様式および免疫系を加えた宿主の発現遺伝子、エピゲノム、ケモカインが解析され、新しいマウスモデルの確立とともに、plasmatoid dendric cellを標的とする治療法の重要性が示された。T細胞治療およびペプチド療法の標的とすべき抗原が同定され、用いるアジュバンドの開発、およびT細胞の開発研究が進捗した。研究は当初の計画どおりに進んでいる。

A. 研究目的

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対して抵抗性を示す。ウイルス増殖が低下し、HBVの再活性化がみられない症例の予後は良好である。即ち、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。再活性化は、宿主の免疫が低下するとみられる一方で、HBs抗体が

陽性の症例では稀にしかみられない。こうした事実から、再活性化はcccDNAと宿主の免疫応答によって制御されていると考えられる。しかし、再活性化に関わる免疫監視機構はほとんど明らかにされていない。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。

本研究は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。3つの研究要素よりなり、1) cccDNAの存在様式、および遺伝子発現調節

機構の研究、2) cccDNA感染細胞に対する免疫監視機構の研究、3) cccDNA感染細胞に対する免疫治療法の開発を行う。

## B. 研究方法、研究結果および考察

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した。分担研究者の報告は、それぞれに分担研究報告書がつけられているため下記に総括して記載した。

(倫理面への配慮)

各種の倫理指針を遵守して研究を実施した。

### ・研究代表者 (金子周一)

核酸アナログを投与された109例の慢性B型肝炎症例の肝がん発生率を解析した。また23例の肝組織遺伝子発現を解析した。また、末梢血の形質細胞様樹状細胞 (pDC) の遺伝子発現解析を行った。

核酸アナログを投与された109例の経過中36例 (33%) に肝発がんが認められた。肝発がんに関連する治療開始時のウイルス学的及び臨床因子をCox比例ハザードモデルにて解析すると、単変量で開始時年齢 (56歳超)、eAb陽性、ゲノタイプC、AFP陽性 (>10)、肝組織進展例 (F34) が挙げられた。多変量解析では開始時年齢 (56歳超) と肝組織進展例 (F34) が有意であった。累積発がん率はFib-4高値・低値及びHBcrAg陽性・陰性によって層別化された ( $p < 0.0001$ )。

核酸アナログ投与中HBcrAg陽性例12例とHBcrAg陰性例11例で肝内遺伝子発現を比較した。HBcrAg陽性例では陰性群に比しDNA

損傷、アポトーシス、蛋白翻訳、組織修復に関する遺伝子群の発現亢進を認め、免疫応答関連遺伝子の発現低下を認めた。

また、末梢血液のpDCの遺伝子発現変化ではHBcrAg陽性例ではpDCの機能の低下を示唆する遺伝子変化を認め、免疫制御分子の絞り込みを行った。

HBcrAg陽性例の肝で発現が増加する遺伝子1204個 ( $p < 0.05$ ) を抽出し、そのシグナルパスウェイの中心となるHub (ハブ) 遺伝子を同定した。これまでにHBVの転写を促進すると報告されているCEBP  $\alpha$ 、PPAR、HNF4、Sp1の発現亢進が認められた。

肝組織内のcccDNA、HBV-DNA及びpre-genome RNA (pgRNA) を測定すると、HBcrAg陽性例では陰性群に比し有意にHBV-DNA、pgRNAの発現高値が認められた。一方、cccDNA量では差が見られず、HBcrAg陽性例の肝組織では転写因子を介した活発なHBVの複製が起こっていると考えられた。

興味深いことに、HBcrAg陽性例・陰性例共に血中のHBV-DNAは良好にコントロールされていたが、HBcrAg陽性例では陰性例に比し有意に肝組織内HBV-DNA、pgRNAの発現高値が認められた。HBcrAg陽性例では肝組織内でcccDNAを鋳型として、転写因子を介した活発なHBVの複製が起こっていると考えられた。これらの転写因子をターゲットとした薬剤が肝内のHBV複製制御に働くと考えられた。また、HBcrAg陽性例ではpDCの機能の低下を示唆する遺伝子変化を認めた。HBV持続感染の機序の1つにHBcrAg陽性肝細胞が宿主免疫から逃避する可能性が示唆され、有用な免疫分子の絞り込みを行っている。



・研究分担者（今村道雄）

HBV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスからヒト肝細胞を摘出し DNA を抽出し real-time PCR にて HBV DNA を測定した。マウスにエンテカビル、PegIFN $\alpha$  を 12 週間、単独あるいは併用投与し、血中 HBV DNA 量および肝臓内 HBV cccDNA 量を測定した。

HBV 患者血清投与 8 週後、マウス血中 HBV DNA は  $10^{10}$  copy/mL、肝臓内 cccDNA は 6.02 copies/hepatocyte であった。2 mg/kg のエンテカビル（連日経口投与）または 30  $\mu$ g/kg の PegIFN $\alpha$ （週 2 回皮下注）を 12 週間投与したところ肝臓内 cccDNA はそれぞれ 5.1, 4.7 copy/cell であったが、両者を併用投与することにより肝臓内 cccDNA は 0.7 copy/cell に低下した。さらにより高用量である 20 mg/kg のエンテカビル（連日経口投与）または 300  $\mu$ g/kg の PegIFN $\alpha$ （週 2 回皮下注）を 6 頭のマウスに 6 週間投与したところマウス血中 HBV DNA は検出感度以下に低下し、肝臓内 cccDNA は  $0.12 \pm 0.14$  copy/cell に低下した。治療終了 13 週後、2 頭のマウスでは血中 HBV DNA が再陽性化した。4 頭のマウスでは感度以下が維持されていた。治療終了 13 週後の肝臓内 cccDNA は、血中 HBV DNA が再陽性化したマウスにおいては、 $0.84 \pm 0.12$  copy/cell であったが、血中 HBV DNA が検出感度以下を維持していたマウスでは、 $0.08 \pm 0.06$  copy/cell とより低値であった。

高容量のエンテカビルおよび PegIFN $\alpha$  を併用投与することにより、短期間の治療

においても肝臓内 cccDNA は、より低下した。肝臓内 cccDNA を十分に低下させることにより、治療中止後も肝内 HBV の増殖を制御できる可能性が示された。エンテカビルは比較的安全性の高い薬剤であり、高容量投与も今後考慮すべき治療法と思われた。

・研究分担者（橋本真一）

エピゲネティック薬剤を用い HBV 複製について、ヒストンメチル化阻害剤、ヒストン脱アセチル化阻害剤、DNA メチル化阻害剤、NF- $\kappa$ B 活性化剤を HBV 感染 PXB キメラマウス由来ヒト肝細胞に添加した。

ヒストンメチル化阻害剤 (Chaetocin, BIX01294) 及びヒストン脱アセチル化阻害剤 (TSA, SAHA) で HBV 感染細胞株 (Hep38.7, KM 細胞) を処理したところ BIX01294, SAHA で cccDNA のコピー数の増加が観察された。一方、PXB マウス由来新鮮ヒト肝細胞においてヒストンメチル化阻害剤及び TSA 添加により細胞内の HBV DNA が増加する傾向が観察されたが、逆に SAHA は細胞内の HBV DNA の量を低下させた。また、エピジェネティック薬剤と相乗効果がある抗 HIV 薬、prostratin についても同様な検討をしたところ興味深い事に HBV DNA の量を低下させた。

SAHA では synaptic transmission, cell-cell signaling, negative regulation of circadian sleep/wake cycle, prostratin では adenylate cyclase-activating serotonin receptor signaling pathway, cellular component movement に関連する遺伝子が増加した。

SAHA, prostratin について抗ウイルス

剤ラミブジン、エンテカビルとの併用を検討した結果、両薬剤ともにラミブジン、エンテカビル剤の効果を若干増強した。さらに IFN-alpha についても同様に検討したところ、prostratin では HBV DNA 量を低下させたが、SAHA 刺激では逆に上昇させた。

RNA-Seq により HBV 複製に関与していると予想される遺伝子が同定された。これらの遺伝子の局在は VCAN, ADAM12 を含めて細胞膜に関連する遺伝子が多く観察された。このことは HBV の複製に細胞同士の相互作用が重要である事を示している。HBV に対する抗体が何らかの作用で HBV 複製を抑制している事を考えると、今回、明らかになった遺伝子のシグナルを調べる事は非常に興味深いと思われた。

#### ・研究分担者（村上清史）

HBx の siRNA を作成し、HBx が HBV 複製に及ぼす影響を検討した。HBx 導入が影響を及ぼす転写因子の同定を行った。247 例の HBV による慢性肝炎患者のアレイデータ、臨床データを用いて同定した転写因子の検討を行った。

siRNA による HBx 発現抑制の実験において、HBx 発現の 60%抑制で HBV の複製が約 40%抑制された。遺伝子発現の包括的検討により、野生型 HBx 導入細胞は空ベクター導入細胞と異なった遺伝子発現パターンを有していた。

発現パターンの比較により、野生型 HBx 関連遺伝子 773 個、HBx-D5 関連遺伝子 303 個が同定され、HBx-D5 関連遺伝子の 69% が野生型 HBx 関連遺伝子と重複していた。

IPA 解析により、HBx 導入により活性される 11 個の転写因子が同定された。11 個の転写因子に関して、転写因子ごとに阻害剤、siRNA による発現抑制を用いて HBV 複製の検討を行った結果、6 個の転写因子が HBV 複製の活性化に関与していることが分かった。

さらに 247 例の HBV 感染患者の臨床サンプルを用いた検討により、6 個の転写因子のうち 3 個 (DNMT3A1、NR3C1、KDM5B) が特に重要な働きをしていることが示された。247 例の肝がん患者の臨床サンプルを用いた検討では、3 個の転写因子が発現亢進し、予後に関与していることが分かった。

HBx は HBV の複製に必須の蛋白質であり、その転写活性を調節することで HBV の複製を制御できる可能性が示唆された。さらに HBx は幹細胞性を有する肝細胞がんを高発現しており、HBx の転写活性化能の解明が予後不良な HBV 関連肝がんの予後改善に繋がる可能性が示唆された。

#### ・研究分担者（中本安成）

既報の HBV に対する細胞障害性 T リンパ球 エピトープを含む免疫反応が、慢性肝炎を発症するモデルが確立されている。本モデルにおいて、胸腺摘除、骨髓再構築、脾細胞移植の操作によって、慢性肝炎を誘導し約 18 ヶ月の経過で肝細胞がん（肝がん）を発症するという特長がある。本研究では、経時的に得られた肝組織を用いて、RNA レベルの網羅的発現解析（DNA チップ）、タンパクレベルの検討（Western blot 法、免疫組織学的）を行った。

1) 慢性肝炎モデルでは発症 9 ヶ月以降

のHBsAg染色性が著明に低下しており、これと逆相関するように、肝組織の発現遺伝子プロファイルにおいて、ケモカインCCL5/CCR5分子とその下流シグナルSTAT3経路が亢進していた。2) 1.3倍長HBVゲノムをHepG2細胞に遺伝子導入することによって、一過性発現系を確立し培養上清にHBsAgを検出した。3) HepG2細胞に対して組換え型CCL5を作用したところ、リン酸化STAT3 (pSTAT3) の誘導を認めた。4) HBVゲノム一過性発現系においてCCL5を作用したところ、HBsAg発現がIL-6 (陽性対照) と同様に低下した。5) 1.3倍長HBVゲノムをHepG2細胞株に導入して恒常的に発現するクローン (安定発現系) を作成して検討したところ、CCL5の効果は明らかではなかった。6) HBVジェノタイプB1/C2を用いて一過性発現系において比較したところ、ジェノタイプC2において細胞内および培養上清でのHBV-DNAやHBsAg産生が亢進していた。これに対して、ジェノタイプB1では細胞内cccDNAの高値を認めた。またB1を用いた際の培養上清にはHBV-DNAが検出されなかった。

HepG2細胞への組換え型CCL5の作用 (pSTAT3) を認め、HBVゲノム一過性発現系におけるHBsAg発現が低下した。これらの結果は、CCL5が肝細胞に作用してSTAT3経路を活性化することによって抗ウイルス効果を発揮することを示唆するものである。HBVジェノタイプの異なるウイルスクローンを用いて検討することによって、細胞内や培養上清のウイルスゲノム・HBsAg量に違いを認めた。なかでもジェノタイプB1/C2間の比較において、産生されるウイルス

ゲノム量と細胞内cccDNA量が相関していないことが観察された。今後は、HBVジェノタイプの違いや変異株におけるcccDNAの制御機構を検討することによって、より詳細な抗ウイルス機序が明らかになる可能性が示唆された。

・研究分担者 (石川哲也)

B10.D2 マウス (H-2d)、HBsTg (B10.D2 background)、HBsTg-ID0-/- (HBsTg と ID0 ノックアウトマウスとを掛け合わせたもの) を、それぞれHBsAgにより免疫、脾細胞を回収し、HBsAg 特異的免疫応答、特にHBs-CTLの誘導効率を解析した。さらに、HBsAgでの免疫時、 $\alpha$ -GalCer、K3、K3-SPGをアジュバントとして使用した場合のHBs-CTLの誘導効率について、それぞれのマウスを用いて比較した。

B10.D2において、HBsAg単独での免疫時に比較し、 $\alpha$ -GalCerをアジュバントとして使用した場合にHBs-CTLの誘導効率は上昇した。また、K3あるいはK3-SPGをアジュバントとして使用した場合には、更にHBs-CTLの誘導効率が上昇した。HBsTgにおいては、HBsAg免疫時に $\alpha$ -GalCer、K3、K3-SPGのいずれをアジュバントとして使用した場合でも、HBs-CTLの誘導はみられなかった。しかし、HBsTg-ID0-/-においては、 $\alpha$ -GalCerではHBs-CTLの誘導は明らかでなかったものの、K3あるいはK3-SPGをアジュバントとして用いた場合には、比較的効率よいHBs-CTLの誘導が確認された。B10.D2において、HBsAg+K3での免疫時、ID0阻害剤である1-MTを併用するとHBs-CTLの誘導効率が上昇したことにより、

IDO のノックダウンによる効果は 1-MT の併用でも得られる可能性が示唆された。

今回の検討で用いた CpG ODN である K3、1-MT は、いずれも臨床での使用が視野に入っている薬物であり、また、免疫に用いた HBsAg は実際に感染予防用ワクチンとして実際に使用されているものを用いている。今後は、実際の臨床応用を視野に入れ、ヒトキャリアのモデルである HBsTg における HBsAg+K3+1-MT の HBs-CTL の誘導効果を確認するとともに、ヘルパーT 細胞、抗体など、CTL 以外の免疫応答の誘導効果についても多面的に検討していく予定である。

・研究分担者（考藤達哉）

HBV に感染していない健康成人の PBMC からソーティングによって DC サブセット（PDC、MDC、BDCA3+DC）と NK 細胞を採取した。1.4 倍長の HBV ゲノムを Huh7 に遺伝子導入する系（HBV-Huh7）を用いた。HBV-Huh7 を、ヒト末梢血から分離した DC サブセットと NK 細胞と共培養し、I 型、II 型、III 型 IFN の産生と肝細胞 ISG の誘導、及び HBV 複製抑制効果との関連性を検討した。また HBV-Huh7 単独、NK/PDC との共培養条件での Huh7-HBV 内の遺伝子発現を網羅的に解析し、HBV 複製抑制に関与する因子を抽出した。

NK 細胞は HBV-Huh7 との共培養で IFN- $\gamma$  を産生し、HBV 複製を抑制した。PDC は HBV-Huh7 との共培養で IFN- $\alpha$ 、IFN- $\lambda$  を産生し、NK の Granzyme B、TRAIL 発現を亢進させ、HBV 複製抑制効果を増強した。HBV-Huh7 細胞内に IFN- $\alpha$  誘導性 ISG 群（APOBEC3G、ISG15、IFIT1、MxA など）が

誘導された。IFN- $\alpha$  中和抗体、抗 TRAIL 抗体、抗 NKG2D 抗体の添加によって HBV 複製抑制は減弱した。

NK 細胞、PDC は HBV 感染肝がん細胞を異なる機序で認識することで活性化し、IFN を産生すると考えられた。NK 細胞と PDC の共存では IFN- $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\lambda$  産生量が増加したことより、NK-PDC 相互作用により活性化が増強される。HBV の認識機構や NK-PDC 相互作用の機序の解明は、治療標的の同定に繋がる可能性があると考えられた。

・研究分担者（高橋 健）

(1) インターフェロン処理を行った健康人由来の末梢血単核球、(2) インターフェロン治療中の B 型肝炎急性増悪患者から採取した末梢血単核球、(3-1) *Fah*<sup>-/-</sup>*Rag2*<sup>-/-</sup>*I12rg*<sup>-/-</sup>マウスをベースとしたヒト肝細胞キメラマウスに *in vivo* で HBV 感染をさせ採取した HBV 感染肝細胞、(3-2) *in vitro* の実験系として HBV の entry factor NTCP を安定して発現する HepG2-NTCP 細胞に HBV を感染させて得た HBV 感染肝細胞、のそれぞれを対象として、次世代シーケンサー Ion Proton システム（ライフテクノロジー社）を用いて RNA-seq を行い、遺伝子発現プロファイルを解析した。

(1) 予備実験として行った健康人末梢血単核球のインターフェロン刺激サンプルを用いた RNA-seq では、既知や未知のインターフェロン誘導性遺伝子 (ISG) が数多く検出された。(2) インターフェロン治療中の B 型肝炎急性増悪患者を対象とした RNA-seq では、治療前・中・後の末梢血単核球

で、自然免疫関連遺伝子を含む多くの遺伝子で発現変動を認め、内因性の ISG 発現が一部示唆された。(3-1, 3-2) ヒト肝細胞キメラマウスへの *in vivo* HBV 感染実験から得られたウイルス感染肝細胞と、HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞を対象として行った RNA-seq では、非感染細胞との比較にて自然免疫関連遺伝子の有意な発現変動を認めなかった。遺伝子 Ontology 解析において、HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞では核内輸送関連の遺伝子が有意に抽出された。

HBV 感染に伴う自然免疫関連遺伝子の発現変動を、患者由来の免疫細胞では検出したが、HBV 感染細胞では *in vivo*, *in vitro* の二つの独立した実験系で検出しえなかった。

・研究分担者 (加藤孝宣)

培養細胞での複製とウイルス粒子生成が可能な1.4倍長のHBVゲノムを持つコンストラクトを作製した。遺伝子型A, B, C, HのHBV株で、成人でのB型急性肝炎から慢性化した症例から得られたHBV株を含む8クローンについて検討を行った。これらのHBV全長を発現するコンストラクトをHepG2細胞に遺伝子導入し、さらにTNF- $\alpha$ とActinomycin Dで処理することによりアポトーシスを誘導した。

HBV遺伝子型A株2種類、遺伝子型Bj株2種類、遺伝子型C株3種類、遺伝子型H株1種類の合計8株のHBV1.4倍長ゲノムを持つコンストラクトを作製し、HepG2細胞へ遺伝子導入した。遺伝子型A株HBVの陽性細胞では陰性細胞と比較し、ほぼ同程度のアポトーシス誘導率であったが、遺伝子型Bj

株HBVの陽性細胞では陰性細胞と比較しアポトーシスが誘導された細胞が多く認められた。遺伝子型C株HBVの陽性細胞では、アポトーシス誘導率は遺伝子型A株とB株の中間の値を示し、アポトーシス感受性は株によって異なっていた。遺伝子型H株HBVを含む急性肝炎慢性化例由来株の導入では、他の株に比べ低いアポトーシス感受性を示した。さらにアポトーシスに関わるCaspase-8、Caspase-9、Caspase-3/7において、どのCaspaseがアポトーシス感受性に関わっているかを検討したところ、すべてのCaspaseの活性化プロファイルはPoly-Caspaseのプロファイルとほぼ同様であり、アポトーシス感受性の高い細胞では最も上流のCaspase-8の活性化が起こっていると考えられた。

HBV感染細胞はアポトーシス誘導に対して感受性が高くなっていた。遺伝子型Bj株の導入細胞では高く、遺伝子型A株の導入細胞では低いアポトーシス感受性を示した。また、成人でのB型急性肝炎慢性化症例から得られた株の導入細胞では、他の導入細胞に比べアポトーシス感受性が低下していた。

・研究分担者 (水腰英四郎)

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、エピトープスクリーニングにおいて、免疫治療に有用と考えられるエピトープを選択し、HLA-A24トランスジェニックマウスを用いて、ペプチドワクチンとしての有用性を検証した。

large S領域から31種類、pre-core/core

領域から14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、これらのペプチドとヒトリンパ球を用いて、ペプチドに反応しインターフェロンガンマを産生するCTLを検出するためのELISPOTアッセイシステムを構築し、免疫反応を測定した。

これまでに50例のHBV感染患者（HBV既感染者3例、未治療慢性肝炎患者22例、核酸アナログ製剤による治療中の慢性肝炎患者17例、急性肝炎患者2例、肝機能正常キャリアー6例）において末梢血リンパ球の免疫応答の解析が終了しており、93種類のHBV由来ペプチドのうち49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3例以上において陽性反応を認めたペプチドは6種類であり、うち2種類ではペプチドの刺激によりCTLの誘導が可能であった。HBV由来エピトープに特異的なCTLの免疫応答は、核酸アナログによるB型肝炎の治療後において増強していた。

HLA-A24トランスジェニックマウスを用いた検討では、上記エピトープ由来のペプチドワクチンによる免疫誘導効果と安全性が確認された。また、ペプチドワクチンを作製する際のアジュバントとして、モンタナイドISA-51やCpGODNの有用性が明らかになり、両者の併用がワクチンによる免疫誘導効果をより強く誘導できることを証明した。

新規HBV由来ペプチドとアジュバントとの組み合わせにより、HBV排除を目的とし

たペプチドワクチン開発の可能性が示された。今後は、さらに各エピトープに対する免疫反応と細胞内HBVcccDNAとの関連を培養細胞やヒト肝組織で検証するとともに、ペプチドワクチンのヒトでの安全性を検証するための臨床試験が必要と考えられた。

・研究分担者（村口 篤）

HBV由来ペプチドは、金沢大学にて同定した HLA-A24 結合性のペプチド 21, 43, 53, 55, 81, 91 の 6 種類を用い、リンパ球は健常人ドナーの末梢血リンパ球（PBL）を用いた。PBLに、抗原ペプチド6種類を混合したペプチドミ混合物で刺激し、活性化マーカーCD137の発現を指標に、ペプチド混合物により活性化されたT細胞を検出した。単一の細胞より TCR cDNA を増幅し、TCR 遺伝子の配列を決定し、TCR レパートリーを解析した。同じ TCR $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のペアをもつ、クローナルに増殖していると考えられる T 細胞クローンの TCR を発現ベクターに導入し、内在性 TCR を発現していない TG40 T 細胞株に導入し、抗原特異性を検証している。

HLA-A24 陽性の健常人 6 名の PBL を HBV 由来ペプチド混合物を用いて刺激し、4 名 (donor1, 2, 4, 5) のリンパ球においてコントロール群と較べて抗原ペプチドで刺激した群で CD137 の発現増強が観察されたため、CD137 陽性 CD8 陽性細胞を単一細胞ソートした。TCR $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖のアミノ酸配列を単一細胞レベルで解析した結果、CDR3 の部分も含めて完全に配列が一致する細胞群が、それぞれのドナーに複数観察された。得られた TCR cDNA を発現ベクターに組み

込み、内在性 TCR 陰性の TG40 T 細胞株で発現させて、抗原特異性の解析を行っている。現在までに、ドナー2からは4種類の TCR の発現ベクターを作製し、HBV ペプチドに対する反応を調べたが、ペプチド特異性を示すことはできていない。現在、さらに解析を進めている。

HBV ペプチド刺激に反応し CD137 発現細胞が増加したこと、さらに TCR レパートリーの解析から、クローナルな増殖が観察されたことから、健常人ドナーの PBL 中に HBV に特異的な T 細胞が存在することが示唆された。現在までに解析した TCR は HBV ペプチドの特異性が観察されなかったが、これは、1 個の T 細胞に 2 種類の TCR が発現することが頻繁に見られることが知られているので、現在までに解析した TCR と別の同一 T 細胞由来の TCR を解析し直すことで、抗原特異性を示せると考えられた。

・研究分担者（池田裕明）

MAGE-A4特異的HLA-A2402拘束性TCRとNY-ESO-1特異的HLA-A0201拘束性TCRについて、正常組織由来エピトープに対する交差反応性の可能性を検討した。エピトープペプチドのアラニン置換スキャンを行い、エピトープに必須のアミノ酸を同定し、データベース検索により必須アミノ酸を共有する正常組織由来エピトープペプチド候補を検索した。交差反応性候補ペプチドを合成し、TCR遺伝子導入細胞による認識の有無を確認した。ファージディスプレイライブラリー法を用いて、HLA-A\*24:02とWT1抗原由来エピトープペプチドとの複合体を認識するscFv抗体を取得し、この抗体を利用したキ

メラ抗原受容体（CAR）発現T細胞を作製した。

認識エピトープペプチドの中でHLA-A2402への結合とTCRによる認識に必須のアミノ酸配列を同定した。データベース検索により必須のアミノ酸配列を共有する正常組織由来エピトープペプチドがそれぞれ複数見つかった。これらのペプチドを合成し、ペプチドパルス細胞に対するTCR遺伝子導入T細胞の反応性を検討したが、いずれのペプチドに対する反応性も確認されなかった。HLA-A\*24:02とWT1抗原ペプチドの複合体を特異的に認識するscFv抗体を取得した。本scFv抗体、CD3ゼータ鎖細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)を発現するヒトリンパ球を作製すると、抗原ペプチドパルス細胞及び内因性にWT1抗原を発現するHLA-A\*24:02陽性細胞を特異的に認識し破壊した。

MAGE-A4特異的HLA-A2402拘束性TCRとNY-ESO-1特異的HLA-A0201拘束性TCRは正常細胞タンパク質由来のエピトープに交差反応する可能性は低いと考えられた。また、WT1抗原とHLA-A24:02の複合体を特異的に認識するキメラ抗原受容体（CAR）発現T細胞の作製に成功した。

・研究分担者（石井 健）

ナノ粒子型 TLR9 リガンドである K3-SPG を他の研究班員に供与し、B 型肝炎の治療に有用であるか検討した。また、新たなワクチンアジュバント開発のため、TLR9 リガンドである K3 を基盤とし、異なる自然免疫活性化分子と組み合わせる事で、アジュバントとしての効果をヒト細胞、マウス

を用いて検討を行った。

TLR9 リガンドである CpG ODN (K3) と  $\beta$  グルカンであるシゾフィラン (SPG) との複合体である凝集塊のないナノサイズの粒子状アジュバント K3-SPG の開発に成功した。K3-SPG はペプチドワクチンのアジュバントとしても働く事、さらにはヒト末梢血単核球に作用し、強力に IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  産生を誘導した。この新規アジュバント K3-SPG の B 型肝炎治療としての有用性を検討する為に、共同研究先への提供を行った。いくつかの共同研究先では、B 型肝炎治療における K3-SPG の有用性を示す結果が得られている。

CpG ODN を基盤とした新しいアジュバントの開発を行う為に、異なる自然免疫活性化分子である cGAMP を用いて検討を行った。この cGAMP は二本鎖 DNA の代謝産物であり、STING と呼ばれる分子を直接活性化することで自然免疫応答を誘導する事が知られている。この cGAMP と CpG ODN である K3 を同時にヒト末梢血単核球に刺激する事で、単独での刺激時に比べて強い IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  産生を誘導した。さらに、この組み合わせはマウスに抗原と投与する事で、非常に強力なアジュバントとして働く事を見いだした。

K3-SPG を大量に作製する事で、他の班員との共同研究を始める事が出来た。実際に、いくつかの系で、K3-SPG の有用性が確認出来たため、今後は投与量などを検討するとともに、GMP ロットの開発も行って行く必要がある。

また、K3-SPG とは異なるアプローチとして CpG ODN に cGAMP を加える事で強力な

アジュバントとして働く事を見いだした。この結果は、異なる作用機序を有するアジュバントを組み合わせる事で、それぞれの特徴を生かした獲得免疫応答を誘導する事ができ、B 型肝炎治療または予防に適したアジュバントの開発が期待される。今後は、これらの組み合わせがペプチドワクチンのアジュバントとしても有用であるか、また B 型肝炎治療に適しているかの検討が必要である。さらには、これらのアジュバントが cccDNA を除去する事が可能であるかの検討を進めて行く事が重要であると思われた。

### C. 結論

3 年間の成果と合わせて記載した。

1. 核酸アナログの投与によって変動する HBV および宿主の遺伝子、免疫系を解析した。核酸アナログによる肝臓内の免疫応答遺伝子の動態は HBcr 抗原の量と相関しており、治療中、myeloid dendric cell の機能は回復するが plasmatoid dendric cell の機能回復が見られないことが明らかとなった。核酸アナログの投与によってウイルス排除が成立しない背景に、自然免疫の障害が示された。HBcr 抗原陽性例においては HNF4、Sp1 など HBV の転移促進因子の発現亢進がみられ、これらの宿主の転写因子を標的とする薬剤のスクリーニングを行った。

2. ヒト肝細胞キメラマウスを用いて real-time PCR により肝内 HBV cccDNA の定量系を構築した。また HBV を感染させたヒト肝細胞移植 TK-NOG マウスにヒトリンパ球の投与を行い、免疫再構築を行い、重



症肝炎モデルマウスの系を作製した。これによってキメラマウスにおいても免疫系の関与を検討することができるマウスモデルを確立した。

3. HBs 抗原のエピトープ (CTL-L<sup>d</sup> 拘束性 HBs28-39 を含む) が誘導する慢性肝炎マウスモデルにおいてウイルス産生を制御する分子免疫機序について検討した。肝組織において、ケモカイン CCL5/CCR5 分子が関連する STAT3 および NFκB 経路が亢進していた。また、HBV1.3 ゲノム長遺伝子を導入した肝細胞株では CCL5 が細胞内の STAT3 をリン酸化してウイルス産生を抑制している可能性が示され、ケモカインを標的とする治療法の可能性が示された。

4. ヒストンメチル化阻害剤 (Chaetocin, BIX01294) 及びヒストン脱アセチル化阻害剤 (TSA, SAHA) を用いて HBV 感染細胞株 (Hep38.7, KM 細胞) を処理したところ BIX01294, SAHA によって cccDNA のコピー数の増加が観察された。PXB マウス由来新鮮ヒト肝細胞では、ヒストンメチル化阻害剤及び TSA 添加で細胞内の HBV DNA が増加する傾向が観察されたが、逆に SAHA は細胞内の HBV DNA の量を低下させていた。これによって、HBV のクロマチン構造を標的とする治療法の可能性が示された。

5. HBV の複製は HBx の抑制により著明に低下を認め、HBx が HBV 複製に重要な役割を担っていることを示した。遺伝子発現の包括的解析では、HBx により発現が誘導される 834 個の遺伝子群を同定し、その遺伝子群を用いた転写因子解析により 6 個の転写因子を HBx 関連活性化転写因子と同定した。HBx を標的とする治療法の開発研究を

行った。

6. K タイプの CpG-oligodeoxynucleotide である K3、あるいは K3 に Schizophyllan を結合させた K3-SPG をアジュバントとして用い、インドールアミン酸素添加酵素 IDO 発現の抑制下で免疫実験を行ったところ HBs-CTL の誘導が確認された。HBs 抗原とアジュバントを用いて臨床研究を行うことが可能であると思われた。

7. 肝がん細胞株 (HepG2.2.15) を用いて、ヒト末梢血から分離した DC サブセットと共培養することで、PDC は IFN- $\alpha/\beta$ 、IFN- $\lambda$  を産生することを明らかにした。HBV-Huh7、PDC、NK 細胞との共培養系を用いて、HBV 複製抑制においては DC と NK の相互作用が重要であり、PDC は NK 細胞の HBV 複製抑制効果を増強することを明らかにした。NK-DC による Non-Cytopathic 機序を介した HBV 複製抑制に APOBEC3G が関与することを示した。また NK 細胞の Cytopathic 機序による HBV 抑制には TRAIL、FAS-L が関与していた。

8. 治療前・中・後の末梢血単核球で、自然免疫関連遺伝子を含む多くの遺伝子で発現変動を解析した。ヒトキメラマウスを用いた HBV 感染実験における RNA-seq では、これまでの予想に反して感染細胞では自然免疫応答がむしろ抑制されており、自然免疫によるウイルス排除の重要性が示された。

9. 異なる HBV 遺伝子型のゲノムを HepG2 細胞へ導入し HBV の複製を確認した。遺伝子型 H の HBV 株導入細胞ではアポトーシスの誘導が抑制されていた。詳細な検討の結果、この株の導入細胞では TNF- $\alpha$  レセプター直下の Caspase 8 の活性化が抑制され

ていることが明らかになった。この検出された事象はHBVが関わる感染細胞の排除に関与している可能性があった。

10. TCRを取得できる技術を開発した。同定したHLA-A\*2402に結合することが予測されるペプチドで、B型肝炎ウイルス感染患者のCD8<sup>+</sup>T細胞の刺激でサイトカイン産生が誘導される6種類のペプチドを用いて、ペプチド特異的TCRをクローニングすることを目的として研究を行い、活性化マーカーであるCD137の発現を指標に21種類のTCR cDNAを候補TCRとして取得した。TCRを利用した免疫療法の開発を進めている。

11. TCR遺伝子導入リンパ球輸注療法の近交系マウスモデルを確立し、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 (siTCRベクター) を用いて非自己T細胞を用いた抗原特異的T細胞療法を開発した。siTCRベクターに2Aペプチドの導入とジスルフィド結合を組合せ、導入TCR遺伝子の発現をさらに高め、より安全性の高い新規ベクターの開発を行った。ヒトへの応用を進めている。

12. TLR9リガンドとしてK3-SPGの開発に成功した。従来のCpG ODNに比べ強力なアジュバントとして働く事を明らかにした。細胞傷害性T細胞(CTL)反応を誘導する事ができた。ヒト末梢血単核球をK3-SPGで処理した結果、強くI型、II型インターフェロン産生を誘導した。新規ワクチン開発に大きく貢献出来る可能性を有していた。安全性および有効性の臨床試験を計画する段階に入っている。

13. HBV genotype Cのアミノ酸配列を

基に93種類のペプチドを合成し、免疫原性の強いペプチドのスクリーニングを行った。ELISPOT assayにより6種類が候補として選択された。6種類のペプチドのうち、2種類のペプチドにおいてin vitroにおいて細胞傷害性T細胞の誘導が可能であった。HLA-A24 transgenic mouseに候補ペプチドをアジュバントと共に投与したところ、強い免疫誘導効果が認められた。

#### D. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

#### F. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得

特許出願

1) 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

発明者: 石井 健・小檜山 康司・青枝大貴、武下 文彦・粕谷 祐司・丹羽貴子・小泉 誠

出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所・第一三共株式会社

出願日: 平成26年9月19日

出願番号: 特願 2013-196206, PCT/JP2014/074835

2) 発明の名称: 免疫賦活活性を有する核酸多糖複合体の抗腫瘍薬としての応用

発明者: 石井 健・青枝 大貴・小檜山 康司

出願人: 独立行政法人医薬基盤研究所

出願日: 平成26年12月26日

出願番号: PCT/JP2014/084772

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

## II. 分担研究報告