

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07983

研究課題名（和文）B型慢性肝炎に対するHBs抗原の消失を目指したワクチン治療の開発

研究課題名（英文）Development of vaccine therapy for achieving HBsAg loss in chronic hepatitis B

研究代表者

吉田 理（YOSHIDA, Osamu）

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70746809

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）：HBVキャリアのモデルであるHBVトランスジェニックマウスに、HBs抗原とHbc抗原を含む治療ワクチンを2週おきに計5回、経鼻投与した。5回投与後に全例（n=5/5）でHBs抗体（ 404.8 ± 172.3 mIU/mL）が誘導され、2/5症例（40%）でHBs抗原が消失し、抗原量は投与前の $2.2 \pm 3.9\%$ まで低下した。また、治療ワクチン投与後に脾臓内にHBs/Hbc抗原特異的なCTLがみられた。HBs抗原、Hbc抗原にHBx抗原を添加し、HBVトランスジェニックマウスに経鼻投与したが、HBx抗原の上乗せ効果はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBV治療にはIFNと核酸アナログが用いられるが、副作用、長期服用、治療対象者の選別などの問題点がある。HBV排除にはHBV特異的なHBV応答が重要であり、治療ワクチンは新たな治療法となりうる。HBs抗原とHbc抗原を含む治療ワクチンの効果を確認したが、更なる治療効果（HBs抗原の低下、消失）が望まれる。本研究プロジェクトでは、マウスの経鼻投与方法とHBV特異的な免疫応答（液性、細胞性）の解析方法を確立した。さらに、HBx抗原添加による治療増強効果を期待したが、治療効果の増強は確認できなかった。今後、抗原量、投与方法などのプロトコルを改良し、治療ワクチンの改良を行う。

研究成果の概要（英文）：HBV therapeutic vaccine containing HBsAg and HbcAg was administrated to HBV transgenic mouse, model of HBV asymptomatic carrier. Total 5 doses of the therapeutic vaccine were injected through nose every 2 weeks. After 5 doses injection, all the HBV-Tg (n=5) obtained anti-HBs (404.8 ± 172.3 mIU/mL). 40% (n=2/5) of HBV-Tg lost HBsAg after the 5 doses injection, the mean HBsAg was reduced to $2.2 \pm 3.9\%$ compared with the baseline. HBsAg/HbcAg specific CTLs were detected in the spleen after the therapeutic vaccine injection. HBxAg was added to improve the immunogenicity of the therapeutic vaccine, however HBxAg did not amplify the anti-HBs induction and HBsAg reduction in HBVTg mouse.

研究分野：肝臓学

キーワード：HBV 治療ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

HBV 感染の治療目標は、「Functional Cure」と呼ばれる、HBV-DNA の持続陰性化、HBs 抗原の消失、HBs 抗体の陽転化である。現在、HBV 感染の治療にはインターフェロン (IFN) と核酸アナログ (NAs) が使用されるが、IFN、NAs では functional cure の達成は困難であり、より治療効果が高く、副作用の少ない治療法の開発が求められている。

HBV 持続感染の病態は、HBV 特異的な免疫応答の低下であり、HBV 特異的な免疫応答を活性化すれば、HBV 持続感染者において HBV の排除が可能となる。申請者らは免疫治療に着目し、研究を行ってきた。従来予防ワクチンである HBs 抗原ワクチン、HBs 抗原を樹状細胞にパルスした樹状細胞ワクチン、また、これらワクチンと NAs の併用の臨床試験を行ってきた。一部の症例において、中和抗体である HBs 抗体の誘導に成功したが、HBs 抗原の低下、HBV-DNA の消失、functional cure の達成には至らなかった。HBV の排除、functional cure の達成には HBs 抗体による HBV の中和に加え、HBV の複製抑制が必要と考えられた。HBc 抗原特異的な CTL が HBV の複製を抑制するため、HBs 抗原に HBc 抗原を付加した治療ワクチン (NASVAC) をキューバの CIGB と共に開発した。バングラデシュにて未治療 B 型慢性肝炎患者に対する NASVAC を用いた第三相臨床試験を行い、NASVAC の IFN を上回る抗 HBV 効果と安全性を報告した。しかし、functional cure の達成例は少なく、改良が求められた。そこで、NASVAC の投与経路を経鼻投与のみとし、鼻腔内の滞留時間の延長のために増粘剤である CVP を併用し、ワクチンの粒子径を単一かつ広角に噴霧できる経鼻投与専用デバイスを用いた臨床試験を行うこととした。小動物を用いた前臨床試験では、経鼻投与は、皮下ならび筋肉内投与より抗体誘導が高く、CVP を併用することで、抗体価が向上することを明らかにした。これらの結果をもとに、愛媛大学にて NAs 治療中の B 型慢性肝炎患者、無症候性キャリアを対象に、NASVAC+CVP を経鼻投与専用デバイスを用いた特定臨床研究を行った。10 回の経鼻投与後の 6 か月間の観察で、約 60% の症例で HBs 抗体を誘導し、約 75% の症例で平均約 17% の HBs 抗原の減少が見られ、約 5% の症例で functional cure を達成した。また、cccDNA の優位な低下が見られた。

2 種類の抗原を含んだワクチンによる B 型肝炎に対する免疫治療の一定の効果を明らかにしたが、更なる治療効果の向上が必要と考え、本研究へと至った。

2. 研究の目的

HBV には複数の抗原が存在し、HBV の各々の抗原は、各々の機能的な役割があり、免疫することにより誘導される免疫応答に違いがみられる。HBs 抗原は HBV を中和する HBs 抗体を、HBc 抗原は HBV の複製を抑制する HBc 抗原特異的な CTL を、HBx 抗原は抗腫瘍効果のある HBx 抗原特異的な CTL を誘導する。さらに、HBs 抗原と HBc 抗原は、約 30nm 大の virus like particle であり、2 つの抗原を混和することで、各々の抗原が凝集し、免疫原性が高まり、より強い免疫が誘導される。これに HBx 抗原を加えることで、免疫原性の更なる向上が期待できる。本研究では、NASVAC (HBs 抗原 + HBc 抗原) に HBx 抗原を付加した、新規治療ワクチン (NASVAC-X) の、NASVAC に優る HBV 特異的免疫誘導能、抗 HBV 効果、抗腫瘍効果を明らかにする。

3. 研究の方法

HBV 特異的免疫誘導能の検討

HBx 抗原添加の優位性の検討

8-12週令のC57BL/6マウス(オス)に新規治療ワクチン(NASVAC-X:HBs抗原20 μ g、HBc抗原20 μ g、HBx抗原20 μ g)NASVAC(HBs抗原20 μ g、HBc抗原20 μ g)とPBSを各々6匹ずつに2週毎に計2回経鼻投与する。

最終投与の2週後にHBV特異的免疫(HBs抗体、HBc抗体、HBx抗体、HBc抗原特異的CTL、HBx抗原特異的CTL、HBVの中和能)を測定し、NASVAC-X、NASVAC群とPBS群で比較検討する。

HBs抗体価、HBc抗体価:CLIA法(外注)にて測定

HBx抗体価:ELISA法にて測定

HBc抗原特異的CTL、HBx抗原特異的CTL:

脾細胞をHBc抗原、HBx抗原を含む混合ペプチド(5 μ g/ml)で18時間刺激し、脾細胞のIFN- γ 産生をELISPOTで評価

HBV中和能:各々の血清をHBV粒子と1時間混和。血清+HBV粒子をHepG2-NTCP細胞に添加し、3時間培養。HepG2-NTCP細胞に取り込まれたHBV-DNA量をRT-PCRにて測定し、血清によるHBV中和能を評価

抗HBV効果の検討

8-12週令のHBV-トランスジェニックマウス(BL/6バックグラウンド)にNASVAC-X(HBs抗原20 μ g、HBc抗原20 μ g、HBx抗原20 μ g)NASVAC(HBs抗原20 μ g、HBc抗原20 μ g)とPBSを各々6匹ずつ2週毎に計10回、経鼻投与する。

2週毎に採血し、AST、ALT、HBV-DNA量、HBs抗原量、HBs抗体価を測定し、抗HBV効果を評価し、NASVAC-X群、NASVAC群、PBS群を比較検討する。

AST/ALT:外注にて測定

HBV-DNA量:RT-PCRにて測定

HBs抗原量:CLIA法(外注)にて測定

HBs抗体価:CLIA法(外注)にて測定

抗腫瘍効果の検討

8-12週令のHBV-トランスジェニックマウス(BL/6バックグラウンド)に、diethylnitrosamine(DEN)を給水投与による発癌モデルを使用する。発癌モデルマウスの給水投与開始と同時期にNASVAC-X(HBs抗原20 μ g、HBc抗原20 μ g、HBx抗原20 μ g)NASVAC(HBs抗原20 μ g、HBc抗原20 μ g)とPBSを各々6匹ずつ2週毎に計10回、経鼻投与する。

最終投与終了の10週後にマウス肝臓内の発癌の有無、肝臓内の癌の個数、生存率をNASVAC-X群、NASVAC群、PBS群にて比較検討する。

4. 研究成果

HBV特異的免疫誘導能の検討

8-12週令のC57BL/6マウス(オス)を用いて、CVP-NASVAC(HBs抗原とHBc抗原含有、各10 μ g)の経鼻投与と皮下投与によるHBV特異的な免疫誘導能の差異を比較した。CVP-NASVACを3回投与後のHBs抗体の誘導率は、経鼻投与群で100%(n=7/7)経皮投与群で83.3%(n=5/6)であった。HBs抗体価の平均は経鼻投与群で202.4mIU/mL、経皮投与群で212.1mIU/mLで統計学的に有意差はみられなかった。粘膜型の抗体であるIgA型HBs抗体は、経鼻投与群では投与後の上昇がみられたが、経皮投与群では上昇がみられなかった。細胞性免疫であるHBs抗原特異的CTL、HBc抗原特異的なCTL数は経鼻投与群、経皮投与群いずれにおいても投与後に上昇がみら

れた。本研究において、マウスにおけるワクチンの経鼻投与法を確立するとともに、液性免疫、細胞性免疫の評価系を確立した。さらにワクチンを経鼻投与したときにのみ粘膜型の IgA 型抗体が誘導されることを明らかにした。

CVP-NASVAC に HBx 抗原 (10 µg) を付加して、C57BL/6 マウスに 3 回経鼻投与を行ったが、HBx 抗原付加による、HBs 抗体価、IgA 型 HBs 抗体、HBs 抗原・HBc 抗原特異的な CTL 数の増加は見られなかった。HBx 抗原付加による HBV 特異的な免疫応答の向上に適した、HBx 抗原量、投与回数 of 検討を行っている。

HBx 抗体の測定を目的に ELISA による測定系の確立を目指したが、安定した測定結果が得られず、HBx 抗体の測定系の確立に至らなかった。

抗 HBV 効果の検討

8-12 週令の HBV-トランスジェニックマウス (BL/6 バックグラウンド) に、CVP-NASVAC もしくは PBS を 5 回経鼻投与し、HBs 抗原量の低下、HBs 抗体の誘導を評価した。PBS、CVP-NASVAC 投与後に AST/ALT が上昇した HBV-トランスジェニックマウスはみられなかった。PBS 投与群では HBs 抗体が誘導されたマウス (n=5) は見られなかったが、CVP-NASVAC 投与群では 100% (n=5/5) に HBs 抗体が誘導され、HBs 抗体価の平均は 404.8 mIU/mL であった。HBs 抗原量は、PBS 投与群では投与後の消失例は見られず、投与後の HBs 抗原量の割合は投与前と比し平均 115.8%であった。一方、CVP-NASVAC 投与群では、40% (n=2/5) で HBs 抗原が消失し、投与後の HBs 抗原量の割合は投与前と比し、平均 2.2%であった。CVP-NASVAC 投与による、HBV-トランスジェニックマウスにおける HBs 抗原の低下・消失作用を確認した。

HBx 抗原付加による CVP-NASVAC の治療効果の向上を目指したが、野生株の C57BL/6 マウスにおいて、HBx 抗原の有用性が明らかにできなかったため、HBV-トランスジェニックマウスを用いた実験が遂行できなかった。野生株の C57BL/6 マウスにおいて、HBx 抗原の最適量、投与回数などのプロトコルを確立後に HBV-トランスジェニックマウスを用いた治療効果の検討を予定している。

抗腫瘍効果の検討

HBV-トランスジェニックマウスにおける、DEN の給水投与による発癌モデルを確立した。一方、HBV 特異的な免疫の活性化に適した HBx 抗原量を確立できなかった。野生株の C57BL/6 マウスにおいて、HBx 抗原の最適量、投与回数などのプロトコルを確立後に、発癌モデルを用いた抗腫瘍効果の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 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 HBeAg 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 無
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 吉田理、白石佳奈、日浅陽一
2. 発表標題 HBs抗原とHBe抗原を含む経鼻治療ワクチン（CVP-NASVAC）の再投与によるHBs抗体のブースト効果とHBs抗原低下作用
3. 学会等名 第30回 日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osamu Yoshida, Kana Shiraishi, Takahiro Sanada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takashi Miyazaki, Taizo Kamishita, Mamun Al Mahtab, Julio Cesar Aguilar, Gerardo Guillen, Yoshio Tokumoto, Sheikh Mohamed Fazle Akbar, Yoichi Hiasa
2. 発表標題 HBsAg reduction by re-treatment of nasal administrative therapeutic vaccine containing HBsAg/HBeAg in chronic HBV infected patients
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osamu Yoshida, Kana Shiraishi, Yoichi Hiasa
2. 発表標題 HBsAg reduction was evident in 30 months follow-up after administration with therapeutic vaccine containing HBs/HBe antigen in chronic HBV carriers
3. 学会等名 第29回 日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Osamu Yoshida, Yusuke Imai, Kana Shiraishi, Takahiro Sanada, Michinori Kohara, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Takashi Miyzaki, Taizo Kamishita, Mamun Al Mahtab, Julio Cesar Aguilar, Gerardo Guillen, Yoshio Tokumoto, Sheikh Mohamed Fazle Akbar, Yoichi Hiasa
2. 発表標題 Long term HBsAg reduction by a nasal administrative therapeutic vaccine containing HBsAg and HbcAg mixed with mucoadhesive CVP (CVP-NASVAC) in patients with chronic HBV infection: The results of 30 months follow up
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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