

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08440

研究課題名(和文)新規HBV感染症モデルを用いた治療的ワクチン療法の開発

研究課題名(英文)Development of therapeutic vaccine therapy using chronic HBV infection model

研究代表者

伊藤 弘康 (Ito, Hiroyasu)

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：80373075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性B型肝炎ウイルス(HBV)感染症モデルであるHBVトランスジェニックマウスを用いてポリアミン(スペルミジン：SPD)のアジュバンド増強効果について検討を行った。HBs抗原+cGAMP(STINGリガンド)にて野生型(WT)マウスおよびHBVトランスジェニック(HBVTg)マウスに対して免疫を行ったところ、スペルミジン投与によりHBs抗原特異的な液性および細胞性免疫応答の増強がみられた。さらに、HBVTgマウスでは免疫後肝内および血清中のHBs抗原量が有意に低下した。以上より、スペルミジンはアジュバンド効果を増強し、慢性HBV感染症に対する新たな治療に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、慢性HBV感染症に対する治療として核酸アナログ製剤が使用されているが、HBVを完全に排除できる可能性は低く、新規治療法の開発が期待されている。本研究では、慢性HBV感染症患者と同様にHBVに対する免疫応答が減弱しているHBVTgマウスにおいてもアジュバンドとスペルミジンの併用投与によりHBV特異的な免疫応答の増強が確認できHBs抗原量の低下も認められた。したがって、本研究により未だウイルスの完全な排除が困難である慢性HBV感染症に対する新たな治療戦略の開発に繋がる知見が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the adjuvant enhancing effect of polyamine (spermidine: SPD) using HBV transgenic mice, which is a model of chronic hepatitis B virus (HBV) infection. HBsAg + cGAMP (STING ligand) was used to immunize wild-type (WT) mice and HBV transgenic (HBVTg) mice. The administration of spermidine significantly enhanced HBsAg-specific humoral and cell-mediated immune responses after the immunization with HBsAg + cGAMP. Furthermore, the amount of HBs antigen in the liver and serum after immunization was significantly reduced in HBVTg mice. These results suggest that spermidine enhances the adjuvant effect and may lead to new treatments for chronic HBV infection.

研究分野：肝臓病学

キーワード：HBV ワクチン療法

## 1. 研究開始当初の背景

慢性 HBV 感染症では、慢性肝炎、肝硬変、肝臓がんへと病態は進行し、肝臓がんまで進展すると予後不良となる。したがって、できるだけ早期に病態の進行を止めることが重要であり、そのためには HBV の排除が必要となるが、現在のところ HBV を完全排除できる治療法は確立されていない。このように慢性 HBV 感染症に対する十分な治療開発が困難である原因のひとつとして小動物での HBV 感染モデルが確立されていないことが挙げられる。現在、申請者らは新規 HBV 感染マウスモデルの作製を試みている。実験動物研究所の末水(研究協力者)より供与された肝特異的に Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase(HSV-TK)が発現する遺伝子可変マウスを用いて、ガンシクロビル(GCV)を投与することにより、肝細胞の脱落を誘導し、そこへ HBV トランスジェニックマウス(HBV-Tg)から採取した肝細胞を経脾臓的に投与し、肝臓で再構成させることにより、HBV 感染モデルを作製している(Kanbe A., et al. J Gastroenterol Hepatol. 2021 Mar;36(3):782-789)。本モデルでは、宿主免疫系が正常であり、さらに HBV-Tg マウスとは違い HBV に対する免疫学的な寛容状態ではないことが利点である。本モデルを使用すれば、従来のモデルマウスに比べてヒトにおける HBV 感染症と同じような解析が可能であると考えられる。以前より、治療的ワクチン療法が他の薬剤との組み合わせにより行われてきたが、十分な成果が得られているとは言い難い。近年、ワクチンアジュバンドとして Stimulator of Interferon Genes (STING)のリガンドである cGAMP が注目されている。我々は、その cGAMP が HBV ワクチン療法において強力なアジュバンド効果があることを報告した(Ito H, et al. Virology. 2019 May;531:233-239)。また、免疫チェックポイント阻害剤の登場により主に進行癌を対象として多数の免疫治療の検証が行われており、宿主免疫系の様々な修飾が可能となってきた。さらに、ポリアミン(スペルミジン)の投与がオートファジーを活性化し宿主免疫応答の回復に寄与することも示唆されている(Elife. 2014 Nov 11;3:e03706)。しかしながら、これらの新規免疫修飾剤が慢性 HBV に対して効果があるかは不明である。

## 2. 研究の目的

慢性 HBV 感染モデルである HBVTg マウスを用いてスペルミジンのアジュバンド効果への影響について検討した。

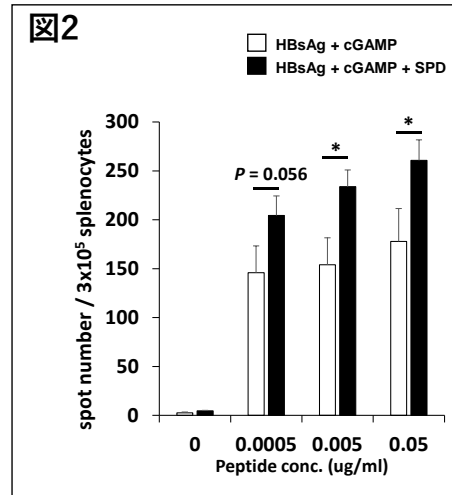
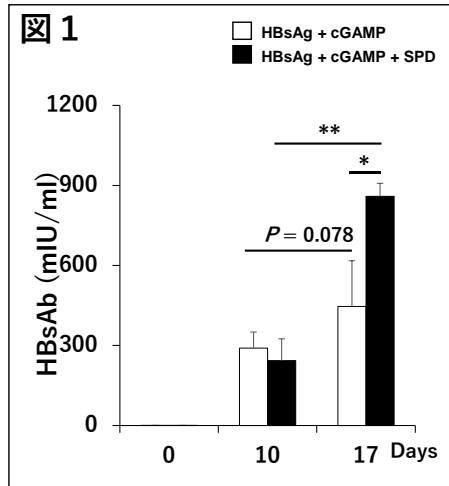
## 3. 研究の方法

野生型(WT)マウス(B10D2)および HBVTg マウスを使用した。それぞれのマウスに対し、HBs 抗原+cGAMP(STING リガンド)により免疫を 2 回または 3 回行った。SPD の投与は免疫と同時に自由飲水による経口投与により行った。HBs 抗原特異的な液性免疫誘導の評価のため血清中の HBs 抗体濃度の測定を随時行った。HBs 抗原特異的な細胞性免疫応答の評価として ELISPOT 法による HBs 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生能にて評価した。また、フローサイトメトリー法によりメモリー T 細胞の出現頻度や活性化マーカーの発現頻度を検討した。HBVTg マウスにおいて、免疫後、肝組織を採取し組織学的検討を行った。通常の HE 染色により炎症の程度を評価し、HBs 抗原の免染を行い肝内での HBs 抗原量の変化を観察した。HBs 抗原量に関しては、血清の HBs 抗原濃度も測定し検討した。

#### 4. 研究成果

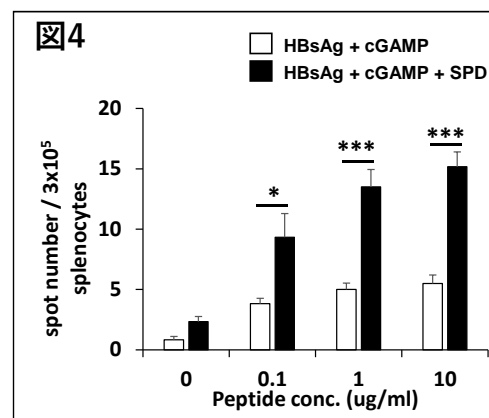
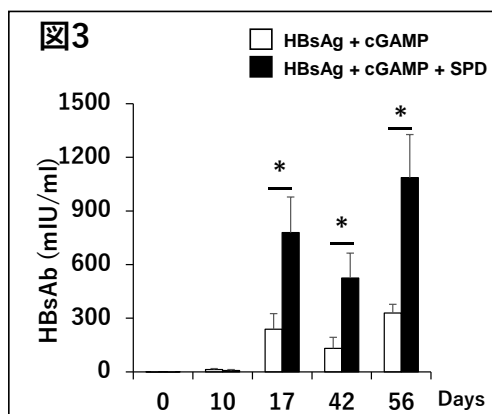
##### (1) WT マウスでの SPD のアジュバンド効果に対する影響

WT マウスに HBs 抗原および cGAMP を皮下投与することにより免疫を行った。免疫は 2 回行った。SPD は初回免疫の 3 日前より自由飲水により経口投与した。図1のように 1 回免疫後では血清中の HBs 抗体量に SPD 投与の影響は認められなかったが、2 回免疫後では、明らかに SPD 投与により HBs 抗体量は増加した。HBs 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生能の評価のため行った ELISPOT アッセイでは、SPD により Sopt 数が増加し、SPD による抗原特異的な細胞性免疫応答の増強が示唆された(図2)。



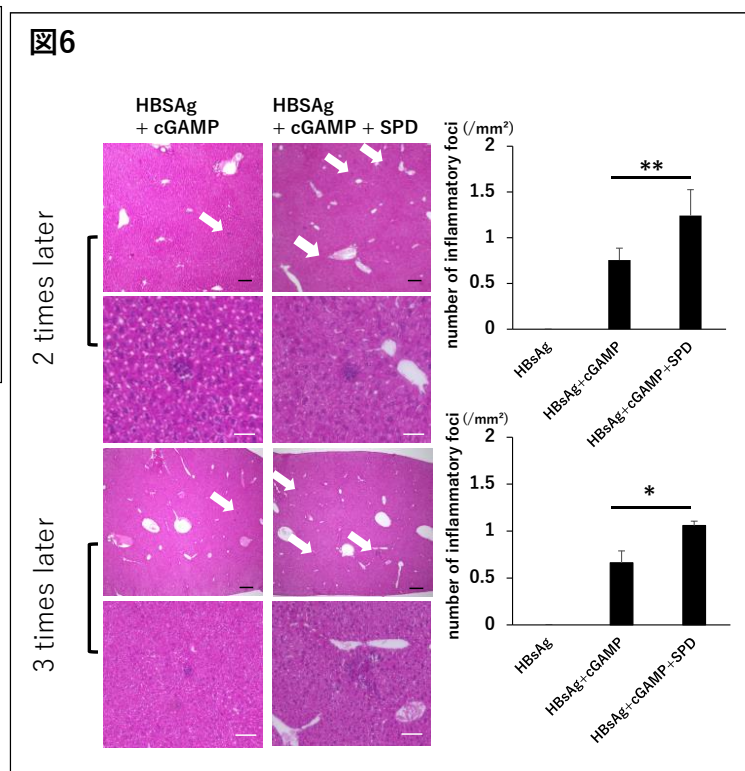
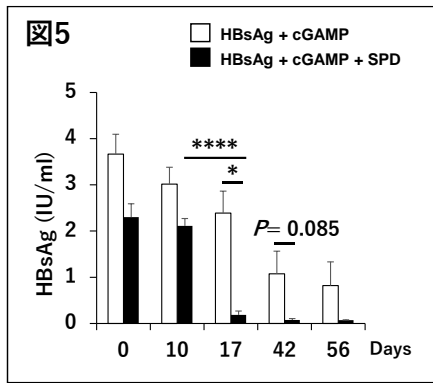
##### (2) HBVTg マウスでのアジュバンド効果の影響

HBVTg マウスに HBs 抗原および cGAMP を皮下投与することにより免疫を行った。免疫は、day 0、day 10、day 42 の計 3 回行った。SPD は初回免疫の 3 日前より自由飲水により経口投与した。HBVTg マウスにおいても免疫 2 回後から血清中の HBs 抗体の増加が SPD 投与群で顕著にみられ、3 回免疫後も SPD 非投与群に比べ有意な増加が認められた(図3)。ELISPOT による HBs 抗原特異的 IFN- $\gamma$  産生能の評価を行ったところ、SPD 投与群で有意に Sopt 数の増加が認められ、HBVTg マウスにおいても SPD 投与により HBs 抗原特異的細胞免疫応答の増強が示唆された(図4)。



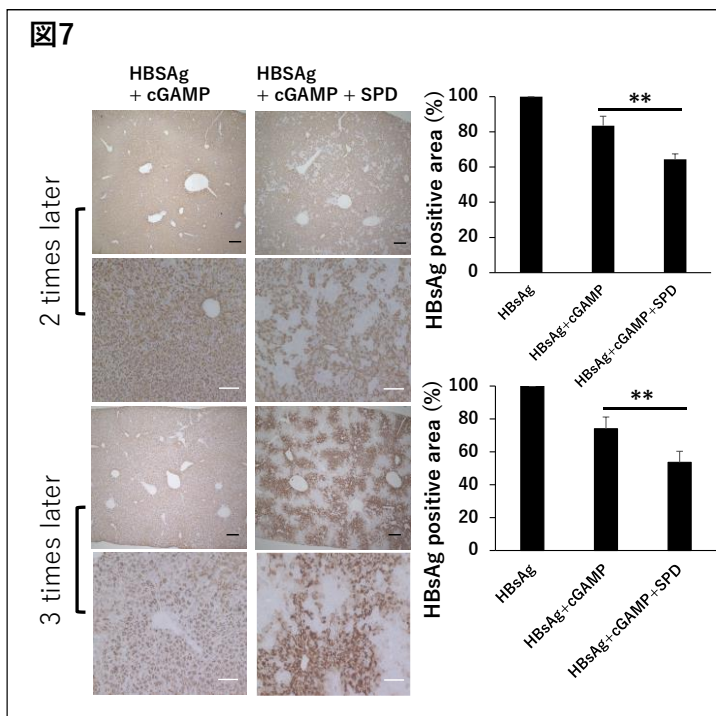
次に、血清中の HBs 抗原量を検討した。図5に示すように、SPD 投与群では 2 回目の免疫後 7 日で顕著に HBs 抗原量の低下が認められた。この低下は、初回免疫後 56 日間継続してみられた。肝組織を用いた組織学的検討では、HE 染色において炎症巣の増加が 2 回免疫後も 3 回免疫後にも認められたが、その数は SPD 投与群で有意に増加しており、3 回免疫後では比較的大きな炎症巣もみられた(図 6)。HBs 抗原の肝組織を用いた免疫染色では、免疫後、肝内での HBs 抗原量は低下したが、SPD 投与群ではその低下が顕著であった(図 7)。

なお、図1～図7までの結果は未発表のデータである。



### (3) 考察・まとめ

野生型マウスを用いた検討では明らかに HBs 抗原特異的液性免疫応答および細胞性免疫応答の増強が SPD 投与群で認められた。SP 投与および HBs 抗原のみでの免疫では HBs 抗原単独免疫と比べ免疫応答に差がないため、SPD 投与によるアジュバンド効果の増強が考えられた。この結果は、HBVTg マウスにおいても同様であった。HBVTg マウスは HBV 関連タンパクに対し免疫学的な寛容状態であるが、これは、ヒトの慢性 HBV 感染症と類似している。以前、HBs 抗原とアジュバンドとして cGAMP を使用した際に HBVTg マウスにおいても HBs 抗原特異的液性免疫応答および細胞性免疫応答の増強がみられたが、今回の検討により、SPD がさらにその免疫応答を増強させることが示唆された。また、血清中の HBs 抗原濃度および免疫での肝臓内で



の HBs 抗原が SPD 投与により有意に低下したことにより HBV の制御にも寄与する可能性が示唆された。現在、ヒトにおける慢性 HBV 感染症では、HBs 抗原の低下が治療目標の一つになっており、今回得られた知見は重要であると考えられた。SPD のアジュバンド効果の増強は認められたが、そのメカニズムは明らかになっておらず今後はその解析を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanbe Ayumu, Ishikawa Tetsuya, Hara Akira, Suemizu Hiroshi, Nanizawa Eri, Tamaki Yuki, Ito Hiroyasu	4. 巻 36
2. 論文標題 Novel hepatitis B virus infection mouse model using herpes simplex virus type 1 thymidine kinase transgenic mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 782 ~ 789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.15142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤弘康、石川哲也
2. 発表標題 HBVキャリアマウスを用いた核酸製剤による治療的ワクチン療法の開発
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 哲也  (Ishikawa Tetsuya)  (10288508)	名古屋大学・医学系研究科(保健)・教授    (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------