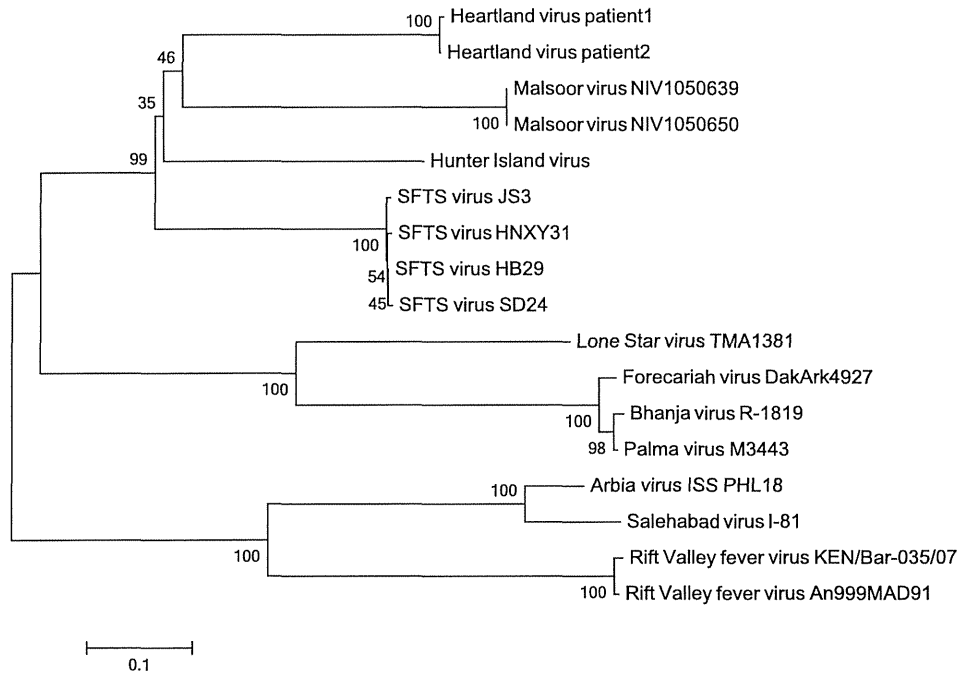


(新興ウイルス感染症分野)

新興ウイルス感染症-図1. SFTSウイルス群とBhanjaウイルス血清型、RVFウイルス等の

N蛋白質配列による分子系統樹



新興ウイルス感染症-表1. ELISAによるForecariah, Palma, SFTS virusの血清学的交差

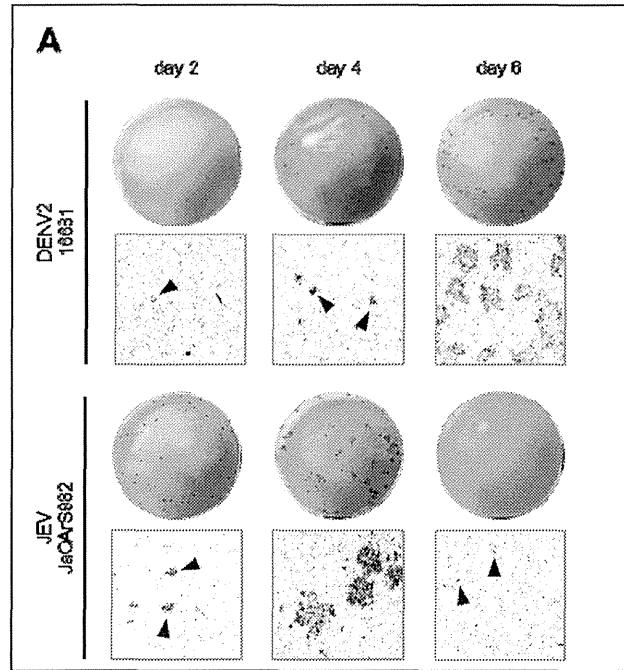
ウサギ血清	感染後率	Forecariah	SFTS	比率
Forecariah #1	6週間	204,800	800	256
Forecariah #1	4週間	3,200	<100	>32
Forecariah #1	2週間	1,600	<100	>16
Forecariah #1	1週間	100	<100	>1
anti-SFTSV		<100	512,000	>5120

新興ウイルス感染症-表2.IFによるForecariah, Palma, SFTS virusの血清学的交差

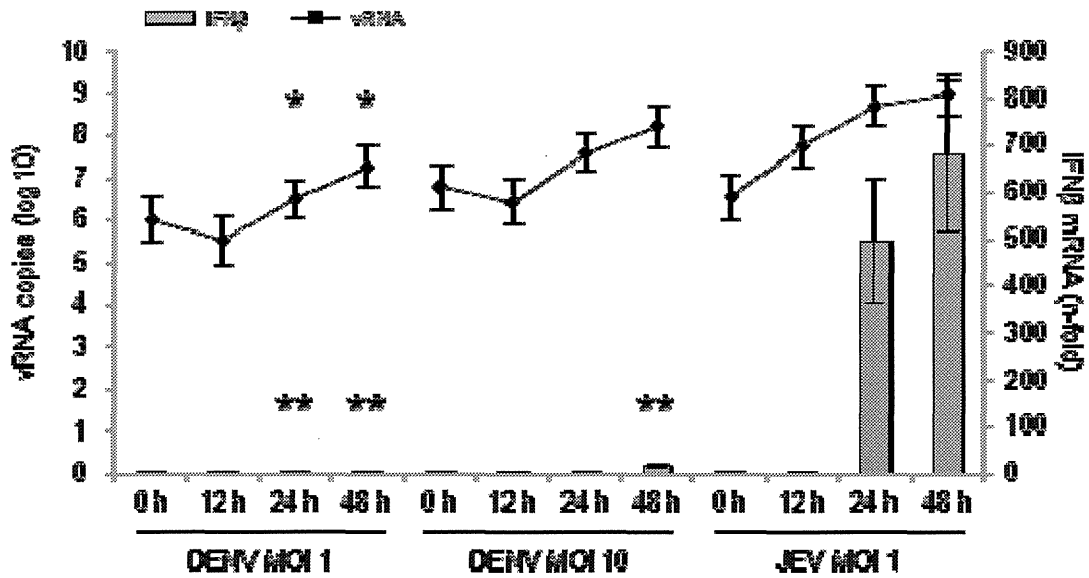
ウサギ血清	感染後率	Forecariah	SFTS	比率
Forecariah #1	6週間	5,120	<10	>512
Forecariah #1	4週間	160	ND	
Forecariah #1	2週間	ND	ND	
Forecariah #1	1週間	ND	ND	
anti-SFTSV		<10	>6400	>640

(アルボウイルス感染症分野)

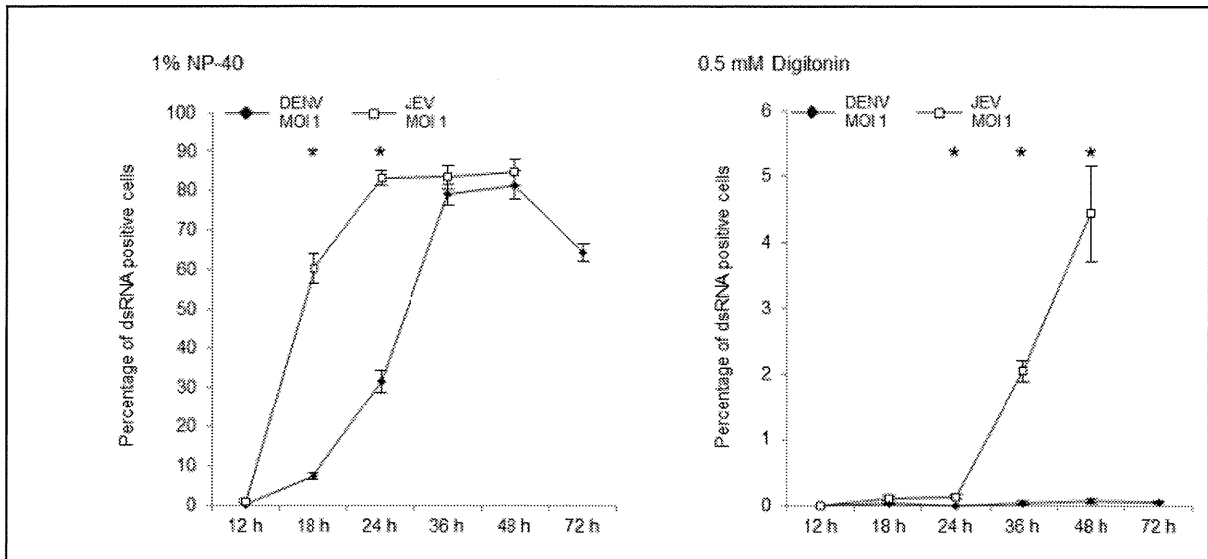
アルボウイルスー図1 デングウイルスと日本脳炎ウイルスのHeLa細胞でのフォーカス形成の差異



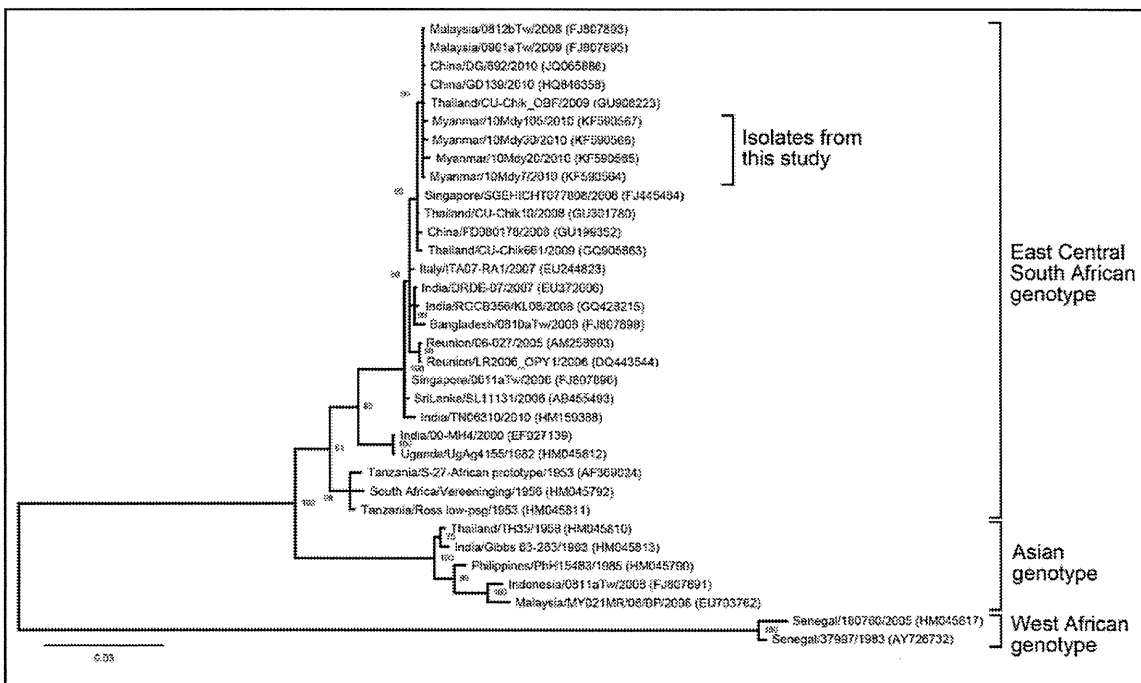
アルボウイルスー図2 デングウイルスと日本脳炎ウイルス感染細胞でのIF産生比較



アルボウイルスー図3 デングウイルス、日本脳炎ウイルス感染細胞の dsRNA の局在



アルボウイルスー図4 ミャンマーで分離されたチクングニアウイルス株の分子疫学解析



## ウイルス肝炎の研究・米側との専門協議

担当責任者： 小池和彦 東京大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：本研究は、日米医学協力研究会（USJCMSP）肝炎部会（以下『日米肝炎』と略す）の活動の一環として実施された。日米肝炎が、アジアに特に蔓延する肝炎ウイルスとしてB型とE型（HBV, HEV）、将来の感染拡大が懸念される肝炎ウイルスとしてC型（HCV）を主要標的として定めたことに呼応し、本研究班の今年度の研究活動も主にこの三種の肝炎ウイルスに関するものであった。更に、最近A型肝炎についても対象として研究を行っている。本年度は、B型肝炎に関して、免疫反応をもつB型肝炎マウスモデルの確立、B型慢性肝炎の免疫治療、HBV感染におけるエピトープ解析、miRNAによるHBV複製制御の機構解析、HBVエントリー阻害薬の開発、バングラデシュにおけるB型肝炎対策、肝発癌制御の試み等を継続して行なった。平成27年1月には台北にて、日米医学肝炎部会を開催して米国、台湾の研究者と情報共有、意見交換を行なった。アジアのウイルス性肝疾患の制御に資するため、更なる基礎研究、国際医学協力による肝炎対策を進めていく。

### A.構成

#### <分担研究者>

小池和彦 東京大学大学院医学系研究科消化器内科学教授（USJCMSP『部会長』）

#### <研究協力者>

脇田隆字 国立感染症研究所ウイルス第二部部長（USJCMSP『部会員』）

茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科先進医療開発科学分子病態制御内科学教授（USJCMSP『部会員』）

アクバル シェイクモハマドファズレ 東芝病院研究部主任研究員（USJCMSP『部会員』）

金子周一 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学教授（USJCMSP『部会員』）

五十川正記 名古屋市立大学大学院医学研

究科病態医科学（ウイルス学）  
肝疾患センター特任助教

＜研究協力者 USJCMSP 『米国部会員』  
Christopher Walker （USJCMSP 『米  
国部会長』  
Professor, Ohio State University

Adrian Di Bisceglie  
Professor, St Louis University

Michael Gale Jr.  
Professor, University of Washington

Anna Lok  
Professor, University of Michigan

Rajen Koshy  
NIAID, NIH

## B.研究目的

アジア諸国の肝炎・肝癌の制御を目的とする。

## C.研究方法

ウイルス肝炎は、世界において最も重要な感染症の一つであり、多くの人に肝硬変、肝癌の災厄をもたらし、一方、劇症肝炎によって生命を脅かしている。特に、社会経済、保健衛生、医療水準的に厳しい状況にあるアジア諸国においては、HBV キャリア率の高さ、現在も増加しつつある HCV への新規感染、A 型肝炎の多発、E 型肝炎の集団発生等、その問題は小さくなることはない。更に、貧困等の社会的状況によって、

十分な肝炎・肝癌の診断・治療を受けられない状況も、アジアにおけるウイルス肝炎の morbidity と mortality を上げる原因となっている。この様なアジア諸国における肝炎・肝癌を、日本と米国の研究者・医師が共同研究を通じ、またアジアの研究者を指導・共同研究することを通して制御することを目的とする。

1.基礎的研究：本研究に参画する班員とその研究協力者が、それぞれの専門領域に於ける基礎研究の深化に努力した。具体的には、HBV に関する疫学的、ウイルス学的、免疫学的、分子生物学的研究を行った。

2.米国研究者との研究協力：従来からの日米医学協力研究事業肝炎部会の日米両パネル間の研究協力体制を維持し、先端情報の速やかな相互開示によって、当該領域の知識と技術の増進に努力した。

3.アジア諸国研究者との研究協力：アジア諸国の医師・研究者との間に存在する研究協力体制を更に強化すると同時に、新たな研究協力の可能性をも模索した。

## D.研究結果及び考察

（1）USJCMASP 肝炎部会は、平成 27 年 1 月 25 日に台北 Academia Sinica にて、日米医学肝炎部会を開催した。米国、台湾の研究者と情報共有、意見交換を行なった。今回のテーマは、「B 型肝炎の治癒の推進」(Advancing cure for hepatitis B)であった。日本、米国、台湾の計 14 名の演者によって臨床と基礎の両面から最先端の講演と活発な討論が行なわれた。

（2） 東京大学消化器内科における、最

近 10 年間（平成 15 年 1 月～平成 24 年 12 月）の HBV 関連肝細胞癌の入院治療患者 233 人のうち、書面による同意が得られている 150 例余りの検体を抽出し、網羅的遺伝子解析に用いた。

さらに現在、外来通院中の、いわゆる無症候性キャリアや、核酸アナログ製剤内服中の比較的経過が良好である慢性 HBV 感染患者の検体を収集中であり（平成 26 年末時点で 30 検体を収集）、今後匿名化処理ののち網羅的遺伝子解析に用いる予定である。

B 型肝炎関連肝癌 (B-HCC) の家族歴の実態を明らかにするため、当科に 2007 年～2011 年に入院した B-HCC 125 例（男性 99 例、女性 26 例、平均年齢 60.5 歳）の家族歴を、問診および過去の診療記録により調査した。母親、同胞に HBV 慢性感染が判明している例はそれぞれ 43 例（34%）、32 例（26%）、HCC 歴が判明している例は 8 例（7%）、9 例（8%）であった。家族歴の有無による、発癌年齢や生命予後への影響については明らかではなかった。（小池班長）。

（3）B 型肝炎ウイルス（HBV）の治療改善のためには新規抗ウイルス薬開発が必要である。我々は HBV の初期感染過程に着目してきた。HBV 感染実験系を用いて、HBV の感染を阻害する化合物を複数同定した。CsA は HBV のレセプター分子と考えられている NTCP と HBV の PreS1 蛋白質との結合を阻止、あるいは NTCP のトランスポーター活性を阻害することにより HBV 感染を阻害した。また、Ro41-5253 は NTCP の発現に重要な RXR の転写活性化能を抑制することにより、NTCP 発現を抑制して HBV 感染を阻害した。さらに、試験管内で NTCP と LHBs 抗原の結合アッセイを構築してその結合を阻害する化合物

を検索している。HBV の初期感染過程阻害剤を核酸アナログなどと併用することにより、HBV の治療効果を改善できる可能性がある。（脇田班員）。

（4）我々は 2005 年からヒト肝細胞を移植した uPA-scid mouse を使用して B 型肝炎ウイルスの感染実験を行ってきた。このマウスに B 型肝炎ウイルスを感染させ、さらに人末梢血リンパ球を移入すると肝炎モデルが作製できる。我々が最初に作製したモデルは NK 細胞が FAS-FASL を介して肝細胞障害を起こすモデルであった。今回さらに免疫不全の強い NOG マウスを使用し、新たな肝炎モデルを作製した。このモデルでは CTL が肝障害を起こし、granzyme、IFN-gamma が重要な役割を果たしていた。このモデルは劇症肝炎の治療を検討する上で有用なモデルとなる。（茶山班員）。

（5）現在、バングラデシュと共同研究として行っている慢性 B 型肝炎に対する HBs 抗原 HBc 抗原抗原を含む新しい治療ワクチンの第三相臨床試験の安全性、抗ウイルス効果、作用機序及び経済的利点を証明し、慢性 B 型肝炎に対する新しい免疫治療を開発することを発表した。

アジアの発展途上国では適切な予防策がいまだに確立されておらず、公衆衛生システムが未発達なため肝炎の有病率すら把握されていない。現在推奨されている肝炎予防策は、先進国における研究結果から発展してきたものであり、予防目的のための健康保険もないアジアの発展途上国では、そういった予防策をそのまま適用することは困難である。バングラデシュ国民の HEV ジェノタイプがほとんど知られていない

め、バングラデシュ国内で発生した急性 E 型肝炎の突発的流行に関する 200 例から血清検体の収集を行った。その結果、バングラデシュで採取した HEV は全てジェノタイプ I であった。バングラデシュにおける CHB に関する 3 年間にわたる免疫学的研究、及び発症と治療についての調査から、バングラデシュの社会的・経済的状況と先進国で採用されてきた抗ウイルス剤 (NA) を用いた治療法が相いれないことは明白である。こうしたことから、新たな科学的証拠に基づいた治療法、すなわち免疫療法がバングラデシュで開始された。第一相・第二相臨床試験は安全であり、ワクチンを用いた免疫療法の高い治療効果を確認した。

この 1 年間、第三相臨床試験が二つの治療群のもとに着手されている。一つは HBsAg/HBcAg 混合ワクチンを接種した群、もう一つは対照群としてペグインターフェロンを投与した群を設定している。投与は終了し、現段階ではワクチン治療の効果が明らかになることを観察している現在第三相臨床試験では、HBs/HBc 抗原ワクチンは、PEGYLATED インターフェロンより安全であり、同じような効果を示した。社会・経済・医療制度面において他のアジアの発展途上国も、バングラデシュと多くの点で類似した状況にあるため、本研究で慢性 B 型肝炎の治療法の新ガイドラインはアジアの多くの発展途上国においても適用可能である。(Akbar 班員)。

(6) ウイルス性慢性肝炎、関連肝細胞がんにおける遺伝子変化を包括的に解析し、慢性肝炎および肝細胞がんの病態を明らかにし、診断、治療および予防の標的とす

る遺伝子および分子経路を明らかにすることを目的として事業を行っている。

台北において開催された部会では “Identification of HBV-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients” と題した発表を行い、B 型慢性肝炎の病態を免疫から解析し、免疫を用いた診断および治療の方向性について議論を行った。参加者からの質問を含め、有意義な報告となった。(金子班員)。

(7) 今回の EID 国際会議、肝炎部会では、B 型肝炎ウイルス (HBV) の基礎、及び臨床研究に携わる研究者がアメリカ合衆国、日本、台湾から集まり、B 型肝炎ウイルスに関する最新の知見を発表し、意見交換を行った。まず、HBV 研究を促進するための新たな動物モデルに関する発表・意見交換がおこなわれた。次に HBV 感染における免疫応答と、それを利用した治療法の模索に関して発表・意見交換が行われた。最後に HBV の複製機構に関する研究と HBV の逆転写酵素以外を標的とした治療薬の開発についての発表・意見交換が行われた。会議中は活発な議論が行われ、今後の B 型慢性肝炎に対する治療法開発に非常に有用な会議となった。(五十川正記研究協力者)

## E. 結論

アジア諸国の肝炎・肝癌の制御という目的のための個別研究は、予定通りに進捗した。日米医学の枠組みの再検討が進展し、主に経済的な理由から、一つの「ジャンボミーティング」を開催して同時に部会を開催するという方針となっている。今年度は肝炎部会が開催され、アジアにおける B 型



肝炎の制圧に向けた研究を中心として、大きな成果をあげることができた。アジアにおける B 型肝炎の現状と問題点が明らかになり、対策のポイントを日米両国において今後も継続して確認して行くこととした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 小池班長

- 1) Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, Koike K, Itoh F. DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences. *Genome Res* 2015 Feb 4. pii: gr.175240.114. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25653310.
- 2) Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(1):1-6.
- 3) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol.* 2014;49(2):173-84.
- 4) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93

into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 2014;5(14):5581-90.

###### 脇田隆字

- 5) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *Hepatology.* 2013 Dec 21. doi: 10.1002/hep.26982. [Epub ahead of print]
- 6) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014. 443(3):808-813.
- 7) Chen DS, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN, Sung J, Tanaka J, Wakita T, Ward J, Wallace J; CEVHAP North Asia Workshop on Viral Hepatitis. Report from a Viral Hepatitis Policy Forum on implementing the WHO Framework for Global Action on viral hepatitis in North Asia. *J Hepatol.* 2013. 59(5):1073-1080.
- 8) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T,

Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem*. 2013. 288(44):31715-31727.

茶山一彰

- 9) Arataki K, Hayes CN, Akamatsu S, Akiyama R, Abe H, Tsuge M, Miki D, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami H, Ohishi W, Chayama K. Circulating microRNA-22 correlates with microRNA-122 and represents viral replication and liver injury in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 2013;85:789-798.
- 10) Tsuge M, Chayama K. Availability of monitoring serum HBV DNA plus RNA during nucleot(s)ide analogue therapy. *J Gastroenterol*. 2013;48:779-780.
- 11) Tsuge M1, Murakami E, Imamura M, Abe H, Miki D, Hiraga N, Takahashi S, Ochi H, Nelson Hayes C, Ginba H, Matsuyama K, Kawakami H, Chayama K. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. *J Gastroenterol*. 2013;48:1188-1204.
- 12) Kosaka K1, Hiraga N, Imamura M, Yoshimi S, Murakami E, Nakahara T, Honda Y, Ono A, Kawaoka T, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Miki D, Aikata H, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K, Sasaki T, Chayama K. A novel TK-NOG based humanized mouse model for the study of

HBV and HCV infections. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441:230-235.

アクバル シェイク MF

- 13) Akbar SM, Al-Mahtab M, Hiasa Y. Designing immune therapy for chronic hepatitis B. *J Clin Exp Hepatol* 2014;4:241-246.
- 14) Al-Mahtab, Akbar SM, Uddin H, Khan SI, Rahman S. Early termination of immune tolerance state of hepatitis B virus infection explains liver damage. *World J Hepatol* 2014;6:621-625.
- 15) Stefanska B, Cheishvili D, Suderman M, Arakelian A, Huang J, Hallett M, Han Z-G, Al-Mahtab M, Akbar SM, Khan WA, Raqib R, Tanvir I, Khan HA, Rabbani SA, Szyf M. Genome-wide study of hypomethylated and induced genes in liver cancer patients unravels novel anticancer targets. *Clin Cancer Res* 2014;20:3018-3032.
- 16) Al-Mahtab M, Uddin H, Akbar SM. Epidemiology and risk factors of hepatocellular carcinoma in Asia. *Journal of GHR*. 2014;3:1019-1023.
- 17) Rahman S, Ahmed MF, Alam MJ, Debnath CR, Hoque MI, Hussain MM, Kabir AKMS, Karim MF, Khondokar FA, Mahtab MA, Masud MG, Mollick MKU, Moben AL, Alam SMNA, Podder PK, Raha AK, Rahim MA, Rashid MHO, Zaki KMJ, Akbar SM. Distribution of liver disease in Bangladesh - a cross country study. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology* 2014;4:25-30.

金子周一

- 18) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, K Murai, T Shiimoto, H Okada, R Takabatake, A Tokumaru, Y Sakai, T Yamashita, SM Lemon, S Murakami, S Kaneko. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- $\beta$  signaling pathway. *Hepatology* 2014;60:1519-1530.
- 19) T Yamashita, A Kitao, O Matsui, T Hayashi, K Nio, M Kondo, N Ohno, T Miyati, H Okada, T Yamashita, E Mizukoshi, M Honda, Y Nakanuma, H Takamura, T Ohta, Y Nakamoto, M Yamamoto, T Takayama, S Arii, XW Wang, S Kaneko. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014;60:1674-1685.
- 20) T Shimakami, M Honda, T Shirasaki, R Takabatake, F Liu, K Murai, T Shiimoto, M Funaki, D Yamane, S Murakami, SM Lemon, S Kaneko. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. *Sci Rep* 2014;4:4688.
- 21) M Honda, T Shirasaki, T Shimakami, A Sakai, R Horii, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, H Okada, K Murai, M Nakamura, E Mizukoshi, S Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. *Hepatology* 2014;59:828-838.
- 22) S Sha Zeng, T Yamashita, M Kondo, K Nio, T Hayashi, Y Hara, Y Nomura, M Yoshida, T Hayashi, N Oishi, H Ikeda, M Honda, S Kaneko. The Transcription Factor SALL4 Regulates Stemness of EpCAM-positive Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatol* 2014;60:127-134.
- 五十川正記
- 23) Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, Tanaka Y. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One* 2015 Feb 18;10(2)
- 24) Isogawa M, Chung J, Murata Y, Kakimi K, Chisari FV. CD40 activation rescues antiviral CD8<sup>+</sup> T cells from PD-1-mediated exhaustion. *PLoS Pathogen* 2013;9(7)
- I. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## Thirty-Fourth Meeting of the USJCMSP Hepatitis Panel Meeting

### A Symposium on Advancing Cures for Hepatitis B.

Academia Sinica, Taipei, January 25, 2015.

Nearly 35 years have passed since a vaccine was developed for hepatitis B. This vaccine has since been progressively introduced into EPI (Expanded Program on Immunization) strategies in most countries, where it has proved to be highly efficacious in protecting new generations of people. The major burden of hepatitis B virus infection (HBV) is the high morbidity and mortality from cirrhosis and hepatocellular carcinoma among the huge number of chronically infected people. As remarkable as the success of vaccines is in prevention of hepatitis B, so is the lack of success in curing it. A number of excellent drugs that dramatically reduce replication and circulating virus levels are available, but they cannot eliminate HBV because they have no effect on reducing the pools of the covalently closed circular (ccc) HBV DNA, which is the template for progeny virus. Hence treatment is very long term if not life-long. Drug resistance is inevitable and the management of treatment is complex.

The grand challenge is to develop drugs against cccDNA and additional targets other than the HBV polymerase (against which all of the currently available drugs are directed). While all the immune responses that can effect HVB cure are not well understood, immunotherapy is seriously considered as a potentially important adjunct to treatment. Finally, the recent identification of the sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) as a cellular receptor for HBV entry is advancing the creation of *in vitro* and small animal models to facilitate the development of therapeutic products.

8:15 AM	<b>Welcome and Opening Remarks.</b> <i>Kazuhiko Koike, Rajen Koshy, and Chris Walker.</i>
8:30 AM	<b>Introductory talk</b> Is a cure for hepatitis B possible? <i>Timothy Block</i>
<b>Session I.</b>	<b>Small animal models to model HBV pathogenesis and assess therapies.</b>
9:15 AM	The pathway to humanized animal models of HBV infection and immunity. <i>Alexander Ploss</i>
9:50 AM	Chimeric mouse models of HBV replication and immunity. <i>Lishan Su</i>
<b>10:15 AM</b>	<b>Break</b>
10:45 AM	Hepatitis B mouse model involving CTL. <i>Kazuaki Chayama</i>
11:10 AM	Immunocompetent Animal Models for HBV.

*Pei-Jer Chen*

**11:35 AM**

**Lunch**

**Session II.**

**HBV immunology and prospects for immune therapy.**

1:00 PM

Immunity in chronic hepatitis B and prospects for new immunotherapies.

*Kyong-mi Chang*

1:25 PM

Check point inhibitors and therapy for HBV infection.

*Masanori Isogawa*

1:50 PM

Agonists for Innate Immunity in chronic hepatitis B.

*Kris Iyer*

2:15 PM

Epitope search for HBV infection.

*Shuichi Kaneko*

2:40 PM

**Break**

**Session III.**

**HBV replication and targets for antiviral therapy.**

3:10 PM

The HBV ribonuclease as a target for therapy.

*John Tavis*

3:35 PM

HBV assembly and nuclear transport of capsid.

*Chiaho Shih*

4:00 PM

New Targets for HBV Therapy.

*Shiou-Hwei Yeh*

4:25 PM

MicroRNA in HBV pathogenesis.

*Kazuhiko Koike*

4:50 PM

HBV entry inhibitors.

*Takaji Wakita*

**5:15 PM**

**Discussion and adjourn.**

## 急性呼吸器感染症の研究・米側との専門協議

研究分担者 柴山 恵吾 （国立感染症研究所・細菌第二部・部長）

この研究では、アジア地域で問題となっている急性呼吸器感染症について、日米で最新の知見について情報交換を行い、今後必要な対策を議論し、必要な研究を立案することを目的としている。今年度は米国側との申し合わせにより、特にインフルエンザ等のウイルス感染症をテーマとして、平成 27 年 1 月 28 日に台湾中央研究院(Academia Sinica)において会議を開催した。日本及びアジアの国々においては、急性呼吸器感染症としては通常の季節性インフルエンザならびに新型インフルエンザ、その他 MERS コロナウイルス等が公衆衛生上大きな問題である。インフルエンザはワクチンが感染予防に有効であるものの、現行の普及ワクチンでは効果が十分でないことや、流行型の抗原がワクチンと異なると効果が期待できないため、新たなワクチンの開発が望まれている。会議において、日本側からはインフルエンザに関して粘膜ワクチンの開発、アジュバント開発、製造に培養細胞を用いるワクチンの開発、粘膜ワクチンの免疫効果の解析、インフルエンザの流行型の数理モデル予測などについて研究発表を行った。米国側からは、H1N1 インフルエンザに対する最適なワクチン抗原のコンピュータ解析による決定、流行型に影響されないユニバーサルワクチンの開発、アジュバントなどに関する発表があった。インフルエンザワクチンは、季節性だけでなく新型インフルエンザについても感染予防効果の高いインフルエンザワクチンの開発が求められており、引き続き優れたワクチンの実用化に向けて研究が必要であることが確認された。

研究協力者		新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染医学講座
山中 昇	和歌山県立医科大学・耳鼻咽喉科	公衆衛生学
河岡 義裕	東京大学医科学研究所・感染免疫部門 ウイルス感染分野	齋藤 玲子 石和田稔彦 千葉大学附属病院 小児科
田代 真人	国立感染症研究所・インフルエンザウ イルス研究センター	保富 宗城 和歌山県立医科大学・耳鼻咽喉科
中野 貴司	川崎医科大学・小児科学	堤 裕幸 札幌医科大学医学部小児科
長谷川秀樹	国立感染症研究所 インフルエンザ ウイルス研究センター	押谷 仁 東北大学大学院医学系研究科 微生物学 分野
石井 健	医薬基盤研究所	大石 和徳 国立感染症研究所感染症情報センタ ー
城野洋一郎	化学及血清療法研究所	菖蒲川 由 郷 新潟大学大学院医歯学総合研究科 国際感染医学講座
高田 礼人	北海道大学大学院獣医学研究科 北海道大学・人獣共通感染症リサーチ センター	高橋 幸子 千葉大学附属病院 小児科
伊藤 公人	名古屋大学大学院 医学研究科 分 子病原細菌学	見理 剛 （国立感染症研究所・細菌第二部）
荒川 宜親	北海道大学大学院 獣医学研究科	蒲地 一成 （国立感染症研究所・細菌第二部）
喜田 宏	新潟青陵大学 北里生命科学研究所 ウイルス感染 制御	鈴木 里和 （国立感染症研究所・細菌第二部）
鈴木 宏	久留米大学医学部 感染医学講座臨 床感染医学部門	
中山 哲夫		
渡辺 浩		

### A. 研究目的

急性呼吸器感染症（ARI）は、インフルエンザなどのウイルスおよび、肺炎球菌やインフルエンザ菌、マイコプラズマなどの細菌、その他多種類の病原微生物が関与する。ARI は先進国、途上国ともに common disease として感染者は非常に多い。これらの病原

体は、治療薬の使用やワクチン接種などの宿主環境の変化に適応し、進化を続けるため、有効な対策を策定するためには、病原体の監視と解析を継続し、対策法を随時アップデートして行く必要がある。本研究は、日米双方の研究成果について情報交換を行って、今日ARI感染症に対してどのような研究が行われ、どのようなことが明らかになっていて、どのような対策が取られているのかを俯瞰的に把握し、それをもとにより適切な対策のためどのような研究対応が必要なかを明らかにし、政策への提言を行って、日本及びアジア地域での感染症対策の向上に資することを目的とする。今年度は、米国側との申し合わせにより、特にインフルエンザ等のウイルス感染症をテーマとして、平成27年1月28日に台湾中央研究院(Academia Sinica)において会議を開催した。

## B. 研究方法

本研究では、特にインフルエンザを中心に、各研究班などで得られている次の情報を整理した。①疫学的データの集積・特徴的な臨床像の解析、②病態の解明、③変異と薬剤耐性、④ワクチンによる疾病予防とワクチン導入後の病原体および疾病変化、⑤感染症対策の策定に資する情報の提供、⑥新型インフルエンザ発生に対する危機管理。

### 倫理面への配慮

該当なし

## C. 研究結果

日米合同会議での発表と議論について、以下に主なものを記載する。また、日米合同会議の抄録を巻末に添付する。

### 経鼻ワクチンについて

ワクチンによりインフルエンザの感染を防御するには感染の場である気道粘膜上に中和能力の高い分泌型IgA抗体を誘導する必要がある。さらに分泌型IgA抗体は交叉防御能を有するため、変異したウイルスの感染も予防できると考えられている。しかし今までヒトの鼻腔粘膜に誘導される分泌型IgA抗体にウイルスを中和する能力があるのか、さらには交叉防御能力を持つかは明らかでなかった。我々は感染防御に効くインフルエンザワクチンを目指して感染の場で働く分泌型IgA抗体を誘導できる経鼻粘膜投与型インフルエンザワクチンの研究を行っている。季節性インフルエンザ及び高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)不活化全粒子ワクチンの成人への経鼻接種により、ウイルス株特異的な中和抗体が血清だけではなく鼻腔洗浄液中に誘導される事がわかった。鼻腔洗浄液ではIgA抗体、特に分泌型多量体IgA抗体が中和活性が高い事が明らかとなってきた。より効果の高い未来のインフルエンザワクチンは気道粘膜上に高い中和能力を有するこれらの分泌型多量体IgA抗体を効率良く誘導できるようなワクチンであるべきである。

### HA 亜型間交差感染防御免疫について

A型インフルエンザウイルスに対する中和抗体の殆どはヘマグルチニン(HA)亜型特異的であり、同一のHA亜型のウイルスにのみ中和活性を示す。しかし、HA特異的モノクローナル抗体の中には、複数のHA亜型のウイルスを中和する抗体が存在する事が知られている。そこでまず、HA分子上の同じエピトープを認識するIgAおよびIgGモノクローナル抗体を用いて抗ウイルス活性を比較した。H3ウイルスを免疫原として作出したHA特異的中和抗体S139/1(IgG)は、H3ウイルスだけでなく、H1、H2およびH13亜型のウイルスに対して交差中和活性を示す。S139/1(IgG)抗体産生ハイブリドーマをIgA産生細胞に分化させ得られた多量体IgAを用いて、これらのウイルスに対する結合活性および中和活性をIgGと比較した結果、H3ウイルスに対して差は認められなかったが、他の亜型のウイルスに対してはIgAがIgGよりも高い活性を示した。さらに、予めウイルスに感染させたMDCK細胞をIgA存在下で培養したところ、上清中に放出されるウイルス粒子量が顕著に減少することが分かった。IgG存在下ではウイルス粒子放出阻害効果はほとんど認められなかった。電子顕微鏡観察の結果、IgA存在下では細胞から出芽したウイルス粒子が凝集し、細胞膜表面に留められている様子が確認された。次に、不活化ウイルスを鼻腔内または皮下に接種したマウスの血清、気管肺胞洗浄液および鼻腔洗浄液中のIgAおよびIgG抗体の特異性を解析した。その結果、免疫経路に関わらず複数の亜型のHAに交差反応する抗体が誘導されることが明らかとなった。しかし、これらの抗体はウイルス中和試験において、免疫原とは異なるHA亜型のウイルスに対する交差活性を示さなかった。一方、交差結合性IgA存在下でウイルス粒子放出阻害およびブラック形成阻害が顕著に認められたことから、交差結合活性を有するが通常の中和活性を持たないIgAが亜型間交差感染防御免疫に関与する可能性が示唆された。以上の結果より、HA特異的交差反応性IgAはIgGよりも高い抗インフルエンザウイルス活性を有していることが示された。特に、ウイルス粒子の放出阻害活性はIgA抗体で顕著に認められ、HA亜型間交差感染防御免疫に寄与しているものと考えられた。

### 培養細胞によるワクチン製造について

現行の日本のインフルエンザワクチンの製造には発育鶏卵が用いられているが、ウイルス培養基材としての発育鶏卵にはいくつかの問題点がある。昨今、高病原性鳥インフルエンザウイルスを発端とするインフルエンザパンデミックが懸念されているが、その際のワクチン製造において発育鶏卵を用いることには、卵の供給の点からリスクを伴う。そこで、我々は日本政府からの要請を受けて、培養細胞を基材としたパンデミックワクチンの開発をGSK社と共同で行った。用いた細胞はアヒルの胚性幹細胞由来EB66で、アジュバントとしてAS03を用いた。非臨床、臨床試験の結果、我々のパンデミックワクチン

は、非常に高い免疫原性を示し、安全性の観点からもその認容性が確認された。現在、製造設備維持のため、季節性ワクチンの開発を行っている。

#### ワクチンの流行型の予測について

HA タンパクのアミノ酸変異を予測する数理モデルを見出した。の数式で、1997年から2014年の流行型をレトロスペクティブに解析したところ、60%以上の精度でアミノ酸変異を予測できることが示された。抗原の変異の時期を正確に予測するためには今後さらに研究が必要である。

インフルエンザのほか、SARS ウイルス、MERS ウイルス感染症について、疫学、感染の分子メカニズム、ワクチン開発の最新知見について発表があった。今後、SARS 様のアウトブレイクが起こる可能性は十分にあり、ワクチン開発等を進める必要が有ることが説明された。

#### D. 考察

粘膜ワクチンについては、以下の質疑応答があった。

ワクチンを皮下注射接種した場合と経鼻接種した場合で誘導される抗体のエピトープが同じなのか異なるのか。IgA 抗体が広い中和活性を持つがその抗体の認識エピトープは解っているのか。これらについては、これまでの解析はポリクローナルな抗体の為、今後モノクローナル抗体を用いた解析が必要であることが説明された。

H5N1 のワクチンにおいて3回目の免疫の前に8か月空けているがその期間は必要なのか。ワクチン間隔については今後さらに検討が必要であると説明があった。これらを踏まえ、粘膜ワクチンの高い効果のメカニズムを明らかにするためにはモノクローナル抗体レベルでの解析が必要であることが説明された。

HA 亜型間交差感染防御免疫については、以下の質疑応答があった。

IgA の出芽阻害のメカニズムは何か。おそらく抗体によるウイルス粒子の架橋であると説明があった。IgA のアビディティの違いなのか。恐らく、この抗体ではアビディティが非常に重要である。IgA だけでなく、IgG の状態でもそうだった。それは多価だという理由だけなのか？多価でなくても IgA の方が活性が高い可能性がある。モノマーでの構造も大事。実際には両方影響しているのではないかと考えられる。結合活性の測定法は何か。ELISA である。

これらを踏まえ、今後以下の研究が必要であることが議論された。

亜型感交差反応性抗体を効率よく選択的に誘導する手法の開発、インフルエンザに対する亜型間交差感染防御免疫における IgA の役割の解明、インフルエンザの抗体療法の可能性。

培養細胞によるワクチン製造については、次のような質問があった。

ノイラミニダーゼの濃度に関しては検討しているのか？AS03 を含む H1N1 ワクチンで、ナルコレプシー

が問題となっているがどう考えているか？製造効率は、ウイルス株によって異なると思うが、EB66 ではどうか？製造効率に関して、卵での製造プラットフォームと比較した事があるのか？GSK の AS03 を含む GSK のオリジナルワクチンと比較した事があるか？これらの質問を踏まえ、今後季節性ワクチン製造方法の開発、特にどの様なウイルス株にも対応できる恒常性の確立、生産効率の向上、ノイラミニダーゼの定量と免疫応答の解析が必要であることが議論された。

#### E. 結論

インフルエンザワクチンは、季節性だけでなく新型インフルエンザについても感染予防効果の高いワクチンの開発が求められており、引き続き優れたワクチンの実用化に向けて、研究の推進が必要である。

今後のインフルエンザワクチンには、新生児と高齢者にも有効性が高く、かつ免疫効果が長期に持続し、社会において集団免疫効果が期待でき、broad spectrum に多くの亜型をカバーし、かつ安全性に優れたものが要求される。さらに、製造が短期間で安定的に可能で、かつ品質も一定したものであることが必要である。また、ワクチン開発に当たっては特に安全性に関して注意が必要であり、新規ワクチンが承認された後には市販後調査の結果を監視し、副反応の集積や異常な健康被害について注意を払う必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hasegawa H, van Reit E, Kida H. Mucosal immunization and adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015;386:371-80.
- 2) Hasegawa S, Wakiguchi H, Okada S, Gui Kang Y, Fujii N, Hasegawa M, Hasegawa H, Aina A, Atsuta R, Shirabe K, Toda S, Wakabayashi-Takahara M, Morishima T, Ichiyama T. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage fluid from a mouse model of bronchial asthma during seasonal H1N1 infection. *Cytokine*. 2014 Oct;69(2):206-10.
- 3) Watanabe T, Zhong G, Russell CA, Nakajima N, Hatta M, Hanson A, McBride R, Burke DF, Takahashi K, Fukuyama S, Tomita Y, Maher EA, Watanabe S, Imai M, Neumann G, Hasegawa H, Paulson JC, Smith DJ, Kawaoka Y. Circulating avian influenza viruses closely related to the 1918 virus have pandemic potential. *Cell Host Microbe*. 2014 Jun 11;15(6):692-705.
- 4) van Riet E, Aina A, Suzuki T, Kersten G,



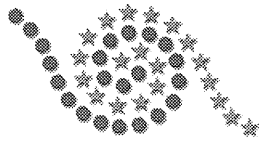
Hasegawa H. Combatting infectious diseases; nanotechnology as a platform for rational vaccine design. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Jul;74:28-34.

- 5) Simulundu E, Nao N, Yabe J, Muto NA, Sithebe T, Sawa H, Manzoor R, Kajihara M, Muramatsu M, Ishii A, Ogawa H, Mweene AS, Takada A. The zoonotic potential of avian influenza viruses isolated from wild waterfowl in Zambia. *Arch Virol* 159(10): 2633-2640, 2014.
- 6) Itoh Y, Yoshida R, Shichinohe S, Higuchi M, Ishigaki H, Nakayama M, Pham VL, Ishida H, Kitano M, Arikata M, Kitagawa N, Mitsuishi Y, Ogasawara K, Tsuchiya H, Hiono T, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ito M, Quynh Mai L, Kawaoka Y, Miyamoto H, Ishijima M, Igarashi M, Suzuki Y, Takada A. Protective efficacy of passive immunization with monoclonal antibodies in animal models of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus infection. *PLoS Pathog* 10(6): e1004192, 2014.
- 7)

2. 学会発表  
省略

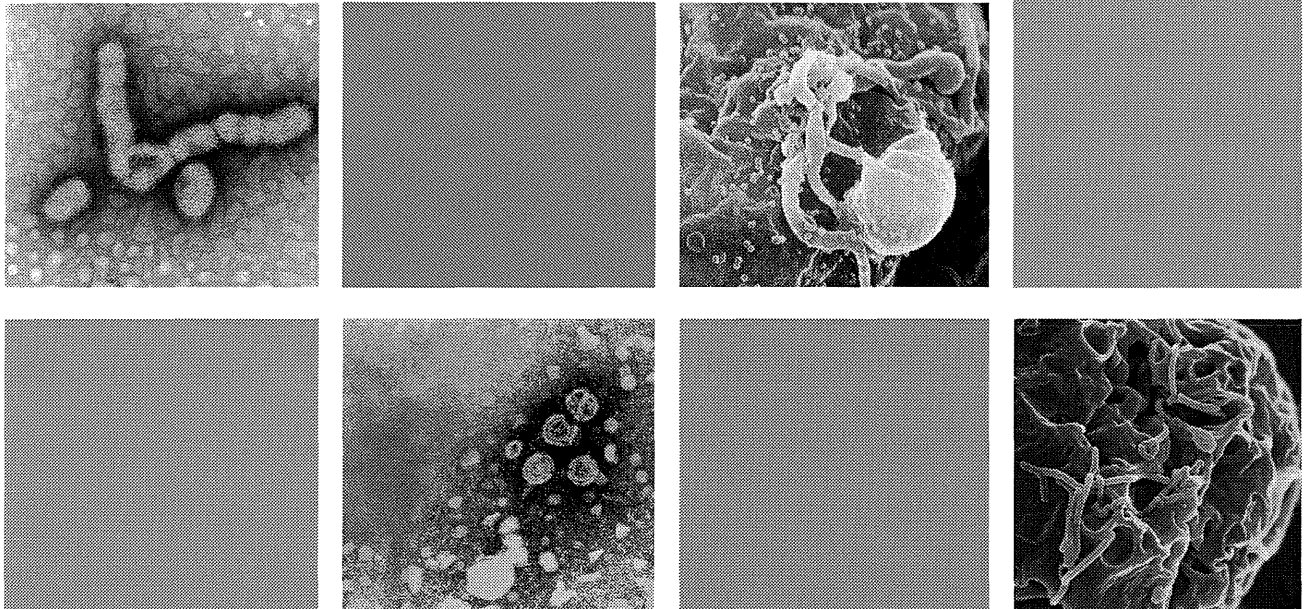
H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定も含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



# United States — Japan Cooperative Medical Sciences Program

## 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim



### Emerging Viral Diseases: Recovery and Control

and Meetings of the Acute Respiratory  
Infections (ARI), AIDS, Hepatitis, and  
Viral Diseases Panels

Academia Sinica, Taipei, Taiwan  
January 25-29, 2015



Ministry of Health,  
Labour, and Welfare  
(MHLW) of Japan

Ministry of Education, Culture,  
Sports, Science, and Technology  
(MEXT) of Japan

Ministry of Foreign  
Affairs (MOFA) of  
Japan



*The views expressed in written conference materials or publications and by speakers and moderators at HHS-sponsored conferences do not necessarily reflect the official policies of the Department of Health and Human Services (HHS), nor does mention of trade names, commercial practices, or organizations imply endorsement by the U.S. Government.*

**Acute Respiratory Infections (ARI) Panel Meeting:  
Improving Efficacy of Vaccines for ARI  
January 28, 2015**

**AGENDA**

**Location: 1st Conference Room**

Wednesday, January 28

	Topic	Speaker
08:30-09:00	Arrival and Networking	
09:00-09:20	Welcome and Opening Remark <ul style="list-style-type: none"> <li>• ARI Panel Chairs</li> </ul> Japanese ARI Chairs: Keigo Shibayama and Hideki Hasegawa Taiwan ARI Chair: Shan-Chwen Chang U.S. ARI Chair: James E. Crowe U.S. ARI Secretariat: Rachelle Salomon	
<b>Session I: Novel Vaccines for Treatment of ARIs</b>		
9:20-9:45	COBRA: Computationally Optimized Broadly Reactive Antigen Vaccine Against Novel H1N1 and Seasonal H1N1 Influenza Strains	<b>Ted Ross</b>
9:45-10:10	Mucosal Influenza Vaccines	<b>Hideki Hasegawa</b>
10:10-10:35	A Universal Influenza Virus Vaccine Strategy Based on the Conserved Stalk Domain of the Hemagglutinin	<b>Florian Krammer</b>
10:35-11:00	<i>Break</i>	
11:00-11:25	Adjuvants	<b>Ken Ishii</b>
11:25-11:50	Single Replication Influenza Vaccine M2SR Elicits Long-Lasting, Cross-Protective Immunity	<b>Pamuk Bilsel</b>
11:50-12:15	Cell Culture Based Influenza Vaccine	<b>Yoichiro Kino</b>
12:15-12:40	Status and Clinical Development of Next Generation Adjuvants For Respiratory Diseases	<b>Steven Reed</b>
12:40-13:40	<i>Lunch and Poster viewing</i>	
<b>Session II: Scientific Advances in Understanding Protective Mechanisms of ARI Vaccines</b>		
13:40-14:05	Comparison of Antiviral Activity Between IgA and IgG Specific to Influenza Virus Hemagglutinin: Increased Potential of IgA for Heterosubtypic Immunity	<b>Ayato Takada</b>
14:05-14:30	Pathogenic Mechanisms of the Emerging Coronaviruses	<b>Ralph Baric</b>
14:30-14:55	Predicting Epidemic Strains of Influenza Viruses	<b>Kimihito Ito</b>

14:55-15:15	<i>Break</i>	
15:15-15:40	Broad Neutralization of Influenza Viruses and Implications for a Universal Vaccine and Therapy	Ian Wilson
15:40-16:10	Human Infections by Avian Influenza Viruses – Mechanism Study and Potential Application to Increase Viral Yields in Cell-Based Vaccine Productions	Shin-Ru Shih
<b>Session III: Clinical Perspective of Evaluating Vaccines for ARI</b>		
16:10-16:35	Designing Clinical Trials for Novel ARI Vaccines: <i>Primum Non Nocere</i>	Wendy Keitel
16:35-17:00	ARI Vaccines Post Licensure: What Do We Expect and What are We Looking For?	Li-Min Huang
17:00-18:00	Discussion and Meeting Outcomes	