

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16680

研究課題名（和文）HBs-L抗原を用いた新規B型肝炎ウイルスワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of HBs-L based vaccine against Hepatitis B virus

研究代表者

真田 崇弘（SANADA, Takahiro）

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主任研究員

研究者番号：60721272

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）：HBs-L抗原の免疫原性を高めるために、二種類の遺伝子型のHBs-L抗原を組み合わせたHBs-L hybrid (Lh)抗原の評価を行ったところ、各遺伝子型のHBs-L抗原よりもHBs-Lh抗原は、preS1、preS2、およびS、いずれの領域に対して強く抗体誘導がみられた。さらには各遺伝子型のHBVに対してもHBs-Lh免疫により最も強く中和抗体の誘導がみられた。以上の結果からHBs-Lhが新たなワクチンとなりうる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、L抗原、さらにはLh抗原が現行ワクチンで使用されているS抗原よりも強い免疫原性を有していることが明らかとなった。特に、Lh抗原はいずれの遺伝子型に対しても強い中和抗体誘導能を示しており、本研究を進めることで、新規ワクチン開発へと繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：To enhance the immunogenicity of HBs-L, HBs-L hybrid (HBs-Lh) protein composed of two genotypes was evaluated. Antibody level induced by HBs-Lh immunization showed high against not only S, but also pre-S1 and pre-S2 domains. Additionally, HBs-Lh immunization induced significantly stronger cross-reactive neutralizing antibodies compared to HBs-S or HBs-L of each genotype. These findings suggest that HBs-Lh could be a candidate of prophylactic HBV vaccine.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV B型肝炎 ワクチン HBs-L 経鼻免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

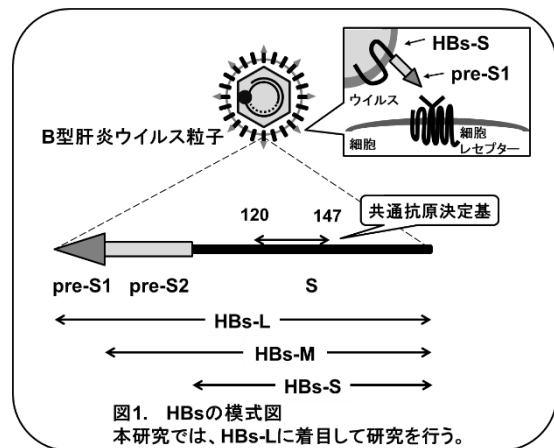
1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は、ヒトに持続感染することで、慢性的な肝炎を引き起こし、やがては肝硬変・肝細胞癌を引き起こす。全世界において約3億5千万人も慢性HBV感染者がいると考えられているが、いまだB型肝炎を根治する治療法は存在しておらず、公衆衛生学上重要な問題となっている。

HBV感染に対する予防ワクチンは既に存在しているものの、解決すべき課題も存在している。一つめは、ワクチン不応答者の存在である。透析患者などの免疫不全者だけでなく、健常者においてもワクチン接種後に抗体が獲得されない不応答者が5-10%いるとされ、特にウイルスに曝露される危険性の高い医療従事者にとっては重要な問題となっている。二つめは、時間の経過とともに抗体価が低下してしまうことである。三つめは、ワクチンエスケープ変異株の存在である。以上のことから、強い免疫反応の誘導およびワクチンエスケープ変異株への対策が急務となっている。

HBVの外殻を形成するタンパク質はHBsタンパク質で、長さによってHBs-small (S)、HBs-medium (M)、HBs-large (L)の3種類に分けられる(図1)。現行ワクチンではHBs-Sが使用されている。

しかし、Sにおける中和に関与する領域は共通抗原決定基とされる一部のみで、この領域内に変異が入ると、ワクチンエスケープ変異株となる。本研究では、免疫原としてHBs-Lに着目した。HBs-LはSに加えて、pre-S1、pre-S2を含んだタンパク質である。pre-S1は細胞のレセプター分子との接着する領域であるため、本領域の抗体を誘導することで、さらなる中和抗体の増強およびワクチンエスケープ変異株への中和効果が期待される。pre-S2に関しても、抗pre-S2抗体は中和能を有していることが知られている。HBs-Lを免疫することで、pre-S1、pre-S2、S全ての領域に対して抗体を誘導し、より強力な中和抗体を誘導できることが期待される。



先の研究において、HBs-Lを粘膜での保持性を高めるゲル基剤であるカルボキシビニルポリマーと共に経鼻免疫したところ、高い中和抗体価、粘膜免疫に関わるIgA抗体の誘導、pre-S1領域に対する抗体の誘導がみられ、HBs-Sや皮下接種に比べて強い抗体応答を示した。

これらの結果から、HBs-Lは強い免疫原性を持ち、IgG抗体や抗pre-S1抗体の誘導など現行ワクチンを上回るメリットを持つ可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究では、HBs-SやHBs-L接種による免疫応答を解析することで、HBsに対する免疫機構を明らかにし、さらにはウイルス感染防御能を評価することでHBVの新たな予防ワクチンの開発へと繋げることである。

3. 研究の方法

(1) 中和試験の評価

まずは感染防御能を評価する中和試験の確立・評価を行った。培養細胞を用いたHBVに対する中和試験は構築していたが、本試験による中和抗体価と臨床で評価される抗HBs抗体価は相

関しているとは言えず、中和抗体価が *in vivo* レベルでの感染防御を反映したものかは不明だった。そこで、ヒト肝臓置換キメラマウスを用いて、中和抗体価陽性および陰性の血清と混合したウイルス液を接種し、その後のウイルスの増殖を評価することで、生体における感染防御能を評価した。

(2) HBs-L hybrid (Lh) の評価

HBs-L の免疫原性を高めるために、2 種類の遺伝子型の HBs-L から構成される HBs-Lh の評価を行った。HBs-S、各遺伝子型 (A-D) の HBs-L および HBs-Lh をマウスに免疫し、ELISA やウイルスを用いた中和試験により免疫応答の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 中和試験の評価

中和試験にて中和抗体価を測定し、陽性もしくは陰性であったヒト血清と混合したウイルスをヒト肝臓置換キメラマウスに感染させ、その後のウイルスの増殖の有無を解析した。その結果、中和抗体価陽性血清はキメラマウスにおいてもウイルス増殖を阻害した一方で、陰性血清ではキメラマウスにおけるウイルス増殖は阻害されなかった (図 2)。また抗 HBs 抗体価とキメラマウスへの感染阻害効果

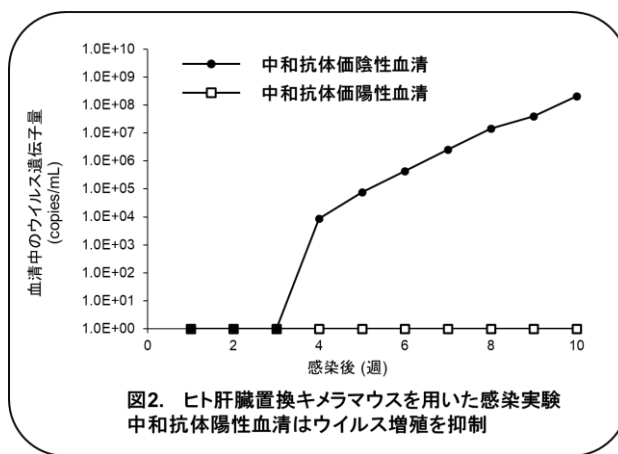


図2. ヒト肝臓置換キメラマウスを用いた感染実験
中和抗体陽性血清はウイルス増殖を抑制

は一致していなかった。このことから、これまで臨床で評価されてきた抗 HBs 抗体価では HBV に対する感染防御効果を反映しているとは言えず、中和試験による評価の必要性が示された。

(2) HBs-L hybrid の評価

HBs-S、遺伝子型 A-D の HBs-L、HBs-Lh 免疫によって誘導される抗体応答を評価したところ、HBs-S 免疫では S に対する抗体誘導のみが見られたのに対して、各遺伝子型の HBs-L および HBs-Lh 免疫では pre-S1、pre-S2、S いずれの領域に対しても抗体産生がみられ、なかでも HBs-Lh 抗原が最も強い誘導がみられた。さらには、各遺伝子型の HBV に対する中和試験を行ったところ、いずれの遺伝子型に対しても HBs-Lh が最も高い中和抗体価を誘導できていることが明らかとなった

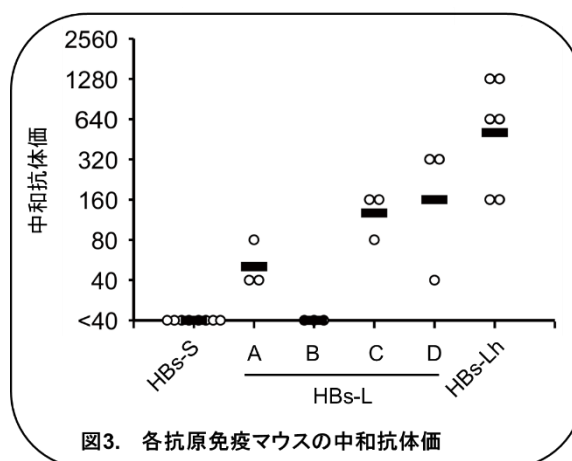


図3. 各抗原免疫マウスの中和抗体価

(遺伝子型 C: 図 3)。さらにはワクチンエスケープ変異株に対しての中和能を評価したところ、HBs-Lh 免疫は有効であった。

以上の結果から、HBs-Lh は現行ワクチンで使用されている HBs-S や各遺伝子型の HBs-L よりも高い免疫原性を持つことが示された。HBs-Lh が現行ワクチンが抱える問題点を克服できる新たなワクチンとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Sanada Takahiro, Kohara Michinori, Tsukiyama-Kohara Kyoko	4. 巻 13
2. 論文標題 Tree Shrew as an Emerging Small Animal Model for Human Viral Infection: A Recent Overview	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13081641	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Honda Tomoko, Gomi Sumiko, Yamane Daisuke, Yasui Fumihiko, Yamamoto Takuya, Munakata Tsubasa, Itoh Yasushi, Ogasawara Kazumasa, Sanada Takahiro, Yamaji Kenzaburo, Yasutomi Yasuhiro, Tsukiyama-Kohara Kyoko, Kohara Michinori	4. 巻 6
2. 論文標題 Development and Characterization of a Highly Sensitive NanoLuciferase-Based Immunoprecipitation System for the Detection of Anti-Influenza Virus HA Antibodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.01342-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hai-Ying Chi, Tanaka Yuki, Hifumi Tatsuro, Shoji Koichiro, Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Hashem Md Abul, Kitab Bouchra, Sanada Takahiro, Fujiyuki Tomoko, Yoneda Misako, Hatai Hitoshi, Yabuki Akira, Miyoshi Noriaki, Kai Chieko, Kohara Michinori, Tsukiyama-Kohara Kyoko	4. 巻 15
2. 論文標題 Pathological and genetic aspects of spontaneous mammary gland tumor in Tupaia belangeri (tree shrew)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0233232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sanada Takahiro, Yamamoto Naoki, Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Tsukiyama-Kohara Kyoko, Hasegawa Hideki, Miyazaki Takashi, Takano Jun-ichiro, Shiogama Yumiko, Yasutomi Yasuhiro, Goh Yasumasa, Yoshida Osamu, Hiasa Yoichi, Kohara Michinori	4. 巻 520
2. 論文標題 Intranasal vaccination with HBs and HBc protein combined with carboxyl vinyl polymer induces strong neutralizing antibody, anti-HBs IgA, and IFNG response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 86 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sanada Takahiro, Tsukiyama-Kohara Kyoko, Shin-I Tadasu, Yamamoto Naoki, Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Yamane Daisuke, Takano Jun-ichiro, Shiogama Yumiko, Yasutomi Yasuhiro, Ikeo Kazuho, Gojobori Takashi, Mizokami Masashi, Kohara Michinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Construction of complete Tupaia belangeri transcriptome database by whole-genome and comprehensive RNA sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-48867-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kayesh Mohammad Enamul Hoque, Hashem Md Abul, Sanada Takahiro, Kitab Bouchra, Rashid Md Haroon Or, Akter Lipi, Ezzikouri Sayeh, Murakami Shuko, Ogawa Shintaro, Tanaka Yasuhito, Kohara Michinori, Tsukiyama-Kohara Kyoko	4. 巻 2
2. 論文標題 Characterization of innate immune response to hepatitis B virus genotype F acute infection in tree shrew (Tupaia belangeri) model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fviro.2022.926831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshida Osamu, Akbar Sheikh Mohammad Fazle, Imai Yusuke, Sanada Takahiro, Tsukiyama Kohara Kyoko, Miyazaki Takashi, Kamishita Taizou, Miyake Teruki, Tokumoto Yoshio, Hikita Hayato, Tsuge Masataka, Shimizu Masahito, Al Mahtab Mamun, Aguilar Julio Cesar, Guillen Gerardo, Kohara Michinori, Hiasa Yoichi	4. 巻 53
2. 論文標題 Intranasal therapeutic vaccine containing HBsAg and HbcAg for patients with chronic hepatitis B; 18 months follow up results of phase IIa clinical study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 196 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sanada Takahiro, Yoshida Osamu, Hiasa Yoichi, Kohara Michinori	4. 巻 -
2. 論文標題 HBs-S antigen-dependent enhancement of HBV infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.06.07.495222	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sanada T, Kayesh MEH, Tsukiyama-Kohara K, Hasegawa H, Goh Y, Miyazaki T, Kohara M.
2. 発表標題 HBs-large hybrid protein vaccination via intranasal route with carboxyl vinyl polymer rapidly induced strong neutralizing antibody and anti-HBs IgA.
3. 学会等名 2019 AASLD THE LIVER MEETING. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sanada T, Tsukiyama-Kohara K, Shin-I T, Yamamoto N, Kayesh MEH, Kohara M.
2. 発表標題 Construction of genomic and transcriptomic database of the tree shrew (<i>Tupaia belangeri</i>), which is a small animal model of HBV infection.
3. 学会等名 2019 International HBV Meeting: The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sanada T, Tsukiyama-Kohara K, Shin-I T, Yamamoto N, Kayesh MEH, Kohara M.
2. 発表標題 Construction of genomic and transcriptomic database of the tree shrew (<i>Tupaia belangeri</i>), which is a small animal model of HBV infection.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト https://www.igakuken.or.jp/infectious/

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------