

令和元年6月5日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05288

研究課題名(和文) B型肝炎根絶を目指した安全な新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel and safe immune therapy to achieve hepatitis B

研究代表者

田中 靖人 (TANAKA, Yasuhiro)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90336694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)持続感染は、肝硬変・肝細胞癌への進展やHBV再活性化の問題があり、その根絶が求められている。抗ウイルス効果を持つ抗ヒトCD40抗体の作製と最適化を検討した。HBV特異的T細胞受容体発現TgマウスのCD8+T細胞を、肝臓内でHBVを複製するHBV-Tgマウスに養子移入後、抗CD40抗体で処理した。早期処理ではT細胞の機能性が回復しHBV-mRNA量が低下したが、後期処理ではHBV-mRNA量は不変であった。また、HBs抗原に特異的なB細胞応答の解析システムとしてELISPOT assayを作成し、ヒトの血液においてもHBV特異的なB細胞応答の評価が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、HBV持続感染を治癒する有効な治療法はなく、HBV持続感染患者への精神的・経済的な負担は計り知れない。HBVの排除には宿主免疫応答の活性化が必須とされているが、最適なアプローチは全く明らかにされていない。本研究結果から、CD40抗体の投与による免疫賦活効果はHBV特異的CD8+T細胞の分化段階に依存することが明らかになった。さらに、本研究で構築したHBsAg特異的B細胞応答の解析システムにより、CD40抗体などの免疫賦活がB細胞応答に及ぼす影響をより正確に評価できるようになった。これらの結果はHBVに対する免疫治療開発を促進し、HBV持続感染による社会的負担の軽減につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Persistent infection with hepatitis B virus (HBV) causes cirrhosis・hepatocellular carcinoma as well as HBV reactivation, and its termination is urgently needed. Here, we attempted the production and optimization of humanized anti-CD40 antibody that possesses an anti-virus effect. We first evaluated the impact of CD40 activation on HBV-specific T cell receptor transgenic CD8+ T cells that were adoptively transferred into HBV transgenic mice. We found that treatment of HBV transgenic mice with CD40 antibody during the early phase of T cell responses restored functionally of HBV-specific CD8+ T cells and reduced HBV-mRNA expression levels, while the same treatment during the late phase had no impact on these parameters. We also established an ELISPOT assay system that enables us to analyze HBsAg-specific B cell responses in the human peripheral blood.

研究分野：消化器内科学

キーワード：HBV B細胞応答 抗ウイルス療法 新規免疫治療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)持続感染は、肝硬変・肝細胞癌へと進行するため、抗ウイルス療法による介入が必要不可欠である。加えて、HBV再活性化の問題があり、その根絶が求められている。これまでに我々は、ヒト肝臓キメラマウスを用いてHBVの感染実験を展開し、クローンによる感染・複製効率の違いや薬剤感受性の違いを検討してきた。その結果、HBV genotypeやブレコア変異による感染・複製効率の違いや、HBV genotypeの感染による肝細胞傷害性の違い：免疫不全状態において炎症を介さないHBVの直接的な肝傷害性を証明してきた。HBV genotypeによるインターフェロン(IFN)や核酸アナログの感受性の違いも明らかにしたが、HBV完全排除は困難であった。これは、HBV排除に必要なHBV特異的CD8+T細胞はB型慢性肝炎患者の末梢血中では著明に減少し、ほとんどの場合で抗ウイルス作用の要となるIFN- γ 産生能が低下しているため、機能的なHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導が、HBV完全排除の鍵となる。研究協力者の五十川らは、HBVを肝臓内で活発に複製するHBVトランスジェニックマウス(HBV-Tgマウス)を用いて、HBV特異的CD8+T細胞は肝臓でHBVを認識することにより、その機能的性が非常に強く抑制されることを示した。興味深いことに、HBV-Tgマウスにアゴニスティック抗CD40抗体を投与することにより、HBV特異的CD8+T細胞はインターフェロン γ 産生能、細胞傷害能を回復し、HBVの排除に至った。さらに、この抗CD40抗体投与による抗ウイルス作用はT細胞、樹状細胞に依存することも明らかにした。以上の結果は、樹状細胞を活性化する抗CD40抗体がB型慢性肝炎に対する治療薬として有用である可能性を示す非常に重要なものである。実際、抗CD40抗体は、現在B型慢性肝炎に対する治験が行われているTLR-7/8 agonistであるR848や、樹状細胞を刺激することで知られるTLR-3 agonistであるPolyI:Cに比較して、より強いHBV特異的CD8+T細胞応答を誘導しており、樹状細胞を効率良く活性化するアゴニスティック抗ヒトCD40抗体の開発が期待される。

HBVの持続感染では、HBs抗体が検出されずHBs抗原が長期間にわたって放出され続けることに対し、一過性感染の場合は、急性期に多量のHBs抗原が放出された後に宿主免疫応答が誘導されHBs抗原量は減少する。さらに、HBワクチンに対する応答性にもHBs抗体を産生しないノンレスポonderが存在する。このようなHBVに特異的な免疫応答において、B細胞応答にどのような違いがあるのは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

肝障害を伴わない安全な新規免疫治療戦略の確立を目指す。(1)抗ウイルス効果を持つ抗ヒトCD40抗体の作製とその効果の最適化：B型慢性肝炎患者では、CD8+T細胞は抗原提示を長期間受けた免疫寛容状態にあるため、HBV特異的T細胞が抗原を認識した期間によって抗CD40抗体のT細胞に対する効果が変化するかを検討した。(2)HBV特異的液性免疫応答の評価系とトランスジェニックマウスの作成：HBs抗原に特異的なB細胞応答の解析システムを確立し、HBワクチンに対するB細胞応答を評価した。

3. 研究の方法

(1)HBV特異的T細胞受容体を発現するトランスジェニック(Tg)マウスから取り出したCD8+T細胞を、肝臓内でHBVを複製するHBV-Tgマウスに養子移入し、養子移入後早期および後期に抗CD40抗体でHBV-Tgマウスを処理した。

(2)内在性のHBV特異的B細胞応答の評価法として、HBs抗原特異的Enzyme-Linked Immuno Spot (ELISPOT) assayを作成した。プレートにHBs抗原とポジティブコントロールとして抗IgG抗体をコートし、HBs抗体を分泌するハイブリドーマを用いてassayの検証を行った。次に、HBs抗原で免疫したマウスのB細胞応答を評価した。HBs抗原を4匹、生理食塩水を3匹のマウスに皮下注射し、21日後に追加免疫した。初回免疫後7日目と28日目に採血し、末梢血単核細胞(PBMC)におけるHBs抗原特異的B細胞の頻度と血清HBs抗体力価を測定した。

4. 研究成果

(1)養子移入後早期に抗CD40抗体を投与した場合には、HBV特異的CD8+T細胞は機能的性を獲得し肝臓内HBV-mRNA量が低下する。これに対し、本研究では養子移入後後期のT細胞が抗原を長期間認識した後に抗CD40抗体を投与した結果、T細胞の機能的性は回復せず肝臓内HBV-mRNA量は不変であった。すなわち、抗CD40抗体の単独治療およびsiRNAによる抗原抑制との併用療法は、B型慢性肝炎における機能的CD8+T細胞応答誘導には不十分であることが予想され、今後の研究の方向性に関わる重要な知見を得た。

HBs特異的ヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスの作製のために、ヒト抗体遺伝子のVH領域およびVL領域を、それぞれ、マウスC2a(膜型、分泌型)およびC λ 遺伝子に接続したコンストラクトを構築した。

(2)内在性のHBV 特異的 B 細胞応答の評価法として、HBs 抗原特異的 Enzyme-Linked Immuno Spot (ELISPOT) assay を確立した。HBs 抗体を分泌する 2 種類のハイブリドームを用いて assay の検証を行った結果、感度が十分に高いことを確認した(図1)。HBs 抗原で免疫したマウスの B 細胞応答を評価した結果、HBs 抗原で免疫したマウスでは 100 万個の PBMC

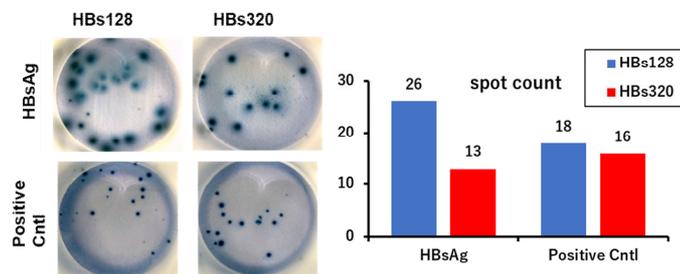


図1. ELISPOT による HBs 抗体産生ハイブリドームの検出

中に平均して約 40 個の HBs 抗体分泌細胞がスポットとして検出された。一方、コントロール群ではほとんど検出されなかった。HBs 抗体分泌細胞の数は、血清 HBs 抗体力価とおおよそ相関していたが、HBs 抗体力価の方が個体間でのばらつきが大きかった(図2)。

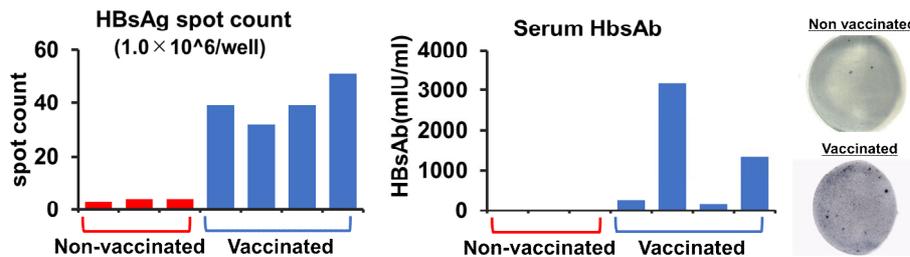


図2. ELISPOT による HBs 抗原で免疫したマウスの B 細胞応答の評価

さらに HB ワクチンの接種を受けた健常人 2 名の血液より単離した PBMC の B 細胞応答を評価した結果、38 および 43 の HBs 抗体分泌細胞がスポットとして検出された。血清 HBs 抗体力価はそれぞれ 309IU/L および 550IU/L であった。この結果から、ヒトにおける B 細胞応答の評価でも ELISPOT assay は有用であることが示された。

<引用文献>

1. Sugiyama M, Tanaka Y. et al., Hepatology. 44(4):915-24, 2006.
2. Sugiyama M, Tanaka Y. et al., Hepatology. 45(4):929-37, 2007.
3. Sugiyama M, Tanaka Y. et al., Gastroenterology. 136(2):652-62, 2009.
4. Isogawa M. et al., PLOS Pathogen. 9(7):e1003490, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

1. 五十川正記、田中靖人. Functional cure をめざす B 型肝炎治療の近未来、医学のあゆみ、268(4):282-3、2019. 査読無
2. Murata Y, Kawashima K, Sheikh K, Tanaka Y, Isogawa M. Intrahepatic Cross-Presentation and Hepatocellular Antigen Presentation Play Distinct Roles in the Induction of Hepatitis B Virus-Specific CD8(+) T Cell Responses. J Virol. 92(21), pii: e00920-18, 2018. PMID:30089700. 査読有
3. Kawashima K, Isogawa M, Hamada-Tsutsumi S, Baudi I, Saito S, Nakajima A, Tanaka Y. Type I interferon signaling prevents hepatitis B virus-specific T cell responses by reducing antigen expression. J Virol. 2018 Nov 12, 92(23), pii:e01099-18, 2018. PMID: 30209178. 査読有
4. 五十川正記、田中靖人. B 型肝炎に対する免疫治療の展望、Medical Science Digest. 44(7):344-49、2018. 査読無
5. Shinkai N, Nojima M, Iio E, Matsunami K, Toyoda H, Murakami S, Inoue T, Ogawa S, Kumada T, Tanaka Y. High levels of serum Mac-2-binding protein glycosylation isomer (M2BPGi) predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis B patients treated with nucleot(s)ide analogues. J Gastroenterol. 53(7):883-889, 2018. PMID: 29288305. 査読有
6. Shinkai N, Kusumoto S, Murakami S, Ogawa S, Ri M, Matsui T, Tamori A, Toyoda H, Ishida T, Iida S, Tanaka Y. Novel monitoring of hepatitis B reactivation based on ultra-high sensitive hepatitis B surface antigen assay. Liver Int. 37(8):1138-1147, 2017. PMID: 27992664. 査読有
7. Baudi I, Iijima S, Chin'ombe N, Mtapuri-Zinyowera S, Murakami S, Isogawa M, Hachiya A, Iwatani Y, Tanaka Y. Molecular epidemiology of co-infection with hepatitis B virus and human immunodeficiency virus (HIV) among adult patients in Harare, Zimbabwe.

- J Med Virol. 89(2):257-266, 2017. PMID: 27458715. 査読有
8. Inoue T, **Tanaka Y**. Hepatitis B virus and its sexually transmitted infection - an update. Microb Cell. 3(9):420-437, 2016. PMID: 28357379. 査読有
 9. Seto WK, **Tanaka Y**, Wong DK, Shinkai N, Cheung KS, Liu KS, Fung J, Lai CL, Yuen MF. Longitudinal profiles of highly sensitive hepatitis B surface antigen levels: re-evaluation of HBsAg seroclearance. Liver Int. 36(5):642-50, 2016. PMID: 26474013. 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 五十川正記、村田泰洋、**田中靖人**. HBV 特異的 CD8+T 細胞応答誘導における肝細胞の役割、第 32 回肝臓洞壁細胞研究会学術集会、2018 年
2. Baudi I, Isogawa M, Kawashima K, **Tanaka Y**. Ifn Directly Induces Apoptosis in Hepatocytes That Accumulate the Large Hepatitis B Surface Antigen. The 69th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2018), 2018 年
3. Kawashima K, Isogawa M, Saito S, Nakajima A, **Tanaka Y**. Activation of type I interferon signaling is required for the induction of functional HBV-specific CD8 T cells. The 2018 International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2018 年
4. Kawashima K, Isogawa M, Tsutsumi S, Saito S, Nakajima A, **Tanaka Y**. Type I interferon signaling prevents hepatitis B virus-specific T cell responses. The 2017 International HBV Meeting, 2017 年
5. Kawashima K, Isogawa M, Hamada-Tsutsumi S, Saito S, **Tanaka Y**. Hepatitis B Virus-specific T Cell Responses Are Regulated by Type I Interferon Signaling and Correlated with Intrahepatic Antigen Expression. The 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD 2017), 2017 年
6. Kawashima K, Isogawa M, Saito S, **Tanaka Y**. Reduction of hepatitis B virus (HBV) gene expression in the liver induces functional HBV-specific CD8 T cell responses without liver disease. The 26th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 2017 年
7. Isogawa M, Kawashima K, Tsutsumi-hamada S, **Tanaka Y**. Clearance rate of hepatitis B virus (HBV) is associated with the level of the core antigen expression that determines the magnitude of HBV-specific CD8 T cell responses. The 26th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 2017 年
8. 河島圭吾、五十川正記、**田中靖人**. I 型インターフェロンシグナルは肝臓内 HBV 特異的 CD8+T 細胞応答を阻害する、第 103 回日本消化器病学会総会、2017 年
9. Kawashima K, Isogawa M, Tsutsumi S, Murakami S, Saito S, Nakajima A, **Tanaka Y**. Differential core antigen expressions between hepatitis B virus genotypes determine the magnitude of virus specific CD8 T cell responses and the rate of viral clearance. 4th Taiwan-Korea-Japan Research Symposium on Hepatitis B Virus, 2016 年
10. Isogawa M, Murata Y, Kawashima K, **Tanaka Y**. Endogenous Antigen Presentation by Hepatocytes Plays an Essential Role in the Induction of HBV-specific CD8+ T Cell Responses. 4th Taiwan-Korea-Japan Research Symposium on Hepatitis B Virus, 2016 年
11. 河島圭吾、五十川正記、**田中靖人**. 肝臓内 HBV 抗原抑制による HBV 特異的エフェクターCD8 + T 細胞応答の誘導、第 102 回日本消化器病学会総会、2016 年
12. 河島圭吾、五十川正記、**田中靖人**. 肝臓内 B 型肝炎ウイルス (HBV) 抗原抑制による機能的な HBV 特異的 CD8+T 細胞応答の誘導、第 26 回抗ウイルス療法学会総会、2016 年
13. 河島圭吾、五十川正記、堤進、村上周子、斉藤聡、中島淳、**田中靖人**. 異なる HBV 遺伝子型による HBV 抗原遷延化率の違い ~ 肝臓内 CD8+T 細胞応答およびコア抗原発現量の相関性、第 52 回日本肝臓学会総会、2016 年
14. Kawashima K, Isogawa M, Saito S, Nakajima A, **Tanaka Y**. Suppression of the hepatitis B virus (HBV) antigen expression in the liver prevents HBV-specific CD8 T cell exhaustion. 2016 International HBV Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2016 年
15. Kawashima K, Isogawa M, Saito S, Nakajima A, **Tanaka Y**. Hepatitis B virus (HBV) antigen suppression prevents HBV-specific CD8 T cell exhaustion. Asian Pacific Digestive Week 2016 (APDW 2016), 2016 年
16. 河島圭吾、五十川正記、**田中靖人**. HBV 抗原抑制は機能的な HBV 特異的 CD8 + T 細胞応答誘導による肝障害を軽減する ~ HBV 排除を目指して、第 20 回日本肝臓学会大会、2016 年
17. Kawashima K, Isogawa M, Saito S, **Tanaka Y**. Silencing hepatitis B virus (HBV) gene expression in the liver by RNAi prevents HBV-specific CD8 T cell exhaustion. The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases

- (AASLD2016), 2016 年
18. Isogawa M, Kawashima K, Tsutsumi S, **Tanaka Y**. The hepatitis B virus (HBV) core antigen expression level determines the rate of CD8 T cell mediated viral clearance. The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2016), 2016 年
 19. 河島圭吾、五十川正記、**田中靖人**. HBV 特異的 CD8 + T 細胞応答による HBV 排除への試み、第 41 回日本肝臓学会東部会、2016 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岸 裕幸

ローマ字氏名：(KISHI, hiroyuki)

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院医学薬学研究部

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 60186210

(2)研究協力者

研究協力者氏名：五十川 正記

ローマ字氏名：(ISOGAWA, masanori)

研究協力者氏名：佐藤 悠介

ローマ字氏名：(SATO, yusuke)

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。