

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790384

研究課題名 (和文) C型肝炎ウイルスの持続感染機序の解明

研究課題名 (英文) Persistent infection of Hepatitis C Virus

研究代表者

関口 敏 (SEKIGUCHI SATOSHI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員

研究者番号：10462780

研究成果の概要 (和文)：我々は任意の時期にC型肝炎ウイルス (HCV) の遺伝子をスイッチング発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) を樹立し、その病態解析を行った。また、HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルス (HCV-RVV) を作製し、慢性肝炎状態の Tg マウスに単回皮下接種したところ、慢性肝炎症状の改善および HCV 蛋白の減少が認められた。このことから、HCV の排除及び肝炎抑制を目指した治療ワクチンの開発が期待される。

研究成果の概要 (英文)：We generated immunocompetent HCV persistent infection model mice. Using the new model mice, we examined whether HCV recombinant vaccinia viruses (HCV-RVV) could be used as therapeutic vaccines. HCV-RVV cured the pathological changes in mice liver. These results suggest that HCV-RVV could be used as therapeutic vaccine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：持続感染、免疫寛容、自己免疫

## 1. 研究開始当初の背景

HCV 感染症における大きな特徴は感染者のほとんどが持続感染化することと、それに伴って起こる肝発癌である (Kiyosawa et al. Hepatology. 1990)。これまで HCV 感染ヒト肝臓組織では HCV が持続的に複製し、特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) が誘導されているにもかかわらず、ウイルス感染細胞が完全には排除されないことが知られて

いる (Chisari FV J Clin Invest. 1997)。このことから持続感染が成立する理由の一つとして HCV に対して宿主側が免疫寛容状態になっていることが推測され、持続感染機序の解明には C 型肝炎発症動物モデルを用いて解析を行う必要性が示された。

## 2. 研究の目的

我々は免疫寛容を破綻させる目的でスイッ

チング発現後に獲得した免疫寛容状態にある Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスに、正常マウス由来の脾細胞を移入したところ、HCV 蛋白量が減少することを見出した。このことは移入したナイーブな免疫担当細胞によって免疫寛容が破綻したことを示唆する興味深い結果である。そこで本研究では以下の解析により HCV がいかにして免疫監視機構を回避し、持続感染化を成立させているかを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

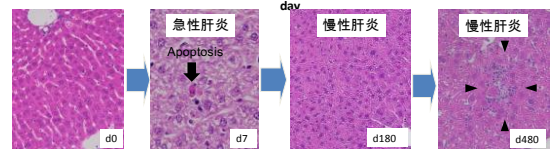
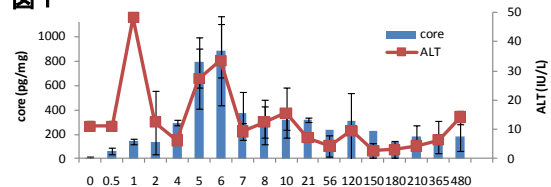
- (1) 免疫寛容状態の Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスに、様々な細胞集団に分画した正常マウス由来のナイーブ脾細胞を移入することで、どの免疫担当細胞が HCV 排除に必須かを同定する。
- (2) (1)の結果により同定された正常マウス由来の細胞（応答細胞）と、免疫寛容状態の Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスの脾細胞を共培養し、応答細胞の増殖能や炎症性サイトカイン産生能を経時的に解析することで免疫担当細胞間のクロストークによる免疫応答反応を明らかにする。
- (3) (2)と同様に共培養した応答細胞を、免疫寛容状態の Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスに移入し、個体レベルで免疫寛容化への影響を明らかにする。
- (4) (3)HCV 蛋白質組み換えワクチンウイルス (HCV-RVV) で免疫した正常マウス脾細胞を免疫寛容状態の Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスに移入し、HCV-RVV による細胞性免疫誘導効果を明らかにする。
- (5) 近年、免疫寛容が成立する原因の一つに、活性化T細胞の免疫抑制分子である PD-1 が注目されている。PD-1 は抑制性の B7 レセプターで、T細胞に表出される。最近、ウイルスの持続感染で抗原刺激が持続すると、CD8 陽性 T細胞は PD-1 分子を表出するようになり、免疫不応答に陥ることが報告されている (Barber et. al. Nature. 2006)。そこで、Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスにおける CD8 陽性 T細胞の PD-1 の発現量の解析や PD-1 阻害実験による免疫寛容の破綻を試みることで、PD-1 の免疫寛容化への関与を明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) 我々は Cre/loxP システムで HCV 遺伝子を導入したトランスジェニック

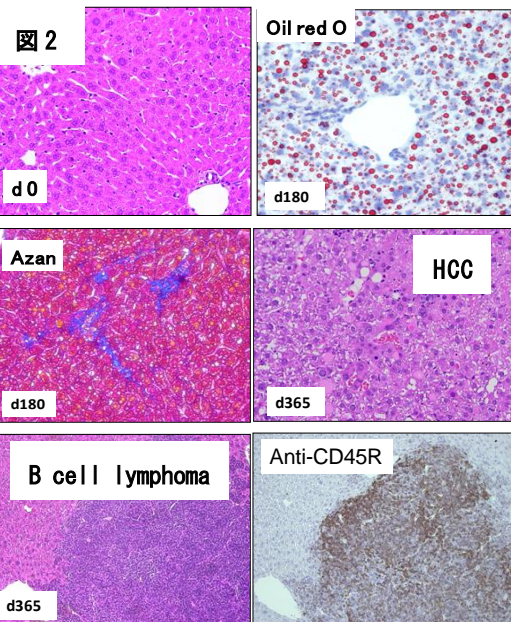
(Cre/loxP/HCV-Tg) マウスと、IFN 誘導性の Cre を発現するトランスジェニック (Mx-Cre-Tg) マウスを交配させることにより、任意の時期に HCV 遺伝子をスイッチング発現するトランスジェニック (Cre/loxP/HCV-MxCreTg) マウスを作製した。Poly (I:C) 投与により発現させた肝臓内の HCV 蛋白は、完全に排除されることなく、600 日以上持続的な発現が確認された (図 1)。

図 1

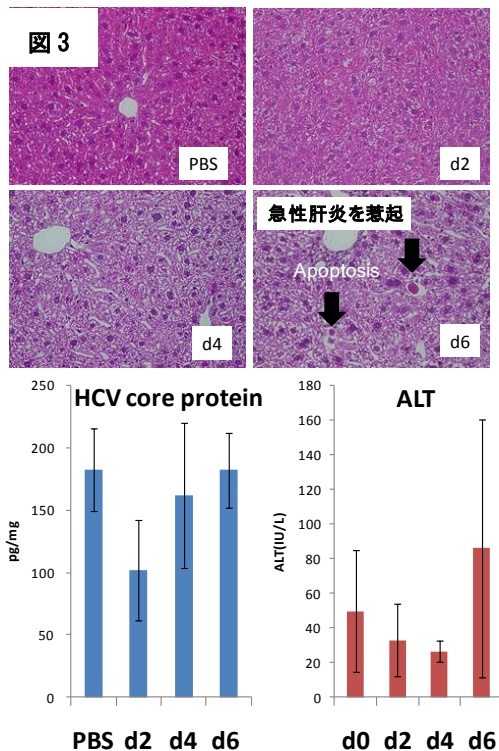


形態学的にはスイッチ後 6~7 日で壊死を伴う比較的高度の炎症細胞浸潤が認められ、その後、門脈域を中心とした弱い炎症反応が持続的にみられた。他の病態としては肝細胞の膨化、脂肪変性、グリコーゲン変性、肝細胞索の乱れ、線維化、肝細胞癌 (HCC) および B 細胞性リンパ腫 (B cell lymphoma) などがみられた。脂肪変性に関してはスイッチ後 21 日から認められた。以上より、スイッチング発現システムを樹立したことにより、発生段階での HCV 遺伝子の発現はなくなり、胎仔に影響を与えることなく HCV 感染に似た免疫反応状態をつくることのできた (図 2)。

- (2) Cre/loxP/HCV-MxCreTg マウスが完全に



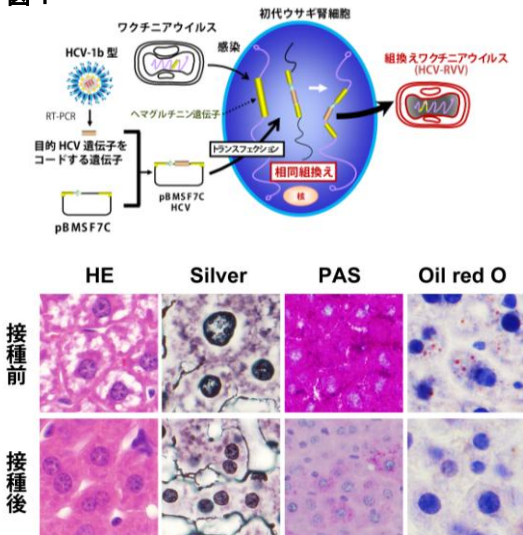
HCV 蛋白を排除できない理由として、宿主の免疫系が機能不全にあることが考えられる。そこで我々は持続発現している肝臓内の HCV 蛋白を排除する目的で、Wild-type マウスから調整したナイーブ脾細胞を慢性肝炎状態の Cre/loxP/HCV-MxCreTg マウスに移入した。その結果、移入後 2 日目で肝臓内の HCV 蛋白が一過性に減少した。FACS 解析の結果、2 日目ではレシピエント (Cre/loxP/HCV-MxCreTg) 側の IFN $\gamma$  産生 NK 細胞が増加していることがわかった。そこでレシピエント側の NK 細胞を枯渇させる目的で、TM-b 1 抗体を予め処理した Cre/loxP/HCV-MxCreTg マウスにナイーブの脾細胞を移入した。その結果、2 日目の HCV 蛋白の減少がみられなかったことから、HCV 蛋白の制御にはレシピエント側の NK 細胞が重要であることがわかった。また、移入後 6 日目ではドナーおよびレシピエント側の NK 細胞、NKT 細胞、CD8+T 細胞の増加が認められた。組織学的には 6 日目の肝臓でアポトーシス細胞が散見された。さらに、6 日目では ALT の上昇もみられた。しかしながら、HCV 蛋白の発現量に変化はみられなかった。このことから、移入後 6 日目では免疫応答を惹起できるが、HCV 蛋白に対する免疫応答が不十分なため、HCV 蛋白の排除には至らなかったことが考えられた。以上より、持続発現状態における Cre/loxP/HCV-MxCreTg マウスの免疫系は HCV 蛋白に対し、可逆的な機能不全であることが示唆された(図 3)。



(3) C型肝炎は日本で200万人に及ぶ患者があり、唯一の有効な抗HCV薬とされているインターフェロンは、30-40%程度の患者にしか治療効果が認められず、病態の進行した患者や高齢者には適用できないことから、より安全で効果的な治療法の開発が急務となっている。我々はIIの結果から、より効果的に宿主の免疫応答を惹起する目的で、哺乳動物細胞において複製可能な弱毒ワクチニアウイルス「LC16m 8株」を母体としたHCV遺伝子組換えワクチニアウイルス(HCV-rVV)株を作製した(図4)。HCV-rVVはHCVの構造蛋白質を主に発現するrVV-CN2、非構造蛋白質を発現するrVV-N25、全蛋白質を発現するrVV-CN5を用いた。これらHCV-rVVの治療効果を評価するために、HCV蛋白を持続的に発現した慢性肝炎状態のCre/loxP/HCV-MxCreTgマウスに単回皮下接種し、接種後1週および4週のマウス肝臓におけるHCV蛋白の発現量と形態学的、生化学的および免疫学的検索を行った。接種後1週目ではHCV蛋白発現量に変化はみられなかったものの、rVV-N25群の肝臓において壊死性細胞浸潤、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性といった慢性肝炎の病態の正常化が認められた。血清中の炎症性サイトカインの変化を経時的にみると、接種後6~7日目では上昇していた炎症性サイトカインレベルがrVV-N25群では正常マウスレベルにまで戻っていたことがわかった。さらに、抗炎症性サイトカインであるPDGFやTGF- $\beta$ などはコントロール群(LC16m8)に比べ上昇していることがわかった。さらに、4週目のrVV-N25接種群では形態異常の正常化に加え、肝臓内のHCV蛋白の減少がみられた。FACS解析により、4週目のrVV-N25接種群では肝臓内のCD8+T細胞が増加していることがわかった。そこで抗CD8抗体および抗CD4抗体を予め投与した状態のマウスにrVV-N25を接種すると、どちらもHCV蛋白の減少はみられなかった。このことから、rVV-N25のHCV蛋白の制御にはCD4およびCD8+T細胞が重要であることが示唆された。しかし、肝臓の形態異常は抗CD8抗体および抗CD4抗体を投与したにも関わらず正常化していたことから、病態形成とHCV蛋白排除は別のメカニズムであることが考えられた。また肝臓内HCV蛋白の制御に関して、CTLなどによるHCV発現細胞の排除を検討するために、肝臓のHCV遺伝子のスイッチン

グ効率および HCV の mRNA 量を TaqMan 法により検索した。その結果、DNA レベルおよび RNA レベルともにコントロールと差がなかった。このことから、rVV-N25 接種による HCV 蛋白の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働いていることが示唆された。以上のことから HCV-rVV は HCV の排除及び肝炎抑制を目指した治療ワクチンとして期待される。

図 4



(4) 本研究では、新規 HCV 持続感染モデルである Cre/loxP/HCV-MxCre Tg マウスを用いて、これまで困難とされていた HCV の持続感染化と宿主の免疫応答の関係を解析した点に特色を持つ。さらに、既存の治療薬とは全く作用点を異にする治療法として、免疫賦活化により持続感染している HCV の排除を目指すものであり、この点にも特色がある。

(5) HCV 感染症においては感染者の肝炎から肝硬変、肝癌への進行をくい止めることが我が国では最も重要である。現在、唯一の有効な抗 HCV 薬とされているインターフェロンは、50%程度の患者にしか治療効果が認められず、副作用も重篤であり、病態の進行した患者や高齢者には適用できないことから、より安全で効果的な治療法の開発が急務となっている。特異的免疫反応は一度誘導されれば長期間にわたり効果が持続することから、現状の抗ウイルス薬とは異なり、少ない投与で効果の持続が期待できる。本研究の成果は、学術的貢献のみならず肝炎の新たな治療法開発に貢献できるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Machida K, Tsukiyama-Kohara K, Sekiguchi S, Seike E, Tóne S, Hayashi Y, Tobita Y, Kasama Y, Shimizu M, Takahashi H, Taya C, Yonekawa H, Tanaka N, Kohara M.

Hepatitis C virus and disrupted interferon signaling promote lymphoproliferation via type II CD95 and interleukins. *Gastroenterology*. Jul;137(1):285-96. (2009) 査読有

- ② 関口 敏、飛田良美、小原道法  
C 型肝炎ウイルスの持続感染機構と病原性 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 6月号 Vol.35(6):14-17. (2009) 査読無

[学会発表] (計 5 件)

- ① Satoshi Sekiguchi  
Resolution of HCV chronic hepatitis with immunotherapy using Hepatitis C virus recombinant vaccinia virus in persistent infection model mice  
AASLD's 60th Annual Meeting  
2009年10月30～11月3日  
アメリカ (ボストン)

- ② 関口敏  
HCV 持続感染モデルマウスにおける HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの治療効果  
第 57 回日本ウイルス学会  
2009年10月25～27日 東京  
アメリカ (ボストン)

- ③ Satoshi Sekiguchi  
Persistent infection of Hepatitis C Virus 第 68 回日本癌学会  
2009年10月1～3日 神奈川

- ④ 関口敏  
HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスの治療ワクチン効果  
第 12 回日本ワクチン学会 2008年11月8日 (土) ～9日 (日) 熊本

- ⑤ 関口敏  
新規 HCV 持続感染モデルマウスの作製とその病態解析 第 56 回日本ウイルス学会 2008年10月26～28日 岡山

[その他]

ホームページ等

<http://www.rinshoken.or.jp/>

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
関口 敏 (SEKIGUCHI SATOSHI)  
財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・研究員  
研究者番号：10462780
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし