

令和元年6月11日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18467

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスに対する治療ワクチンの作製と作用機序の解明

研究課題名(英文) Generation and analysis of therapeutic vaccine for HCV

研究代表者

大槻 貴博(OHTSUKI, Takahiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：10593642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：病態を呈するHCV構造蛋白質CN2発現トランスジェニック(Tg)マウスとHCV全蛋白質CN5発現Tgマウスを作製し、HCV非構造蛋白質N25発現組換えワクチニアウイルス(rVV-N25)のHCV治療ワクチン効果を調べたところ、N25領域に病態正常化作用と細胞性免疫再賦活化による肝臓内ウイルス抗原排除効果を見出した。異なる領域のDNAワクチンとrVVとのheterologous prime-boost接種により細胞性免疫をより強力に誘導し、肝臓内のウイルス抗原を排除する事を見出した。さらにN25領域の細胞性免疫再賦活化と抗原排除にはNS5Aが関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年高い著効率を示す抗HCV薬が開発されたが、大変高価であるため途上国などでは経済的に厳しく使用することができない。安価で安全な治療ワクチンの開発が急務である。我々が作製したrVV-N25は肝臓の病態正常化およびウイルス抗原排除能を示し、さらにN25とは異なる領域のDNA/rVV prime-boost接種により強力に治療ワクチン効果が高まり、抗原排除にはNS5A領域が関与することがわかった。rVV-N25の母体は小児への接種実績のある安全性の高い天然痘ワクチン株であり、GMP準拠で作成しているため治療ワクチンとしてそのまま使用できる。今後は作用機序解明により開発を遂行できると考える。

研究成果の概要(英文)：There is no therapeutic vaccine for HCV because there are no small model animals that can be evaluated. We have generated transgenic (Tg) mice expressing HCV structural protein CN2 or HCV whole protein CN5 that exhibit disease state under normal immune response, and evaluated the effect of HCV therapeutic vaccine. When we intradermally inoculated mice with a recombinant vaccinia virus expressing HCV nonstructural protein N25 (rVV-N25), the N25 region could ameliorate the pathological condition and reactivates cellular immunity, thus eliminate viral antigens in the liver. We found that more potent cellular immunity can be induced by DNA/rVV heterologous prime-boost vaccination with hetero regions (N25/CN2) but homo regions (N25/N25) into CN5 mice. Furthermore, when we inoculated DNA/rVV prime-boost vaccination with DNA vaccine expressing each HCV ORFs and rVV-CN2 with CN5 mice, we found that the NS5A N25 region is involved in antigen clearance by cellular immune reactivation.

研究分野：治療ワクチン

キーワード：治療ワクチン HCV 感染免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全世界で1.5億人が感染しているC型肝炎ウイルス(HCV)は、急性感染後、肝臓内ウイルス抗原排除を担うCD8T細胞のエフェクター機能を阻害し、細胞性免疫を抑制することで高率に持続感染し、慢性肝炎、肝硬変を経て肝細胞癌へと進展する。近年、約90%の高い著効率を示す抗ウイルス薬が開発されたが、高価なため発展途上国などでは、全ての患者が利用することはできない。安全で安価なワクチンの早急な開発が望まれるが、HCVはヒトおよびチンパンジーにしか感染しないため、ワクチンを評価できる小モデル動物系がほとんどいない。我々は、これまでにC型肝炎の分子病態解析するために、poly(I:C)投与により任意の時期にHCVの構造蛋白質CN2(Core, E1, E2, p7, NS2)を発現できるトランスジェニック(Tg)マウス(CN2マウス)と、HCV全蛋白質CN5(Core, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)を発現するTgマウス(CN5マウス)を作製した。これらのマウスはpoly(I:C)投与後、Cre-loxPシステムによりインターフェロン応答性にHCV蛋白質を発現するため、正常な免疫応答で急性肝炎、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌へと進展し、ヒトと同じ病態を呈する。poly(I:C)投与3ヶ月の初期の慢性肝炎を呈するCN2雌マウスに、天然痘ワクチン株(LC16m8株)を母体としてHCV非構造蛋白質N25(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B)を発現する組換えワクシニアウイルス(rVV-N25)を皮内接種したところ、接種1週後にIL-6、TNF α などの炎症性サイトカインを産生するM2マクロファージを肝臓内から減少させることで、慢性肝炎、脂肪変性、グリコーゲン変性、肝硬変などの肝臓の病態を正常化させること、さらに接種4週後には細胞性免疫を賦活化してT細胞依存的に肝臓内HCV core抗原を特異的に排除することを見出した(Ohtsuki, T., Journal of virology., 2015)。HCVは免疫反応を誘導する樹状細胞(DC)の機能を阻害することで、CD4T細胞、CD8T細胞が正常に活性化されず、細胞性免疫の障害により持続感染が成立し、肝臓内ウイルス抗原の排除機能を阻害する事が報告されている。本来CN2蛋白質が発現すると、それに伴いCN2特異的なCD8T細胞が誘導され、core抗原を含むCN2蛋白質は排除されるが、CN2マウスのように持続的にCN2蛋白質の抗原暴露が続くとDC機能障害による細胞性免疫の抑制により、CN2特異的細胞性免疫が抑制される。rVV-N25による肝臓内HCV抗原排除効果は、N25領域が細胞性免疫の抑制を解除し、CN2特異的CD8T細胞の再賦活化に關与する事を示唆している。しかし、rVV-N25による治療ワクチン効果は、初期の慢性肝炎では強く認められるが、HCV抗原に長期暴露された後期の慢性肝炎では弱まり、さらに雌よりも雄で、CN2よりもCN5マウスでその効果がさらに弱まる事が知られていた。こうした条件でも細胞性免疫の抑制を解除して、強力に賦活化できる治療ワクチンの開発が望まれる。

2. 研究の目的

HCV抗原に長期暴露され細胞性免疫に強い抑制がかかった老齢HCV-Tgマウスでも、より強力に細胞性免疫の再賦活化を誘導し、肝臓内からウイルス抗原を排除できる治療ワクチンの作製を試みる。さらにrVV-N25の作用機序を解明するために、ウイルス抗原排除に關与するN25内のHCV遺伝子領域を同定する。

3. 研究の方法

(1) マウス

CN2マウスは、HCV構造蛋白質をコードする遺伝子を持つR6CN2HCV-Tgマウス(CN2-29^(+/+))と、インターフェロン応答性にCreを発現するMX1-Cre^(+/-)Tgマウスを交配させ、生まれた子供(Mx1Cre^(+/-)/CN2-29^(+/-))をTg checkしてMx1Cre^(+/-)のマウスを選別する。CN5マウスは、

MX1-Cre^(+/-)HCR6-RzB15^(+/-) マウスと HCR6-RzB15^(+/-) マウスを交配し、産まれた子供 (Mx1Cre^(+/-)/HCR6-RzB15^(+/-)) を Tg check して Mx1Cre^(+/-) のマウスを選別する。8 週齢の CN2 または CN5 マウスに poly(I:C) を 2 日毎に 3 回腹腔内投与して HCV 遺伝子を誘導発現し実験に使用した。

(2) DNA vaccine

HCV HCR6 株の全長ゲノム遺伝子が挿入された pBMSF7c/CN5 ベクターを鋳型として HCV 各遺伝子 (Core, E1, E2-p7, NS2, NS3-NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, CN2, N25) を PCR により増幅し、pCAGGS-Neo ベクターに挿入した。DNA sequencing により遺伝子を確認後、293FT 細胞に transfection し、HCV 蛋白質発現をウェスタンブロットで確認した。発現が確認された plasmid DNA を大量に増やし、Nucleobond Extra EF により、エンドトキシンフリーの各 plasmid DNA (pCAGGS-Neo/HCV) を精製した。使用まで -20°C で保存する。使用時に 10xPBS(-) とエンドトキシンフリー TE を加えて 1xPBS(-) にして、DNA 濃度を 2mg/ml に希釈する。

(3) rVV vaccine

PCR により HCV 構造蛋白質 CN2 または HCV 非構造蛋白質 N25 をコードする遺伝子領域を増幅させ相同組換え用ベクターに挿入する。7 日齢の雄ウサギより腎臓を採取した初代ウサギ腎細胞にワクシニアウイルスワクチン株 (LC16m8 株) を感染させ、感染後に各遺伝子領域を挿入した組換え用発現ベクターを遺伝子導入する。その後、培養後上清に産生された各遺伝子を持つ組換えワクシニアウイルス (rVV-CN2 または rVV-N25) を回収した。各 HCV 蛋白質の発現はウサギ腎細胞株 RK13 細胞に感染させ、lysate をウェスタンブロットで確認した。PRK に感染させ、大量にウイルスを増やし、Opti-pre によりウイルスを精製した。ウイルス力価を測定後、使用するまで -80°C で保存した。

(4) Prime-boost vaccination

poly(I:C) 投与後の CN2 マウスまたは CN5 マウスをケタラル/キシラジンで全身麻酔後、大腿筋部位の除毛を行い、2mg/ml pCAGGS-Neo/HCV を 50ul (100ug) i.m 投与し、エレクトロポレーションを行った。2 週間後に反対の大腿筋部位に同様に 2mg/ml pCAGGS-Neo/HCV を 50ul (100ug) i.m 投与し、エレクトロポレーションを行った。更に 2 週間後に、CN2 マウスまたは CN5 マウスをケタラル/キシラジンで全身麻酔後、マウスの背部を除毛し、 1×10^8 PFU/50 μ l の rVV-N25、rVV-CN2 または rVV-Emp (空の rVV ベクター) を 2 段針注射筒で皮内接種した。2 週間後にサンプリングを行った。

(5) 肝臓内ウイルス抗原の定量

凍結肝臓をプロテアーゼ阻害剤入り RIPA buffer 存在下でバイオマッシャーによりホモジナイズし、肝臓ライセートを作製した。肝臓ライセート中の HCV core 抗原はアーキテクト HCV Ag (SRL) により定量した。

4. 研究成果

より強く細胞性免疫を賦活化法として、同一抗原領域を母体の異なる種類のワクチン (DNA と virus vaccine 等) で免疫する prime-boost 接種法が知られている。そこで 9 ヶ月以上 HCV 抗原に長期暴露された慢性肝炎後期の老齢 CN2 または CN5 雌マウスに、CN2 または N25 領域を発現する HCV-cDNA ワクチンと rVV-HCV による prime-boost 接種を行い、肝臓内 HCV 抗原排除を指標として治療ワクチン効果を検討した。興味深いことに rVV-N25 単独接種では効果の弱かった老齢 CN2 あるいは CN5 雌マウスにおいて、N25-DNA/rVV-N25 のような同じ抗原領域をコードする DNA/rVV homologous prime-boost 接種よりも、抗原領域の異なる CN2-DNA/rVV-N25 または

N25-DNA/rVV-CN2 など heterologous prime-boost 接種した方が、より強力に細胞性免疫を賦活化し、肝臓内 HCV 抗原を排除することを見出した(図 1, 2)。実際に老齡 CN2 雌マウスでは 20-40%、老齡 CN5 雌マウスで 40-60%まで減少した。さらに HCV 抗原に 13 ヶ月暴露され強力に細胞性免疫の抑制がかかった超老齡 CN5 雄マウスに、DNA/rVV heterologous prime-boost 接種を行ったところ、N25-DNA/rVV-CN2 群で、肝臓内 HCV 抗原を 75%まで減少した(図 3)。N25 と CN2 との異なる領域での DNA/rVV heterologous prime-boost 接種を行うことで、rVV-N25 単独接種よりも強力に細胞性免疫の抑制状態を解除し、再賦活化することを新たに見出した。しかし、N25 のどの領域が細胞性免疫の抑制解除に関与しているかは不明である。そこで HCV 各遺伝子を発現する DNA ワクチンを作製して rVV-N25 あるいは rVV-CN2 との DNA/rVV heterologous prime-boost 接種を慢性肝炎後期の老齡 CN5 雌マウスに行い、細胞性免疫抑制の解除と HCV 特異的な細胞性免疫の賦活化に關与する HCV 遺伝子領域の同定を試みた。肝臓内 HCV 抗原は CN2-DNA/rVV-N25 または NS5A-DNA/rVV-CN2 接種群で有意に減少したことから、N25 内の NS5A 領域が細胞性免疫の抑制解除と賦活化に關与していることを新たに見出した(図 4)。今後は実際に DNA/rVV prime-boost 接種による HCV 特異的な細胞性免疫賦活解析のために、肝臓内免疫細胞(IHL)を分離し、FACS により IFN- γ , TNF- α , IL-2 陽性活性化 CD4, CD8 T 細胞を定量する。また N25 による細胞性免疫抑制解除に關与する既知および未知の免疫細胞集団を同定するために、DNA/rVV heterologous prime-boost 接種群と未接種群の CN5 マウスの肝臓から IHL を分離し、包括的

図 1

老齡HCV全蛋白質発現CN2マウス♀への DNA/rVV prime-boost 接種による肝臓内core抗原排除効果

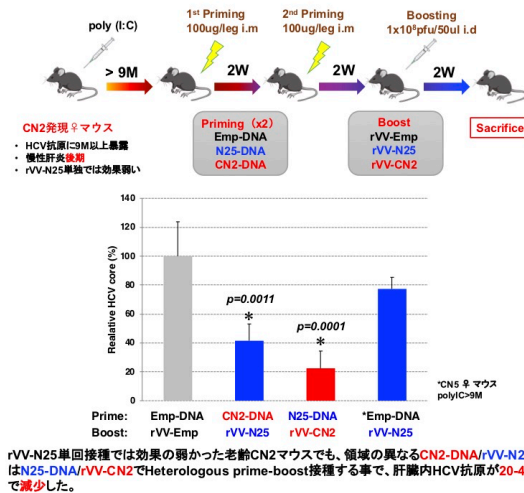


図 2

老齡HCV全蛋白質発現CN5マウス♀への DNA/rVV prime-boost 接種による肝臓内core抗原排除効果

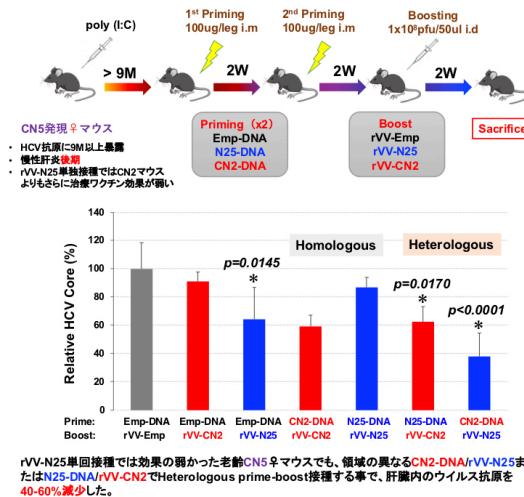
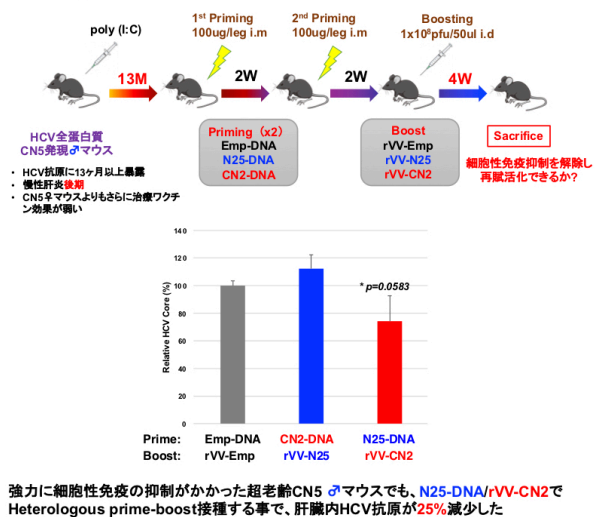


図 3

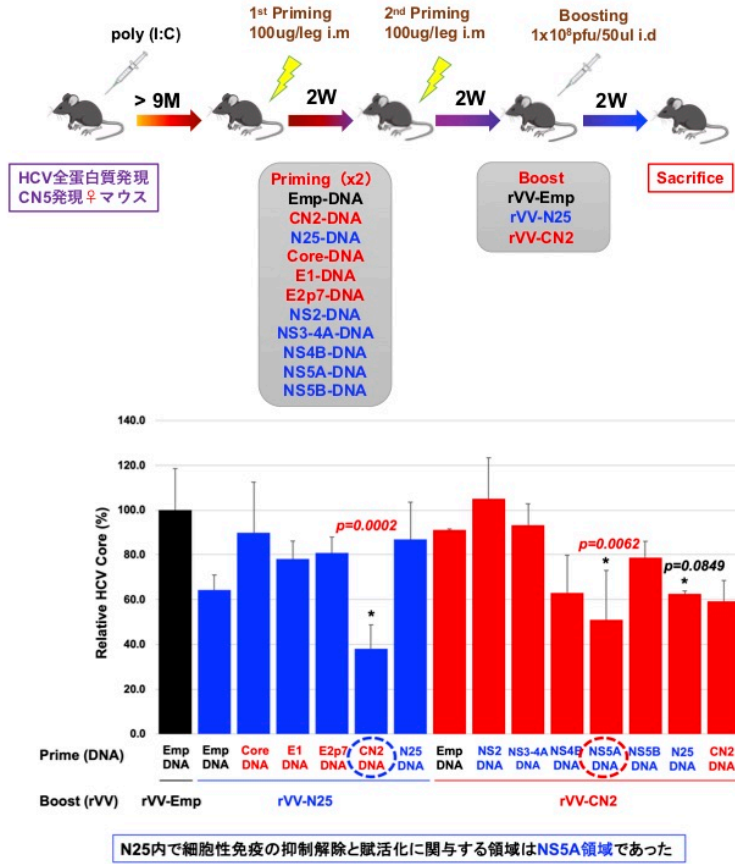
超老齡HCV全蛋白質発現CN5マウス♂への DNA/rVV prime-boost 接種による肝臓内core抗原排除効果



single-cell transcriptome 解析 (*NxI-seq* 法) を行い、免疫細胞毎に有意に増減した遺伝子を選別し、細胞性免疫解除と賦活化に関与する宿主因子を同定する (図 5)。

図 4

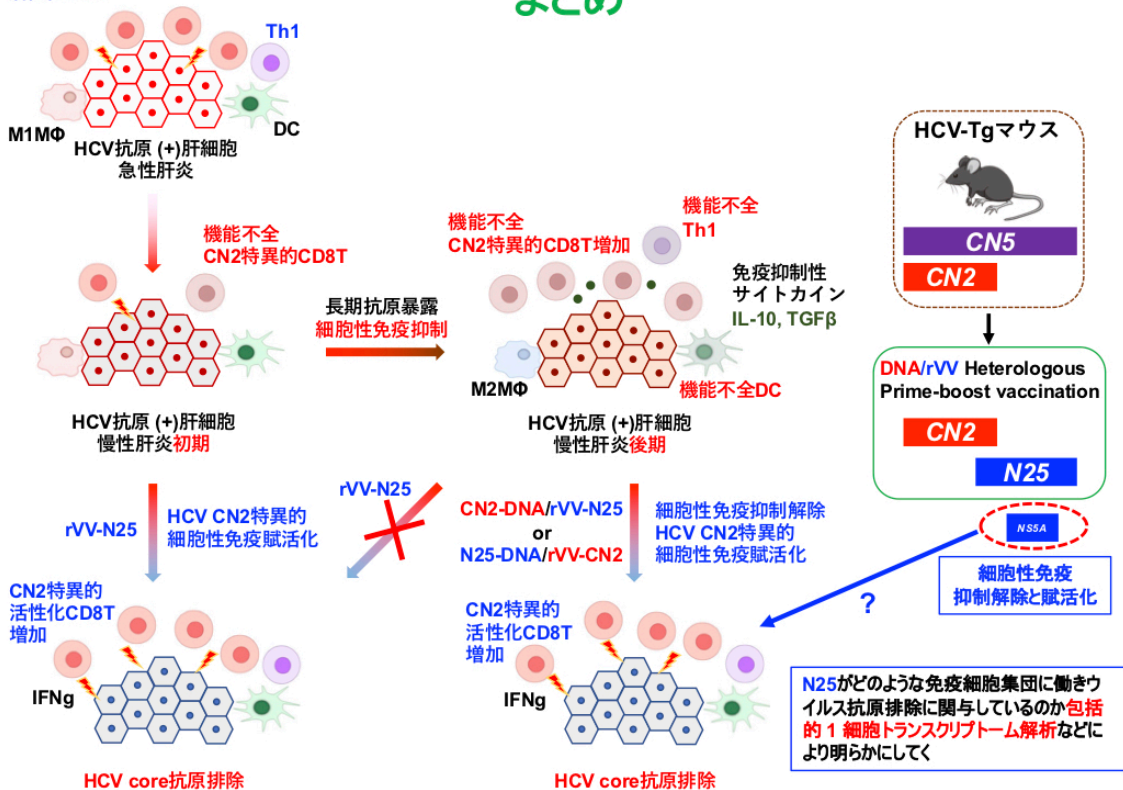
老齢CN5発現♀マウスへの DNA/rVV prime-boost vaccination



CN2特異的
活性化CD8T

まとめ

図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

1. Tokunaga Y, Osawa Y, Ohtsuki T, Hayashi Y, Yamaji K, Yamane D, Hara M, Munekata K, Tsukiyama-Kohara K, Hishima T, Kojima S, Kimura K, Kohara M. Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. Sci Rep. 23:7(1):325. 2017. 査読あり

〔学会発表〕（計2件）

1. 大槻貴博, 徳永優子, 小原道法. C型肝炎ウイルスに対する治療ワクチンの作製と作用機序の解明. 第39回日本分子生物学会年会. 2016
2. 大槻貴博, 塩釜ゆみ子, 徳永優子, 山地賢三郎, 保富康宏, 小原道法. Heterologous prime-boost 接種法によるC型肝炎ウイルス治療ワクチン効果の解析. 第21回日本ワクチン学会学術集会. 2017

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.igakuken.or.jp/infectious>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。