

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	-----	35
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



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、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 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（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（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 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-kappaB 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 adenylyl 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で高発現しており、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、骨髄再構築、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径路が亢進していた。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径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、-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、-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-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、-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- $\beta$  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- $\gamma$  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- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  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>*Il2rg*<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 レポートリーを解析した。同じ TCR 鎖と 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 鎖、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 レポ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クランを行い、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、さらにはヒト抹消血単核球に作用し、強力に IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$  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- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$  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る。

## 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 抗原の量と関連しており、治療中、myeloid dendritic cell の機能は回復するが plasmacytoid dendritic 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 $\alpha$ 、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、インドールアミノ酸添加酵素 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- $\gamma$  / IFN- $\alpha$  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



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 ) ]

分担研究報告書

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**：HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発のため、今回、核酸アナログを投与された109例の慢性B型肝炎例の肝癌発生率を解析した。治療中の肝発癌と関連する因子として、肝組織進展度(Fib-4 index)とHBcrAg陽性が関連することが明らかとなった。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が高かった。肝組織遺伝子発現解析では、HBcrAg陽性例ではHBVの転写促進に働くCEBP、PPAR、HNF4、Sp1の発現上昇が認められ、HBcrAg陽性例では肝組織内で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。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、有用な免疫分子の絞り込みを行った。

A. 研究目的

HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発のため、B型慢性肝炎例に於けるコア関連抗原(HBcrAg)に注目し、HBcrAg陽性例と陰性例に於ける肝組織及び末梢血樹状細胞の遺伝子発現を解析した。

B. 研究方法

核酸アナログを投与された109例の慢性B型肝炎例の肝癌発生率を解析した。また23例の肝組織遺伝子発現を解析した。遺伝子発現プロファイリングはAffymetrics gene chip (133U Plus 2.0)にて解析した。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。

(倫理面への配慮)

本研究において試料提供者、その家族・

血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分な配慮を行った。本解析は遺伝子発現及び蛋白の発現についての解析であるが、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に準じた十分な対応を行い、患者よりの試料採取については、金沢大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」で承認された説明文書を用いてインフォームドコンセントを得て行っており、十分な対応を行った。

C. 研究結果

核酸アナログを投与された109例の慢性B型肝炎例の内訳は年齢 $54 \pm 10$ 歳、男:女=76:33、平均投与期間 $5.4 \pm 3$ 年、肝組織F12:F34=48:61、eAg陽性:eAb陽性=55:54

であった。経過中 36 例(33%)に肝発癌が認められた。肝発癌と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(表1)。

表1 肝発癌と関連する治療前因子

Variables	Univariate		Multivariate
	p values	p values	HR (95% CI)
Sex (M vs. F)	NS		
Age (>56 vs. ≤56)	0.0016	0.0042	3.16 (1.42-7.46)
HBsAg (>2000 vs. ≤2000 IU/mL)	NS		
HBeAg (+ vs. -)	NS		
HBeAb (+ vs. -)	0.035	NS	
HBcrAg (LogU/mL)	NS		
HBV-DNA (Log copies/mL)	NS		
PC (W vs. M)	NS		
BCP (W vs. M)	NS		
Genotype (B vs. C)	0.035	NS	
AFP (>10 vs. ≤10 ng/mL)	0.011	NS	
F stage (F12 vs. F34)	0.0013	0.009	3.41 (1.34-9.99)
A grade (A0-1 vs A2-3)	NS		

また、治療中のウイルス学的及び臨床因子を同様に解析すると、単変量で治療中年齢(60 歳超)、HBcrAg 陽性、Fib-4 高値が挙げられた。多変量解析でも同様の因子が有意であった(表2)。

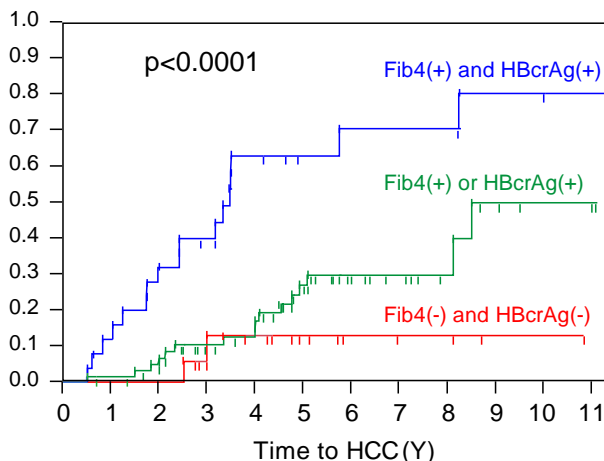
表2 肝発癌と関連する治療中因子

Variables	Univariate		Multivariate
	p values	p values	HR (95% CI)
Sex (M vs. F)	NS		
Age (>60 vs. ≤60)	0.0092	0.009	2.66 (1.27-5.96)
HBsAg (>2000 vs. ≤2000 IU/mL)	NS		
HBeAg (+ vs. -)	NS		
HBeAb (+ vs. -)	NS		
HBcrAg (+ vs. -)	0.026	0.0025	3.53 (1.52-9.63)
AFP (>10 vs. ≤10 ng/mL)	NS		
Fib-4 index (>2.1 vs. ≤2.1 ng/mL)	0.0022	0.0067	2.57 (1.30-5.27)

Kaplan-meier による累積発癌率は Fib-4 高値・低値及び HBcrAg 陽性・陰性によ

て層別化された ( $p < 0.0001$ ) (図1)。

図1 Fib-4 及び HBcrAg による累積発癌率



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 陽性例の肝で発現増加する遺伝子 1204 個 ( $p < 0.05$ ) のシグナルパスウェイを MetaCore™ にて作成したところ、幾つかのパスウェイの中心となる Hub (ハブ) 遺伝子が同定された。興味深いことに Hub 遺伝子として Capase3, p53, NRF2 の発現亢進があり、これらは HBV 感染に伴う DNA 損傷、アポトーシスを反映していると考えられた。加えて、これまでに HBV の転写を促進すると報告されている CEBP、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。

#### D. 考察

今回、核酸アナログを投与された 109 例の慢性 B 型肝炎症例の肝癌発生率を解析し、治療中の肝発癌と関連する因子として、肝組織進展度 (Fib-4 index) と HBcrAg 陽性が関連することが明らかとなった。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。一方、cccDNA 量は両群で差が見られなかった。肝組織遺伝子発現解析では、HBcrAg 陽性例では HBV の転写促進に働く CEBP、PPAR、HNF4、Sp1 の発現上昇が認められた。従って 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。

#### E. 結論

HBcrAg 陽性かつ組織学的に進行した症例では核酸アナログ服用中においても高率

に発癌する。HBcrAg 陽性肝では HBV の複製亢進が見られ、HBV 複製を支持する転写因子の発現亢進が見られた。これらの転写因子をターゲットとした薬剤が肝内 HBV 複製制御に働くと考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) T Terashima, T Yamashita, N Iida, T Yamashita, H Nakagawa, K Arai, K Kitamura, T Kagaya, Y Sakai, E Mizukoshi, M Honda, S Kaneko. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Hepatol Res (in press)
- 2) K Yamada, E Mizukoshi, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, Y Takeshita, H Misu, T Takamura, S Kitamura, Y Zen, Y Nakanuma, M Honda, S Kaneko. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Liver Int (in press)
- 3) 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 Arai, XW Wang, S Kaneko. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Hepatology 60(5):1674-85, 2014.
- 4) K Ishikura, H Misu, M Kumazaki, H Takayama, N Matsuzawa-Nagata, N Tajima, K

- Chikamoto, F Lan, H Ando, T Ota, M Sakurai, Y Takeshita, K Kato, A Fujimura, KI Miyamoto, Y Saito, S Kameo, Y Okamoto, Y Takuwa, K Takahashi, H Kidoya, N Takakura, S Kaneko, T Takamura. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. Diabetologia 57(9):1968-76, 2014.
- 5) 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 60(5):1519-30, 2014
- 6) T Yamashita, S Kaneko. Orchestration of hepatocellular carcinoma development by diverse liver cancer stem cells. J Gastroenterol 49(7):1105-10, 2014.
- 7) M Kitahara, E Mizukoshi, Y Nakamoto, N Mukaida, K Matsushima, S Kaneko. Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Int Immunopharmacol 21(2):346-353, 2014.
- 8) N Oishi, T Yamashita, S Kaneko. Molecular biology of liver cancer stem cells. Liver Cancer 3(2):71-84, 2014.
- 9) F Lan, H Misu, K Chikamoto, H Takayama, A Kikuchi, K Mohri, N Takata, H Hayashi, N Matsuzawa-Nagata, Y Takeshita, H Noda, Y Matsumoto, T Ota, T Nagano, M Nakagen, KI Miyamoto, K Takatsuki, T Seo, K Iwayama, K Tokuyama, S Matsugo, H Tang, Y Saito, S Yamagoe, S Kaneko, T Takamura. LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. Diabetes 63(5):1649-64, 2014.
- 10) Y Takeshita, T Takamura, M Honda, Y Kita, Y Zen, KI Kato, H Misu, T Ota, M Nakamura, K Yamada, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Diabetologia 57(5):878-90, 2014.
- 11) 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 4:4688, 2014.
- 12) H Nakagawa, E Mizukoshi, N Iida, T Terashima, M Kitahara, Y Marukawa, K Kitamura, Y Nakamoto, K Hiroishi, M Imawari, S Kaneko. In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. Cancer Immunol Immunother 63(4):347-56, 2014.
- 13) K Kato, T Takamura, Y Takeshita, Y Ryu, H Misu, T Ota, K Tokuyama, S Nagasaka, M Matsuhisa, O Matsui, S Kaneko. Ectopic fat accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with

nonalcoholic Fatty liver disease. PLoS One

9(3): e92170, 2014.

2.学会発表

なし

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

特になし



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 ) ]

分担研究報告書

HBV感染マウスを用いたHBV cccDNA制御に関する研究

研究分担者：今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 診療講師

**研究要旨**：HBVのcccDNAを制御または排除する新規治療法の開発には、その有効性の評価が可能となるモデル動物が必要である。本研究によりわれわれは、HBV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて肝臓内cccDNAを定量するシステムを構築した。本モデルを用いて核酸アナログおよびインターフェロン（IFN）の併用療法の効果を検討した。2 mg/kgのエンテカビル（連日経口投与）または30 µg/kgのPegIFN（週2回皮下注）を12週間併用投与したところ肝臓内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のエンテカビルおよび300 µg/kgのPegIFNを6頭のマウスに6週間投与したところすべてのマウスにおいて血中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と終了時に比べやや増加していたが、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と低値で維持されていた。高容量のエンテカビルおよびPegIFN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の著明な低下が得られた。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。

A. 研究目的

HBV 持続感染マウスを用いて肝臓内cccDNAを制御または排除する治療法を開発する。

B. 研究方法

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。一部はS1ヌクレアーゼ処理後、real-time

PCRにてcccDNAを測定した。またマウスに2 mg/kgのエンテカビル（連日経口投与）、30 µg/kgのPegIFN（週2回皮下注）を12週間、単独あるいは併用投与、または20 mg/kgのエンテカビル（連日経口投与）、300 µg/kgのPegIFN（週2回皮下注）を6週間投与し、血中HBV DNA量および肝臓内HBV cccDNA量を測定した。（倫理面の配慮）

投与する血清は患者の同意が得られてい

るものを使用した。

### C. 研究結果

抽出した DNA をヌクレアーゼ処理し，primer を 17 塩基から 25 塩基に伸ばし PCR を行うことにより，血中 HBV DNA は検出されず，マウス肝臓内の cccDNA を特異的に検出することが可能となった．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 （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 （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．

### D. 考察

高容量のエンテカビルおよび PegIFN

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．

### E. 結論

HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて肝臓内 cccDNA を測定するシステムを構築した．高容量のエンテカビルおよび PegIFN の併用療法により cccDNA が制御される可能性が示された．

### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### 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  
特になし

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 ) ]

分担研究報告書

抗HBV反応を増強する免疫賦活分子の探索

研究分担者：中本 安成 福井大学医学部内科学(2)領域 教授

**研究要旨：** 宿主の免疫監視機構は肝細胞に表出している微量のB型肝炎ウイルス ( HBV ) 抗原を正確に認識し特異的な免疫反応を誘導する。3年間の研究課題として、HBV免疫反応による慢性肝炎モデルおよびin vitroでの発現系を用いて、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。慢性肝炎モデルの肝組織における発現遺伝子プロファイル ( K-meansクラスタリング解析 ) では、ウイルス産生の持続的な低下と逆相関してケモカインCCL5 / CCR5分子とSTAT3経路が亢進していることが示された。また、1.3倍長HBVゲノムを用いたin vitro発現系において、組換え型CCL5分子の抗ウイルス作用、HBVジェノタイプの違いによるウイルス発現・産生効率の特徴が明らかとなった。これより、HBV生活環におけるウイルス産生、cccDNAを制御する免疫反応の機序と標的治療の候補となる分子の可能性が示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス ( HBV ) cccDNA は、ウイルスゲノムとすべての構成タンパクの鋳型になっているものの、その発現や制御の分子メカニズムは不明のままである。これまでウイルスタンパクの発現は、サイトカインなどの免疫機序によって制御されることが報告されてきたが、慢性に経過するHBV感染症において抗ウイルス作用に関わる免疫病態や cccDNA に及ぼす影響についての詳細な検討は行われて来なかった。本研究では、HBV慢性感染状態における抗ウイルス免疫の本態を解析するために、ウイルス蛋白 ( 表面抗原 HBsAg ) の遺伝子導入マウスモデルおよびウイルスゲノムのin vitro 発現系を用いて、分子・細胞免

疫機序について検討した。

B. 研究方法

既報のHBVに対する細胞障害性Tリンパ球エピートープ ( L<sup>d</sup> 拘束性 HBs 28-39 ) 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 ( Nakamoto Y, et al., J. Exp. Med. 188:341,1998; Cancer Res. 64:3326,2004 )。本モデルにおいて、胸腺摘除、骨髄再構築、脾細胞移植の操作によって、慢性肝炎を誘導し約18ヵ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。

in vitro ウイルス発現系の作成は、1.3倍長HBVゲノム(自治医科大学・岡本宏明教授との共同研究)を用いて、肝臓細胞株HepG2細胞に遺伝子導入することにより確立した。HBV-DNA, cccDNA, pgRNAの定量は既報(Hepatology 44:694,2006)に基づいてquantitative real-time PCR法を用いた。

(倫理面の配慮)

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)に基づき、実施機関の倫理委員会あるいは実験動物委員会の審査と承認を得て行った。

また、in vitro ウイルス発現系は第二種使用等拡散防止措置に則り遺伝子組換え実験(大臣確認実験)として承認の下で実施した。

### C. 研究結果

1)慢性肝炎モデルでは発症9ヵ月以降の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(K-means Cluster Analysis; ANOVA)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。

### D. 考察

過去二年度における検討に引き続いて、慢性肝炎モデルの経時的な発現遺伝子プロファイルから抽出されたCCL5/CCR5分子に関するHBVへの抗ウイルス活性について検討した。CCL5についてはCD4陽性Tリンパ球に発現しており、肝細胞上の受容体であるCCR5に作用してウイルス産生や肝細胞の分化・生存に関与することが報告されている(J. Virol. 84:5860,2010; PLoS One 8:e53992,2013)。CCR5の細胞内シグナルの下流にはSTAT3経路が位置しており、この活性化(pSTAT3)を介してHBVの複製に関わっているとの報告が見られている(PLoS Pathog. 7:e1002159,2011; J. Virol. 86:9599,2012)。

本研究では、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。しかし、ウイルス感染系における作用の検証、機序の解明が必要と考えられる。

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 B 1 / C 2 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。細胞内における cccDNA の制御については不明な点が多いが、最近の研究において IFN および LT が一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼ (APOBEC3) を誘導して、cccDNA 特異的な分解作用を発揮することが報告された (Science 343:1221, 2014)。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。

#### E. 結論

B 型慢性肝炎モデルおよび in vitro ウイルス発現系を用いて、ケモカイン CCL5 分子の抗ウイルス作用、HBV ジェノタイプの違いによるウイルス発現・産生効率の特徴が示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Hayama R, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series. *Mol. Clin. Oncol.* 2014; 2: 1028-1034.
- 2) Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y and Nakatsura T: A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 2014; 46: 497-504.
- 3) Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S: Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 21: 346-353.
- 4) Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arie S, Wang X, Kaneko S: Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014; 60: 1674-1685.
- 5) Miyake Y, Yamamoto K, Matsushita H, Abe M, Takahashi A, Umemura T, Tanaka A,

Nakamuta M, Nakamoto Y, Ueno Y, Saibara T, Takikawa H, Yoshizawa K, Ohira H, Zeniya M, Onji M, Tsubouchi H; Intractable Liver and Biliary Diseases Study Group of Japan: Multicenter validation study of anti-programmed cell death-1 antibody as a serological marker for type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatol. Res.* 2014 ; 44: 1299-1307.

## 2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Hiramatsu K, Nemoto T, Suto H, Kaneko S: Identification of Hypermethylation and Non-Synonymous Mutations in Genes Down-Regulated during the Process of Hepatocarcinogenesis in a Model of Chronic Hepatitis B. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 637A; 一般; poster: Nov. 9, 2014.
- 2) Naito T, Baba T, Mukaida N, Nakamoto Y: Cytotoxic CD4+ Cells Play a Pivotal Role in Cyclophosphamide-Mediated Cytotoxicity against Hepatoma without Antigen Priming. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 497A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.
- 3) Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Shimomura M, Nakamoto Y: Identification of a Novel HLA-A2 Restricted Immunotherapeutic Target Derived from an EGFR Mutated Antigen for the Treatment of Metastatic Liver Tumors. **第65回 American Association for**

**the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 508A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.

- 4) Matsuda H, Naito T, Nosaka T, Nemoto T, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Serial Changes of Cellular, Humoral, and Innate Immune Responses following Immunosuppressive Chemotherapies Responsible for Hepatitis B Virus Reactivation. **第65回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 1039A; 一般; poster: Nov. 11, 2014.

## 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

特になし

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 ) ]

分担研究報告書

HBV感染細胞のエピゲノム

研究分担者：橋本 真一 金沢大学医学保健研究域医学系 特任教授

**研究要旨**：HBV感染においてエピジェネティックな制御がHBVの複製にどのように関与しているかを調べる目的で、細胞株、新鮮ヒト肝細胞を用い、エピジェネティック薬剤によるHBV複製の影響について検討した。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、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単独でHBV DNAの量を低下させた。次にHBV DNAの量を低下させたSAHA, prostratin両薬剤の抗ウイルス剤ラミブジン、エンテカビル、IFN- との併用について検討した結果、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。この結果から、ヒストンアセチル化及びメチル化の変化がヒト肝細胞におけるHBVの複製に影響を与えるだけでなく現在臨床で使用されている薬剤の効果にも影響を及ぼすことが示唆された。

A. 研究目的

HBV 増殖感染および潜伏感染時においてエピジェネティックな制御がHBVcccDNAの遺伝子発現制御に関与していることが報告されている。しかしながらcccDNAの発現促進、抑制に関与する分子機構について詳細な検討はされていない。そこで今回、臨床検体、Full length HBV DNAを発現する培養細胞系、またHBVを感染させたヒト型肝臓キメラマウスを用いて、宿主ゲノム、HBVcccDNAのヒストン修飾やDNAメチル化の状態とその制御に関わるポリコム群やトライソラックス群タンパク複合体につい

て検討し、cccDNAの潜在化機構、複製制御について解明する。

B. 研究方法

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(BIX01294, Chaetocin)、ヒストン脱アセチル化阻害剤(SAHA, TSA)、DNAメチル化阻害剤(5-aza-deoxycytidine)、NF-kappaB活性化剤(prostratin)をHBV感染PXBキメラマウス由来ヒト肝細胞に添加した。その後、一定時間で培地を交換し、12日目に培養上清、細胞内DNAをスマイテストに

て精製した。また、cccDNA については単離した細胞の DNA を ATP-dependent DNase により処理し使用した。HBV DNA の量は以下の TaqMan probe を用いて測定した。5' -FAM-TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT-TAMRA-3' (368-391), HBV-S-F(333-352)5' -ACTCACCAACCTCTTGTCT-3', HBV-S-R(476-456), 5' -GACAAACGGGCAACATACCT-3' (433-452) さらに DMSO, Prostratin, SAHA 処理の細胞から mRNA をそれぞれ精製し、RNA-Seq 法にて遺伝子発現の変化について観察した。

(倫理面の配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針の規程、二重使用等拡散防止措置承認に関しては手続き済み。

### C. 研究結果

HBV 感染においてエピジェネティックな制御が HBV の複製にどのように関与しているかを調べる目的で、細胞株、新鮮ヒト肝細胞を用い、エピジェネティック薬剤による HBV 複製の影響について検討した。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。

次にこれらの2つの薬剤により変化した遺伝子について RNA-Seq により検討した。その結果、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。

続いて HBV 複製に抑制効果があった 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。

### D. 考察

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。

今後、SAHA、prostratin の HBV 複製抑制効果についてエピジェネティックな観点と共に解析する。また、ヒストン修飾や



DNA メチル化の状態とその制御に関わる分子群を解析する予定である。

#### E. 結論

ヒストンアセチル化及びヒストンメチル化の変化がヒト肝細胞におけるHBVの複製に影響を与えるだけでなく現在臨床で使用されている薬剤の効果にも影響することが示唆された。

細胞株においてヒストンメチル化阻害剤及びヒストン脱アセチル化阻害剤は、HBVを増加させる傾向にあったが、ヒト肝細胞では抑制効果が認められた。このことは細胞の状態、(たとえば潜伏状態や癌化状態)によりエピジェネティック薬剤の効果に違いがあることを示し、今後実用化に向けて更なる検討が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nakamura, R., Tsukahara, T., Qu, W., Otsuka, T., Ogoshi, K., Saito, T.L., Matsu-shima, K., Sugano, S., Hashimoto, S., Suzuki, Y., Morishita S., Takeda H. Large hypo-methylated domain serves as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates. *Development*. 141,2568-2580 (2014)

##### 2. 学会発表

1) 橋本真一、本多政夫、金子周一：「エピジェネティック薬剤によるHBV複製への影響」(日本分子生物学会年会) 2014年11月25-27日(横浜)

#### 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

特になし

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 ) ]

分担研究報告書

HBVccc肝細胞株の樹立とHBVcccの制御機構

研究分担者：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

**研究要旨**：HBVの持続感染と再活性化の鍵となるのは、pgRNA合成の鋳型となる核内HBVcccである。HBVccc生成にはHBx機能が必須であり、IFNによるHBVccc阻害効果がHBV EnhI領域にあることが報告されている。しかしHBVcccに対するそれらの作用機作は未だ不明であり、HBV複製に關与する未知の宿主因子の同定はHBVcccおよびpgRNAの制御機構解明に必要である。計画3年度の研究では、引き続き、HBx ORF、HBV EnhI及びEnhIIなどHBV転写制御域等に変異を持つ各種HBVレプリコン系の構築と、トランスに働く野生型及び各領域に変異を持つHBx発現系を準備し、HBV持続産生細胞からHBV粒子の高効率な産生条件の検討と濃縮HBV粒子を用いた感染系の構築の検討を行った。また、HBxをHepG2細胞に導入して遺伝子発現パターンを包括的に検討することにより、HBxが影響を与える転写因子の同定を行い、そのHBV複製に与える影響を評価した。

A. 研究目的

HBxを導入したHepG2細胞を用いて、HBxが影響を及ぼす転写因子を同定する。その転写因子の調節機構を明らかにし、新たな治療標的の可能性を探る。

肝癌細胞株を用いてHBVcccの転写に与える影響を評価する。

B. 研究方法

HBxのsiRNAを作成し、HepG2.2.15細胞に導入してHBxがHBV複製に及ぼす影響を検討した。

野生型HBx、HBx-D5(転写活性化能を有しないHBxドメイン)、空ベクターをHepG2細胞に導入しRNAを抽出、マイクロアレイ法にて遺伝子発現パターンの包括的

検討を行った。

Ingenuity Pathway Analysis (IPA)ソフトウェアを用いて、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。

転写因子を制御する上流因子の検討を行った。

C. 研究結果

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(図1)。

図1a. HBx発現量

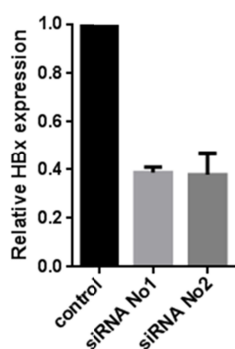
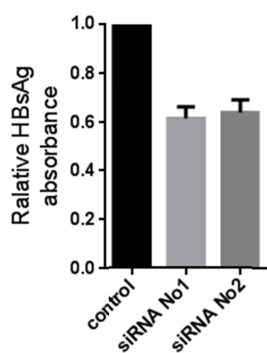


図1b. 培養液中HBs抗原量



特に重要な働きをしていることが示された (図3)。

図3a. DNMT3A1発現量

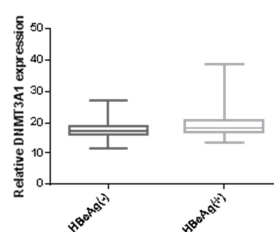


図3b. KDM5 B発現量

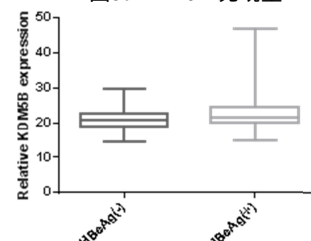
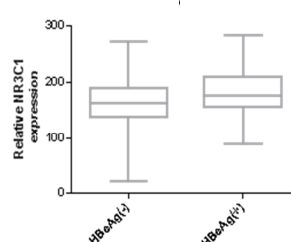


図3c. NR3C1発現量

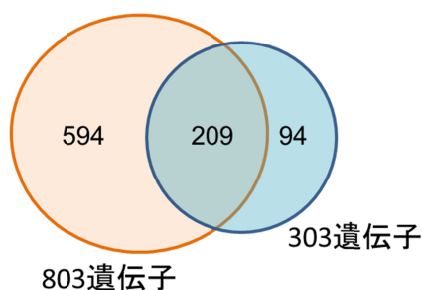


遺伝子発現の包括的検討により、野生型 HBx 導入細胞は空ベクター導入細胞と異なった遺伝子発現パターンを有していた。

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 (図2)。

図2. HBx関連遺伝子とHBx-D5関連遺伝子

HBx関連遺伝子 (p<0.001, FDR<0.1)    HBx-D5関連遺伝子 (p<0.001, FDR<0.1)



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

転写因子を制御する因子の検討では、1 個のマイクロRNAが重要な働きをする可能性が示され。

247 例の肝癌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。

#### D. 考察

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癌で高発現しており、HBx の転写活性化能の解明が予後不良な HBV 関連肝癌の予後改善に繋がる可能性が示唆された。

#### E. 結論

HBx は宿主の転写因子を制御し HBV の複製に関与していた。HBx の発現が正常肝細

胞におけるウイルス複製能の活性化および肝細胞癌細胞における幹細胞性の導入、維持に關与している可能性が示唆された。

3. その他  
特になし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Shimakami T, Honda M, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. Sci Rep. 2014 Apr 15.
- 2) Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. Hepatology; 60(5): 1519-30, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) Hepatitis B virus X protein regulates virus replication through activation of host transcription factors. Oishi N, Wang X, Kaneko S, Murakami S. Internal Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles, 2014.

## 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

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 ) ]

分担研究報告書

HBV特異的免疫応答誘導の高効率化の試み

研究分担者：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

**研究要旨：**臨床応用可能な効率よいHBV特異的免疫応答誘導法の確立を目指し、マウスモデルにおける基礎実験を行った。野生型マウス (H-2d) を、K3 (K-type CpG ODN) あるいはK3-SPG (K3 wrapped by schizophyllan) をアジュバントとしてHBs抗原蛋白 (HBsAg) とともに免疫すると、 $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer) をアジュバントとして用いた場合に比較して、HBsAg特異的CTL (HBs-CTL) の誘導効率は有意に上昇した。HBVキャリアのモデルであるHBsAgトランスジェニックマウス (HBsTg) を、K3あるいはK3-SPGとHBsAgとで免疫した場合にはHBs-CTLの誘導はみられなかったが、HBsTgと indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) ノックアウトマウスとを掛け合わせたマウス (HBsTg-IDO<sup>-/-</sup>) においては同様の免疫法によりHBs-CTLの誘導が確認された。野生型マウスでは、IDO阻害剤である1-methyl-d-tryptophan (1-MT) 投与でIDO遺伝子ノックダウンと同様のCTL誘導効率の上昇が認められることより、K3あるいはK3-SPG、1-MTとHBsAgとを組み合わせた免疫法によってもHBsTgの免疫寛容を打破できる可能性がある。この免疫法はHBVキャリアに対する免疫治療の有力な候補であることが示唆される。

共同研究者：伊藤弘康、岐阜大学大学院医学系研究科病態情報解析医学

石井 健、小檜山 康司、医薬基盤研究所アジュバント開発プロジェクト

石上雅敏、名古屋大学医学部附属病院

A. 研究目的

HBV cccDNA の制御と排除のためには、効率よいHBV特異的獲得免疫応答の誘導法の確立が必要である。現在、感染予防に使用されているHBs抗原ワクチンは、B型慢性肝疾患患者に使用した場合のウイルス制御効果が報告されているものの、効率の面で十分とは言えない。本研究では、高効率な免疫法の確立を目的として、マウスモデル

における基礎研究を行った。

B. 研究方法

B10.D2マウス (H-2d)、HBsTg (B10.D2 background)、HBsTg-IDO<sup>-/-</sup> (HBsTgとIDO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。HBs-CTL の誘導効率は、Dimer X を用いた HBs 28-39 (HBs 抗原 28-39 番目のアミノ酸よりなる Ld 拘束性 CTL エピトープ) 特異的 CD8 陽性細胞比率、ELISPOT (IFN- $\gamma$  陽性細胞を検出) による HBs 28-39 反応性 T 細胞数を解析することにより評価した。

(倫理面への配慮)

マウスでの実験は組換え DNA 実験安全委員会及び動物実験委員会での承認を取得した。

### C. 研究結果

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、IDO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。

### D. 考察

抗原特異的免疫応答誘導効率を向上させるため、アジュバント、免疫作動薬の併用は有効な手段である。CpG ODN については B 型肝炎、マラリアなどに対する臨床試験が行われており、1-MT についても肺癌や前立腺癌などの固形癌に対する臨床試験が進められている(いずれも国外)。このように、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。

### E. 結論

マウスモデルにおいて、HBsAg 特異的免疫応答誘導の高効率化について検討し、アジュバントとしての K3 及び K3-SPG の使用、1-MT の併用が有用な方法であることを明らかにした。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Ito H, Ando T, Ando K, Ishikawa T, Saito K, Moriwaki H, Seishima M. Induction of hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can be up-regulated

by the inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. Immunology 142: 614–623, 2014.

- 2) Ohtaki H, Ito H, Ando K, Ishikawa T, Hoshi M, Ando T, Takamatsu M, Hara A, Moriwaki H, Saito K, Seishima M. Kynurenine production mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates liver injury in HBV-specific CTL-induced fulminant hepatitis. Biochimica et Biophysica Acta 1842:1464–1471, 2014.

## 2. 学会発表

なし

## 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

特になし

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 ) ]

分担研究報告書

HBV感染症におけるNK-DC相互作用の解析

研究分担者：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長

**研究要旨**：HBVの完全排除のためには、HBV複製抑制に加えて、免疫系が活性化することが必要である。初年度はin vitroでHBV複製を維持できる肝癌細胞株 (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- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$  を産生することを明らかにした。昨年度 (2年目) は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。この系ではHBVゲノムの複製から粒子形成までのHBVの生活環の後期過程を再現できる。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。今年度 (3年目) はHBV-Huh7で発現するISGを網羅的に解析し、NK-DCによるNon-cytopathic機序を介したHBV複製抑制にPDC産生IFN- $\gamma$  によるISG (APOBEC3Gなど) 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、NKG2Dが関与していた。以上の結果より、PDCはHBVを認識して、NKとの相互作用によりNKを更に活性化し、HBV複製抑制に関与することが示された。

A. 研究目的

樹状細胞 (DC) はHBVのゲノム、蛋白などを感知し、I型、III型IFNを産生し、免疫系の活性化に関与する。DCがHBVを感知するシステムとして、TLRやC-typeレクチンなどが想定されるが、その詳細は明らかではない。またNK細胞はIFN- $\gamma$  産生を介してHBV感染細胞の障害やHBV複製抑制に関与する。効率のよいDC-NK活性化がHBV複製の抑制に重要であると考えられるが、その詳細は明らかでない。今年度は

HBV抑制効果に関与するDC-NK相互作用の機序と、その責任分子を明らかにし、治療標的としての有用性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に検体提供者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

#### C. 研究結果

NK 細胞は HBV-Huh7 との共培養で IFN- $\alpha$  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- $\gamma$  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。

#### D. 考察

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- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  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。

#### E. 結論

HBV の複製抑制に PDC と NK の相互活性化作用が関与しており、Cytopathic、Non-cytopathic 両方の機序が関与していた。I 型、II 型、III 型 IFN の産生を介する肝細胞 ISG の誘導や NK に発現する TRAIL の誘導が重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, Murata K, **Kanto T**, Masaki N, Mizokami M. High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70. *J Virol Methods*. 207: 169-77, 2014.
- 2) Yamada R, Hiramatsu N\*, Oze T, Morishita N, Harada N, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, **Kanto T**, Hayashi N and Takehara T. Significance of liver stiffness measurement by acoustic radiation force impulse (ARFI) among hepatitis C patients. *J Med Virol* 2014 86:241-247.

##### 2. 学会発表

- 1) **Kanto T**, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M. Natural killer cells as immunological sentinels against HBV infection. **The 2<sup>nd</sup> Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, setatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links**. Hiroshima, Japan, 2014.
- 2) Yoshio S, **Kanto T**, Shouji H, Mano Y,

Sugiyama M, Mizokami M. Human BDCA3+ dendritic cells enhance NK cell-mediated non-cytopathic inhibition of HBV replication. (Distinguished poster presentation) **The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference, Hepatitis B-recent progress in Basic and Clinical research**, Hiroshima, Japan, 2014.

3) Yoshio S, **Kanto T**, Sugiyama M, Shouji H, Mano Y, Aoki Y, Nishida N, Korenaga M, Murata K, Mizokami M. Distinct helper roles of dendritic cell subsets in NK cell-dependent HBV suppression in bystander infected cells. **The Liver Meeting AASLD 65th Annual Meeting and Postgraduate Course**, Boston, MA, USA, 2014.

#### 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

特になし

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 ) ]

分担研究報告書

B型肝炎における自然免疫応答の解明

研究分担者：高橋 健 京都大学医学部附属病院 消化器内科 助教

**研究要旨：** B型肝炎ウイルス ( HBV ) のcccDNAは宿主の核内に長期にわたり安定して存在し、ウイルスRNA産生のための鋳型として機能する。cccDNAは現在の抗HBV治療薬の要である核酸アナログ製剤では駆除できず、そのことがHBVの完全排除が困難な大きな原因となっている。cccDNAの制御と排除のための新たな治療法を確立するには、免疫系によるcccDNAの制御機構の解明が重要であるが、現在は不明な点が多い。本分担研究では、B型肝炎における宿主免疫応答、特に自然免疫の役割を解明する。具体的には、B型肝炎患者の免疫細胞やHBV感染ヒト肝細胞を研究対象とし、新たな遺伝子発現解析手法であるRNA-seqを用いてB型肝炎における自然免疫応答の解析を行う。

A. 研究目的

ウイルス性肝炎では、宿主免疫応答が病原体排除と肝炎発症の両者に深く関わっていることが知られているが、その制御機序に関しては不明な点も多い。特にB型肝炎では、C型肝炎と比べ、自然免疫の理解が不十分といえる。本研究では、新たな解析ツールである次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析 ( RNA-seq ) を行い、B型肝炎における免疫応答を遺伝子発現レベルで網羅的に解析する。

B. 研究方法

(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>*Il2rg*<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。

(倫理面の配慮)

動物実験に関しては「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に従う。当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施する。ヒト由来臨床検体の解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、本人からのインフォームドコンセントを取得

したうえで実施する。

### C. 研究結果

(1) 予備実験として行った健常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。

### D. 考察

今回行った RNA-seq では、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。最近になり、HBV 感染細胞では 1 型ではなく 3 型インターフェロンが産生されるという報告がなされ (Immunity 42:123-132, 2015)、今回の研究結果との乖離を説明する要素として、アッセイ感度やウイルス感染期間の違いなどがあげられ、今後の検討課題と考えられた。

### E. 結論

RNA-seq は B 型肝炎における免疫応答の解析に有用であることが示唆された。HBV 感染細胞における自然免疫応答は RNA-seq の感度以下のレベルである可能性が考えられたが、自然免疫応答の有無に関する結論に至るにはさらなる実験条件の検討を要する。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Inuzuka T, **Takahashi K**, et al. Mouse Models of Hepatitis B Virus Infection Comprising Host-Virus Immunologic Interactions. *Pathogens*. 3: 377-389, 2014.
- 2) Wieland SF, **Takahashi K**, et al. Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro. *J Virol*. 88:752-7, 2014.

#### 2. 学会発表

なし

### 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

特になし

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 ) ]

分担研究報告書

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

研究分担者：加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

**研究要旨：**B型肝炎ウイルス ( HBV ) の複製モデルを用い、HBVが宿主細胞のアポトーシス感受性に与える影響を解析した。遺伝子型が異なるHBV株を用い、さらに成人でのB型急性肝炎から慢性化した症例から得られた株を含む計8株について複製コンストラクトを作製し検討を行った。これらの複製コンストラクトをHepG2細胞に導入し、その後TNF- $\alpha$ とActinomycin Dで処理することでアポトーシスを誘導した。その後、HBc抗原と活性化Caspaseを染色することにより、HBV感染が宿主のアポトーシス感受性に与える影響を評価した。その結果、HBV陽性細胞ではアポトーシス感受性が亢進していたが、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、他の株に比べアポトーシス感受性が低下していた。これらのアポトーシス感受性に与える影響の差は、HBV株が得られた症例の臨床像と関連している可能性が考えられた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス ( HBV ) は血液中のウイルス粒子内では不完全2本鎖DNAとして存在している。肝細胞に感染すると核内で完全2本鎖となり、covalently closed circular DNA (cccDNA) と呼ばれる閉環らせん状のDNAとして存在する。このcccDNAは、B型肝炎寛解後、血中にHBs抗原やHBV-DNAが検出されない状態でも肝細胞内に存在し、免疫能が低下した時などにHBVが再活性化し肝炎が再燃する事が知られている。従って、B型肝炎の根本的治療にはcccDNAの排除が必要であるが、現行治療で用いられている核酸アナログなどの薬剤ではcccDNAを排除することは難しく、

cccDNAが存在する肝細胞を免疫機構により排除することが必要と考えられている。

そこで本研究では、HBVの培養細胞での複製モデルを用い、HBV複製が宿主細胞のアポトーシスに与える影響の解析を行った。培養細胞にHBV発現コンストラクトを導入し、アポトーシス刺激を加える事で、HBV複製が免疫細胞により誘導される宿主のアポトーシスに与える影響を評価した。今年度は成人のB型急性肝炎から慢性化した症例に注目し、慢性化例から分離されたHBV株がアポトーシス感受性に与える影響を解析した。

## B. 研究方法

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 陽性細胞と陰性細胞は、HBV 遺伝子導入細胞を固定した後に抗 HBc 抗体による染色を行い Flow Cytometry により選別した。アポトーシス細胞の検出は活性化された Poly-Caspase の蛍光染色により行った。さらに Caspase-8, -9, -3/7 の個別の Caspase を染色により、アポトーシスシグナルの活性化部位を推定した。

(倫理面の配慮)

本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株および HBV 株であり倫理面での問題はない。HBV 複製モデルに用いた HBV 発現コンストラクトは患者血清中から分離された株を用いており大臣確認実験にはあたらない。

## C. 研究結果

HBV 遺伝子型 A 株 2 種類 (A40; 慢性肝炎患者由来、AC20; 急性肝炎慢性化例由来)、遺伝子型 Bj 株 2 種類 (B18; 急性肝炎患者由来、B35W; 慢性肝炎患者由来)、遺伝子型 C 株 3 種類 (CL8; 慢性肝炎患者由来、EC3P; 慢性肝炎患者由来、CC23; 急性肝炎慢性化例由来)、遺伝子型 H 株 1 種

類 (H14M; 急性肝炎慢性化例由来) 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。導入効率は HBc 抗体による FCS 解析により確認し、50%以上であることを確認した。またこれらの株の培養細胞内での複製はサザンブロット法にて確認した。これらの HBV 導入細胞を 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 感染がアポトーシス感受性に与える影響の解析は、HBV 陽性細胞の Poly-Caspase 陽性率が陰性細胞の陽性率の何倍になっているかを比較し行った。その結果、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 (図 1)。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。

### Apoptosis Index (Fold of HBV(-))

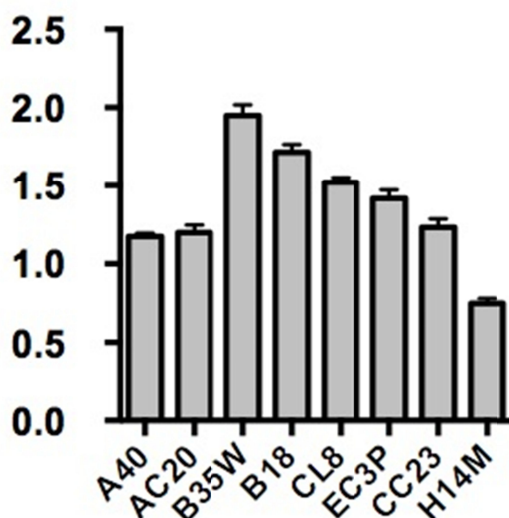


図1. HBV 株によるアポトーシス感受性の違い

#### D. 考察

遺伝子型が異なり、成人でのB型急性肝炎慢性化症例から得られた株を含む8株のHBVを発現するコンストラクトをHepG2細胞に導入し、それらのHBV株の複製がアポトーシス感受性に与える影響を検討した。今回の検討では、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。

#### E. 結論

今回の検討により、HBV感染細胞は免疫細胞によるアポトーシス誘導に対して感受

性が高いことが示された。しかし、成人の急性肝炎後の慢性化例が多い遺伝子型A株や、急性肝炎慢性化例から得られた株の導入ではアポトーシス感受性の低下が観察されており、これらの事象は用いたHBV株が得られた症例の臨床像と関連している可能性が考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

14) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. World J Gastroenterol, 20(11), 3044-9, 2014.

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

特になし

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 ) ]

分担研究報告書

TCRクローニングとTCRを用いた細胞治療

研究分担者：村口 篤 富山大学医学薬学研究部免疫学講座 教授

**研究要旨**：我々はヒト末梢血中の抗原特異的プライマリーT細胞から単一細胞レベルで、ヒトT細胞受容体 ( TCR ) を迅速に取得するための技術 ( hTEC10: human TCR efficient cloning within 10 days) を開発した ( Nat Med. 2013 Nov;19(11):1542-6 ) 。昨年度は、抗原ペプチド/MHC四量体の結合に加えて、抗原ペプチドの刺激により抗原特異的T細胞が活性化されて分泌されるIFN- $\gamma$  や、発現が増強される活性化マーカー ( CD137 ) を指標に、hTEC10法で抗原特異的プライマリーT細胞を検出し、抗原特異的TCR遺伝子を取得できたことを示した。今年度は、金沢大学でB型肝炎患者のT細胞を活性化できることを確認したB型肝炎ウイルス ( HBV ) 由来ペプチドを用いて、患者および健常人よりHBV特異的細胞傷害性T細胞を同定し、そのTCR遺伝子を取得することを試みた。

A. 研究目的

金沢大学が同定した B 型肝炎患者の末梢血 T リンパ球を活性化することができる HBV 由来ペプチドを用いて、抗原特異的プライマリーT 細胞 1 個 1 個から TCR / 遺伝子をペアで取得できる技術 ( hTEC10 ) を用いて HBV 特異的 T 細胞を同定し、その TCR を取得することを目的とした。

B. 研究方法

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種類を用いた。

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。セルソータを用いて1ウェルに1細胞が入るように回収した。回収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レパトリーを解析した。

現在、同じTCR 鎖と 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。(倫理面への配慮)

血液提供者には、説明文書を用いて研究内容・危険性について十分に説明し、同意を得ている ( インフォームドコンセント ) 。



また、これらの実験については、富山大学の倫理委員会の承認を得て、富山大学の医の倫理に関する規則等に従って行っている。

### C. 研究結果

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。

ソートした細胞のTCR鎖、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。これらの細胞群は、抗原により特異的に活性化され、クローナルに増殖したT細胞と考えられ、これらの中にHBV特異的細胞傷害性T細胞由来TCRが含まれると思われる。そこで、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。

### D. 考察

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ている。

### E. 結論

健常人ドナーの末梢血リンパ球中にHBVペプチドに反応する細胞傷害性T細胞が存在する事を示唆する結果が得られた。今後、解析を進め実証していく必要がある。さらに、B型肝炎患者の末梢血のリンパ球も解析していく予定である。また、1個のT細胞中の2種類のTCRを、どのように迅速かつ効率よく解析していくかも、今後の課題としてあげられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi E, Kishi H, Ozawa T, Horii M, Hamana H, Nagai T, Muraguchi A. Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Feb; 444(3): 319-24.
- 2) Kobayashi E, Kishi H, Muraguchi A. A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy. *Oncoimmunology*. 2014 Jan; 3(1): e27258.

#### 2. 学会発表

- 1) Kishi H, Hamana H, Tajiri K, Ozawa T,

Muraguchi A. Cis-interaction of TCR and antigen/MHC class I complexes on a CD8<sup>+</sup> T cell. 第43回日本免疫学会学術集会；2014 Dec 10-12；京都。

2) Hamana H, Kishi H, Ozawa T, Muraguchi A. Development of simple and efficient method for amplification of TCR ab cDNA from single human T cells. 第43回日本免疫学会学術集会；2014 Dec 10-12；京都。

3) 岸 裕幸，小林栄治，杉山大介，西川博嘉，坂口志文，村口 篤。メラノーマ患者および健常人PBMC中のCD4<sup>+</sup>T細胞の単一細胞レベルでのレパートリー解析。第73回日本癌学会学術総会；2014 Sep 25-27；横浜。

4) 岸 裕幸，浜名 洋，小林栄治，杉山大介，西川博嘉，鬼塚志乃，坂口志文，村口 篤。メラノーマ患者および健常人の末梢血CD4<sup>+</sup>T細胞の単一細胞レベルでのレパートリー解析。第6回血液疾患免疫療法研究会学術集会；2014 Sep 6；京都。

5) 中河秀俊，水腰英四郎，清家拓哉，山宮大典，米島 淳，稲田悠記，木田明彦，梶喜一郎，玉井利克，熊谷将史，寺島健志，北原征明，飯田宗穂，小林栄治，岸裕幸，村口 篤，金子周一。がんペプチドワクチン療法におけるTCRレパートリーの経時的変化の検討。第18回日本がん免疫学会総会；2014 Jul 30-Aug 1；松山。

6) Nakagawa H, Mizukoshi E, Kobayashi E, Terashima T, Kitahara M, Iida N, Kishi H, Muraguchi A, Kaneko S. Functional features of antigen-specific T-cell receptors reflected

clinical responses of a-fetoprotein-derived peptides vaccine treatment for advanced hepatocellular carcinoma. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases; 2014 Nov 7-11; Boston.

#### 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

特になし

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 ) ]

分担研究報告書

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

研究分担者：池田 裕明 三重大学大学院医学系研究科 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。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、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。国内外においてhistone修飾を標的とする薬剤、あるいはsmall RNAなどの核酸医薬を用いて直接にcccDNAを標的とする治療薬研究が進められているが、逆に再活性化の可能性が指摘されるなど、有効な治療法が開発されていない。本研究は、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す。cccDNAの細胞内の動態と、それを持つ肝細胞に対する免疫の状態を明らかにする。標的とする抗原、その抗原エピトープを認識するT細胞レセプター（TCR）を同定し、TCR遺伝子導入T細胞、ペプチドなどを作製し、動物モデルを用いてcccDNAの制御と感染細胞の排除に対する有効性と作用機序を明らかにする。本分担研究者は特に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を目指す。

A. 研究目的

B型肝炎に対しては、国内外においてhistone修飾を標的とする薬剤、あるいはsmall RNAなどの核酸医薬を用いて直接にcccDNAを標的とする治療薬研究が進められている。しかし、逆に再活性化の可能性が指摘されるなど、有効な治療法が開発されていない。本研究は、こうした直接的な抗ウイルス剤の開発と異なり、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。

本分担研究者は、本事業の研究者らと連

携し、標的とする抗原とその抗原エピトープを認識するT細胞レセプター（TCR）を同定し、TCR遺伝子導入T細胞を用いた画期的な新規治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

(1)我々の開発した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。(2) 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。(倫理面の配慮)

本研究に用いるヒト末梢血等の検体の採集、解析はヘルシンキ宣言にのっとり行なわれ、全て三重大学医学部研究倫理委員会にて承認されたプロトコールに従い、被験者本人の書面による同意書を得て実施される。採取した検体は本人特定不可能な暗号化がなされ盗難防止処置を施した冷蔵庫、液体窒素タンクに保存する。被験者個人情報に関しては匿名化され、個人のプライバシー、遺伝子解析の結果が外部に漏洩されないよう厳重な注意、処置が施行される。

レトロウイルスを用いたヒト末梢血単核球への腫瘍抗原特異的 TCR の導入実験は三重大学の組換え DNA 実験審査委員会及び三重大学医学部研究倫理委員会において承認されている。これらの実験は三重大学において承認を受けた P2 レベルの研究室にて行なわれる。

実験動物を用いた T 細胞輸注療法、遺伝子免疫療法の研究は三重大学の組換え DNA 実験審査委員会、三重大学医学部研究倫理委員会、動物実験審査委員会においてすでに承認を受けており、三重大学において承認を受けた実験室、飼育室において実施さ

れる。

## C. 研究結果

(1)我々の開発した MAGE-A4 特異的 HLA-A2402 拘束性 TCR と NY-ESO-1 特異的 HLA-A0201 拘束性 TCR について、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。(2)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。

## D. 考察

我々の開発した 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。

## E. 結論

我々の開発した MAGE-A4 特異的 HLA-A2402 拘束性 TCR 及び NY-ESO-1 特異的 HLA-A0201 拘束性 TCR を用いた TCR 遺伝子治療は正常組織に交差反応する可能性が低く、安全に実施可能であると考えられた。また、細胞内発現タンパク質由来のペプチドと MHC との複合体を認識する CAR が作製可能であり、従来の細胞表面抗原のみならず、細胞内抗原を標的とした CAR 療法が実施可能となる可能性が示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ishihara M, Seo N, Mitsui J, Muraoka D, Tanaka M, Mineno J, Ikeda H, Shiku H. Systemic CD8+ T Cell-Mediated Tumoricidal Effects by Intratumoral Treatment of Oncolytic Herpes Simplex Virus with the Agonistic Monoclonal Antibody for Murine Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor. PLoS One, 9(8):e104669. 2014.
- 2) O'Sullivan T, Saddawi-Konefka R, Gross E, Tran M, Mayfield SP, Ikeda H, Bui JD. Interleukin-17D mediates tumor rejection through recruitment of natural killer cells. Cell Rep., 7(4):989-998, 2014.
- 3) Hosoi H, Ikeda H, Imai N, Amaike C, Wang L, Orito Y, Yamane M, Ueno H, Ideno M, Nukaya I, Enoki T, Mineno J, Takesako K, Hirano S, Shiku H. Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8<sup>+</sup> T cells. Eur J. Immunol., 44:1727-1758, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Isao Tawara, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Naoyuki Katayama<sup>2</sup>, Hiroshi Shiku. Tumor-specific TCR-engineered donor lymphocyte infusion therapy with reduced GVHD induction utilizing novel retrovirus vector silencing endogenous TCR expression. American Society of Hematology 56<sup>th</sup> annual meeting, SF, USA, 2014.
- 2) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Ayumi Kawamura, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Tumor-specific donor Lymphocyte infusion therapy with allogeneic T cells utilizing novel retrovirus vector silencing endogenous TCR expression. Society for immunotherapy of Cancer 29<sup>th</sup> Annual Meeting. National Harbor, MD, USA, 2014.
- 3) 池田裕明 TCR遺伝子改変T細胞輸注による新しいがん免疫療法の臨床開発 2014第63回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会 名古屋 2014.
- 4) Hiroaki Ikeda, Hiroaki Ueno, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会 東京 2014.
- 5) Yasushi Akahori, Motohiro Yoneyama, Hiroaki Ikeda, Yuki Orito, Yoshihiro Miyahara, Yasunori Amaishi, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Development of

chimeric antigen receptor immunotherapy targeting intracellular WT1 gene product. 第20回日本遺伝子治療学会学術集会 東京 2014.

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

6) Hiroaki Uneno, Hiroaki Ikeda, Ayumi Kawamura, Makiko Yamane, Naoko Imai, Sachiko Okamoto, Junichi Mineno, Kazutoh Takesako, Hiroshi Shiku. Development of TCR gene therapy with allogeneic T cells. 第18回日本がん免疫学会総会 松山 2014.

7) 赤堀泰 米山元裕 池田裕明 宮原慶裕 織戸由貴 天石泰典 岡本幸子 峰野純一 竹迫一任 珠玖洋 WT1ペプチド-HLA-A24複合体を認識するヒト抗体の単離とそれを用いたCAR治療法の開発 第18回日本がん免疫学会総会 松山 2014.

8) Hiroaki Ikeda, Shinichi Kageyama, Naoko Imai, Yoshihiro Miyahara, Mikiya Ishihara, Naoyuki Katayama, Hirofumi Yoshioka, Daisuke Tomura, Ikuei Nukaya, Junichi Mineno, Kazuto Takesako, Hiroshi Shiku. Clinical application of TCR gene-transduced lymphocytes for patients with epithelial cancer and other types of malignancy: In vivo persistence of adoptively transferred TCR gene-transduced lymphocytes with anti-tumor reactivity in patients. American Society of Gene & Cell Therapy 17<sup>th</sup> Annual meeting. Washington DC, USA, 2014.

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

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 ) ]

分担研究報告書

ペプチド + アジュバント併用療法の開発

研究分担者：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リーダー

**研究要旨**：本研究は主としてペプチドを抗原としたB型肝炎ワクチンの開発の為に、新規アジュバントの開発を目的とする。これまでに、モデル抗原およびモデルペプチドを用いて新規アジュバント開発研究を行っており、前年度 (平成25年度)にナノ粒子状のTLR9リガンドである、K3-SPGの開発に成功し、ペプチドワクチンとしての効果および霊長類であるカニクイザルにおいても、強いアジュバント効果を確認している。本年度 (平成26年度)は、研究班員にK3-SPGを提供する事で、B型肝炎治療法としての有用性の評価を開始した。さらに、2種類の自然免疫活性化分子を組み合わせた新しいワクチンアジュバント開発を試みた。

A. 研究目的

安全で有効性の高いワクチン開発のために、現在世界中で新規アジュバントの開発研究が行われている。実際に、国内においてアルミニウム塩アジュバントのみがワクチンの添加剤に含まれており、ワクチンの効果を高めている。しかしながら、ある種のウイルス感染にはアルミニウム塩では十分な免疫応答を誘導する事が困難である事から、新たなアジュバント、特に細胞傷害性T細胞を誘導し得るアジュバントの開発は必須である。また、現在ペプチドワクチンの開発も精力的に進められており、ペプチドワクチンのためのアジュバントの開発も重要な課題である。本研究は主としてペプチドを抗原としたワクチン候補に供与するアジュバントの開発を行う事で、B型肝炎の治療法およびワクチンの開発を目的と

する。

B. 研究方法

本研究では、昨年度に開発に成功したナノ粒子型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。

(倫理面の配慮)

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

承認を得た上で、倫理面に配慮し、実験を行った。

### C. 研究結果

昨年度に TLR9 リガンドである CpG ODN (K3) と 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、さらにはヒト抹消血単核球に作用し、強力に IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$  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。

さらに、通常の CpG ODN のみではアジュバント効果および自然免疫活性可能が低い事から、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- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$  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。

### D. 考察

今年度は、昨年開発に成功した 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。

### E. 結論

上記の通り、ペプチドワクチンに最適化された K3-SPG アジュバントを、共同研究先に提供することで、B 型肝炎治療への有用性が検討されている。現在は GMP ロット化を進めており、より臨床での使用に近い形での提供が今後は重要であると考えられる。また、cccDNA の除去にかかわる自然免疫の機序を利用したアジュバント単独免疫療法開発にも着手していく事が B 型肝炎治療には重要であると考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表



- 1) Koo CX, Kobiyama K, Shen YJ, LeBert N, Ahmad S, Khatoo M, Aoshi T, Gasser S, Ishii KJ. RNA Polymerase III Regulates Cytosolic RNA:DNA Hybrids and Intracellular MicroRNA Expression. *J Biol Chem*. 2015 Jan 26. pii: jbc.M115.636365. [Epub ahead of print]
- 2) Temizoz B, Kuroda E, Ohata K, Jonai N, Ozasa K, Kobiyama K, Aoshi T, Ishii KJ. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type II IFN. *Eur J Immunol*. 2014 Dec 22. doi: 10.1002/eji.201445132. [Epub ahead of print]
- 3) Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1064-9.
- 4) Piao Z, Akeda Y, Takeuchi D, Ishii KJ, Ubukata K, Briles DE, Tomono K, Oishi K. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. 2014 Sep 29;32(43):5607-13.
- 5) Uraki R, Das SC, Hatta M, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Ozawa M, Coban C, Ishii KJ, Kawaoka Y. Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine. *Vaccine*. 2014 Sep 15;32(41):5295-300.
- 6) Mizukami T, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhashi K, Ishii KJ, Hamaguchi I, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. *PLoS One*. 2014 Jul 10;9(7):e101835.
- 7) Hemmi M, Tachibana M, Tsuzuki S, Shoji M, Sakurai F, Kawabata K, Kobiyama K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. The early activation of CD8+ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector. *Biomed Res Int*. 2014;2014:158128.
- 8) Yagi M, Bang G, Tougan T, Palacpac NM, Arisue N, Aoshi T, Matsumoto Y, Ishii KJ, Egwang TG, Druilhe P, Horii T. Protective epitopes of the Plasmodium falciparum SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences. *LoS One*. 2014 Jun 2;9(6):e98460.
- 9) Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 2014 May 14;15(5):551-63.
- 10) Onishi M, Kitano M, Taniguchi K,

Homma T, Kobayashi M, Sato A, Coban C, Ishii KJ. Hemozoin is a potent adjuvant for hemagglutinin split vaccine without pyrogenicity in ferrets. *Vaccine*. 2014 May 23;32(25):3004-9.

11) Imanishi T, Ishihara C, Badr Mel S, Hashimoto-Tane A, Kimura Y, Kawai T, Takeuchi O, Ishii KJ, Taniguchi S, Noda T, Hirano H, Brombacher F, Barber GN, Akira S, Saito T. Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation. *Nat Commun*. 2014 Apr 10;5:3566.

12) Lam AR, Le Bert N, Ho SS, Shen YJ, Tang ML, Xiong GM, Croxford JL, Koo CX, Ishii KJ, Akira S, Raulet DH, Gasser S. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. *Cancer Res*. 2014 Apr 15;74(8):2193-203.

## 2. 学会発表

1) Kuroda E, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 22<sup>nd</sup> International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.

2) Kobiyama K, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonist targets macrophages and dendritic cells in the draining lymph node to exert its adjuvant activity. 22<sup>nd</sup> International Symposium on Molecular Biology of Macrophages. Kobe. June 2-3, 2014.

3) Kobiyama K, Ishii KJ. Differential roles of antigen presentation and DNA adjuvant activity

in immunogenicity of DNA vaccine. 2014 DNA Vaccine Conference. San Diego, California, USA. Jul 21-23, 2014.

4) Aoshi T, Nakatsu N, Igarashi Y, Ito J, Kishishita N, Yamada H, Mizuguchi K, Ishii KJ. Adjuvant Database Project: comprehensive transcriptome analysis in animal models. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.

5) Coban C, Onishi M, Ozkan M, Ishii KJ. Potential and mechanism of Hemozoin as vaccine adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.

6) Hayashi M, Aoshi T, Petrovsky N, Ishii KJ. Advax<sup>TM</sup>, a formulation of delta inulin microparticles, is a non-canonical adjuvant that induces distinct immune response depending on the property of vaccine antigen. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.

7) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. K3-SPG, a nano-particulate TLR9 agonistic ligand works as a potent IFN inducer and CTL adjuvant. Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. Oct 8-13, 2014.

8) Kobiyama K, Kitahata Y, Ishii KJ. Antigen free systemic monotherapy by nano-

particulate TLR9 agonist induces CTL responses for the tumor regression. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

9) Kuroda E, Ozasa K, Kobiyama K, Ishii KJ. Particulate-induced systemic IgE production is mediated by DAMPs released from alveolar macrophages. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

10) Ozkan M, Onishi M, Ishii KJ, Coban C. Investigation of Potential and Mechanism of Hemozoin as Vaccine adjuvant. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

11) Temizoz B, Kuroda E, Kobiyama K, Ishii KJ. Synergistic activity of TLR9- and STING-agonists in innate and adaptive Type-II IFN production. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都. 2014年12月10日~12月12日.

#### 招待講演

1) 2014年4月27~30日 23th.National Congress of Immunology 「Good and Bad Inflammation During Vaccination」

2) 2014年5月14日 熊本大学 最先端研究セミナー(リエゾンラボ研究会) 「Adjuvant Innovation for influenza and cancer vaccination」

3) 2014年6月1日 第40回神戸薬科大学卒後研修講座「ワクチン開発研究の最前線 安全安心なワクチンを目指して」

4) 2014年7月2日~4日 第41回日本毒性学会学術年会 教育講座 座長「がんワクチン開発の現状と課題」シンポジウム

座長「ワクチンの安全性評価」

5) 2014年7月11日 京都府立医科大学 特別講義「ワクチン、アジュバントの基礎と臨床：細胞死とマクロファージの役割」

6) 2014年8月25日~26日 第2回免疫記憶 - ワクチン国際研究会シンポジウム 「Innovation and renovation of vaccine adjuvant」

7) 2014年9月11日~12日 第21回日本免疫毒性学会学術年会 「ワクチンの副作用は予測できるか？安全なアジュバントとバイオマーカー開発の新展開」

8) 2014年9月18日 日本生物科学研究所 第二研究会「アジュバント開発研究の最前線“免疫の種差と動物ワクチン”」

9) 2014年9月25~26日 第73回日本癌学会学術総会「次世代アジュバントの開発研究」

10) 2014年10月8日~13日 Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology. The modes of action of vaccine adjuvant. Seattle, Washington, USA. 「Nucleic Acids as "Built-in" or "Inducible" Adjuvant during Vaccination」

11) 2014年10月16日 「医薬品等区分」俯瞰に関するワークショップ「次世代ワクチン<アジュバント>」

12) 2014年10月18日 第87回日本生化学会大会「RNA Polymerase-IIIは細胞質のRNA:DNAハイブリッドと細胞内miRNA発現を制御する」

13) 2014年10月18日~19日 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会「過去の歴史から学ぶこれからのワクチン開発と戦

略」

- 14) 2014年10月20日～21日 The 1<sup>st</sup> International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014 (東京大学)「Nucleic acids as ‘built-in’ or ‘inducible’ adjuvant during vaccination」
- 15) 2014年11月6～7日 The 2014 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」
- 16) 2014年11月10日～12日 第62回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム「次世代のワクチン開発～Next generation vaccine development」 「New mechanism of action and potential biomarkers for vaccine adjuvant」
- 17) 2014年12月4日～5日 第12回日本糖鎖科学コンソーシアム(JCGG)シンポジウム「新規アジュバント開発に向けて」
- 18) 2014年12月4日～5日 第27回日本バイオセラピー学会学術集会「がん免疫療法に資する核酸医薬を基盤としたアジュバントの開発」
- 19) 2015年2月3日 琉球大学 講義「アジュバント開発研究の新展開：安全でよく効くワクチンを目指して」
- 20) 2015年3月25日～28日 日本薬学会第135年会「アジュバント開発研究の最前線：データベースを駆使した安全性、有効性のバイオマーカー」

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

## G. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

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 ) ]

分担研究報告書

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

研究分担者：水腰 英四郎 金沢大学医薬保健研究域医学系 准教授

**研究要旨：** B型肝炎ウイルス ( HBV ) のcccDNAは、血液中にウイルス粒子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存在し、現行の抗ウイルス治療に抵抗性である。cccDNAの制御や感染細胞の排除を目的とする治療法を開発するためには、cccDNA感染細胞において発現している細胞傷害性T細胞(CTL)エピトープを明らかにし、より強力な免疫応答を誘導できる治療法を開発することが必要である。本研究では、こうしたCTLエピトープの同定と同エピトープのアミノ酸配列に基づいたペプチドワクチンの開発を行い、HBV感染細胞の排除を目的とした、より強力な免疫治療法を開発を行う。本年度はペプチドワクチンの候補となるHBV由来CTLエピトープの同定と、より強力なペプチドワクチンを作製するための調整法の検討を行った。

A. 研究目的

HBV cccDNA 感染肝細胞に発現している細胞傷害性 T 細胞エピトープを同定することにより、cccDNA 感染細胞の排除を目的とする免疫治療法を開発を行う。

B. 研究方法

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、コンピュータソフト(BIMAS)を用いて、HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの予測を行う。次に HLA-A24 分子への結合予測スコアが 5.0 以上のエピトープをもつペプチドを作製し、各種免疫学的アッセイ法 ( ELISPOT アッセイ、CTL アッセイ等 ) にてヒト末梢血リンパ球での免疫反応を検討する。こうしたエピトープ

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する。本研究の倫理面への配慮として、臨床研究・疫学研究・ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。本研究に関しては、研究施設内の倫理委員会として、1) 医学倫理審査委員会と2) ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の2つの承認を得ている。

C. 研究結果

コンピュータにて予測された CTL エピトープのうち、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。今回同定された HBV 由来 CTL エピトープに対する免疫反応と臨床データを詳細に解析すると、免疫応答を認めた患者では血清 ALT 値が高く、HBV コア関連抗原量が低いといった、cccDNA 感染細胞の除去に関与している可能性のあるエピトープと推定されるものが含まれていた。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。

#### D. 考察

今回同定した新規 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。

#### E. 結論

HBVcccDNA 感染細胞に対する免疫治療法の開発に必要なペプチドの同定と、動物モデルにおけるペプチドワクチンの免疫誘導効果と安全性を確認した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, Honda M, Kaneko S. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Liver Int. 2014 in press.
- 2) Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S. Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Int

Immunopharmacol. 2014 Aug;21(2):346-53.

3) Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, Honda M, Kaneko S. P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. Cancer Immunol Immunother. 2014 May;63(5):479-89.

4) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S. In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. Cancer Immunol Immunother. 2014 Apr;63(4):347-56.

## 2. 学会発表

なし

## 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

特になし





## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 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
なし							

## 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
T Terashima, (金子、水腰)	Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy.	Hepatol Res	-	-	(in press)
K Yamada, (金子、水腰)	Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis.	Liver Int	-	-	(in press)
T Yamashita, (金子、中本、水腰)	Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma.	Hepatology	60(5)	1674-1685	2014
K Ishikura, (金子)	Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells.	Diabetologia	57(9)	1968-1976	2014
T Shirasaki, (金子、村上)	Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- $\beta$ signaling pathway.	Hepatology	60(5)	1519-1530	2014
T Yamashita, (金子)	Orchestration of hepatocellular carcinoma development by diverse liver cancer stem cells.	J Gastroenterol	49(7)	1105-1110	2014
M Kitahara, (金子、中本、水腰)	Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	Int Immunopharmacol	21(2)	346-353	2014
N Oishi, (金子)	Molecular biology of liver cancer stem cells.	Liver Cancer	3(2)	71-84	2014

F Lan, (金子)	LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance.	Diabetes	63(5)	1649-1664	2014
Y Takeshita, (金子、水腰)	The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial.	Diabetologia	57(5)	878-890	2014
T Shimakami, (金子、村上)	The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro.	Sci Rep	4	4688	2014
H Nakagawa, (金子、中本、水腰)	In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation.	Cancer Immunol Immunother	63(4)	347-356	2014
K Kato, (金子)	Ectopic fat accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with nonalcoholic Fatty liver disease.	PLoS One	9(3)	e92170	2014
T Terashima, (金子、水腰)	P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma.	Cancer Immunol Immunother	63(5)	479-489	2014
Nemoto T, (中本)	Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series.	Mol Clin Oncol	2 (6)	1028-1034	2014
Ofuji K, (中本)	A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer.	Int J Oncol	46 (2)	497-504	2014
Miyake Y, (中本)	Multicenter validation study of anti-programmed cell death-1 antibody as a serological marker for type 1 autoimmune hepatitis.	Hepatol Res	44 (13)	1299-1307	2014
Nakamura R, (橋本)	Large hypomethylated domain serves as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates.	Development	141	2568-2580	2014
Ito H, (石川)	Induction of hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes can be up-regulated by the inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity.	Immunology	142	614-623	2014
Ohtaki H, (石川)	Kynurenine production mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase aggravates liver injury in HBV-specific CTL-induced fulminant hepatitis.	Biochimica et Biophysica Acta	1842	1464-1471	2014

Mukaide M, (考藤)	High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70.	J Virol Methods	207	169-177	2014
Yamada R, (考藤)	Significance of liver stiffness measurement by acoustic radiation force impulse (ARFI) among hepatitis C patients.	J Med Virol	86	241-247	2014
Inuzuka T, (高橋)	Mouse Models of Hepatitis B Virus Infection Comprising Host-Virus Immunologic Interactions.	Pathogens	3	377-389	2014
Wieland S (高橋)	Human plasmacytoid dendritic cells sense lymphocytic choriomeningitis virus-infected cells in vitro.	Journal of Virology	88	752-757	2014
Yamada N, (加藤)	Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection.	World J Gastroenterol	20(11)	3044-3049	2014
Kobayashi E, (村口)	Retroviral vectors for homologous recombination provide efficient cloning and expression in mammalian cells.	Biochem Biophys Res Commun	444(3)	319-324	2014
Kobayashi E, (村口)	A novel system for cloning human TCRs: Cutting short the way to TCR-based anticancer therapy.	Oncoimmunology	3(1)	e27258	2014
Ishihara M, (池田)	Systemic CD8+ T Cell-Mediated Tumorcidal Effects by Intratumoral Treatment of Oncolytic Herpes Simplex Virus with the Agonistic Monoclonal Antibody for Murine Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor.	PLoS One	9	e104669 (online)	2014
O'Sullivan T, (池田)	Interleukin-17D mediates tumor rejection through recruitment of natural killer cells.	Cell Reports	7	989-998	2014
Hosoi H, (池田)	Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8 <sup>+</sup> T cells.	European Journal of Immunology	44	1727-1758	2014
Koo CX, (石井)	RNA Polymerase III Regulates Cytosolic RNA:DNA Hybrids and Intracellular MicroRNA Expression.	J Biol Chem	-	-	(in press)
Temizoz B, (石井)	TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type II IFN.	Eur J Immunol	-	-	(in press)

Natsuaki Y, (石井)	Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin.	Nat Immunol	15(11)	1064-1069	2014
Piao Z, (石井)	Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice.	Vaccine	32(43)	5607-5613	2014
Uraki R, (石井)	Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine.	Vaccine	32(41)	5295-5300	2014
Mizukami T, (石井)	System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test.	PLoS One	9(7)	e101835	2014
Hemmi M, (石井)	The early activation of CD8+ T cells is dependent on type I IFN signaling following intramuscular vaccination of adenovirus vector.	Biomed Res Int	2014	158128	2014
Yagi M, (石井)	Protective epitopes of the Plasmodium falciparum SERA5 malaria vaccine reside in intrinsically unstructured N-terminal repetitive sequences.	PLoS One	9(6)	e98460	2014
Zhao H, (石井)	Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria.	Cell Host Microbe	15(5)	551-563	2014
Onishi M, (石井)	Hemozoin is a potent adjuvant for hemagglutinin split vaccine without pyrogenicity in ferrets.	Vaccine	32(25)	3004-3009	2014
Imanishi T, (石井)	Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation.	Nat Commun	5	3566	2014
Lam AR, (石井)	RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma.	Cancer Res	74(8)	2193-2203	2014