

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591004

研究課題名(和文) ウイルス肝炎持続感染モデルを用いた革新的治療ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of the novel therapeutic vaccine using persistent viral hepatitis infection model

研究代表者

木村 公則 (KIMURA, Kiminori)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：70397339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：rVV接種後4週でN25接種群のみで肝臓HCV蛋白量が減少しており、脾臓内のNS2特異的CTL数の増加が認められた。またN25接種群では接種後1週で肝臓の索状構造や線維化、steatosisなどの組織学的改善が認められ、血清IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$ 、IL-6などのcytokineが低下していた。N25接種によりHCV蛋白の減少および慢性肝炎の組織像が著明に改善し、これは抗原特異的CTLの誘導のみならず肝臓内へのマクロファージの浸潤が抑制されTNF-aやIL-6の産生が低下したことに起因していると考えられた。これらの結果はrVV-N25がHCVワクチンとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic hepatitis C, which is caused by infection with the hepatitis C virus (HCV), is a global health problem. Using a mouse model of hepatitis C, we examined the therapeutic effects of a recombinant vaccinia virus (rVV) that encodes an HCV protein. Immunization with one rVV strain (rVV-N25), which encoded nonstructural HCV proteins, suppressed serum inflammatory cytokine levels and alleviated the symptoms of pathological chronic hepatitis C within 7 days after injection. Furthermore, HCV protein levels in liver tissue also decreased in a CD4 and CD8 T-cell-dependent manner. Consistent with these results, we showed that rVV-N25 immunization induced a robust CD8 T-cell immune response that was specific to the HCV nonstructural protein 2. In addition, we propose that rVV-N25 could be developed as an effective therapeutic vaccine.

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：臨床内科学

キーワード：HCV ワクチン

## 1. 研究開始当初の背景

国内に C 型肝炎ウイルス(HCV)感染者は約 150 万人存在すると考えられ、肝細胞癌による死者数は約 4 万人を数え、癌死亡原因の第 4 位に位置する。これらの知見をもとに現在厚生省の肝炎等克服緊急対策研究事業において、肝炎ウイルスの病態および感染機構の解明ならびに肝炎、肝硬変、肝細胞癌の予防、治療法の開発を目的としウイルス肝炎に対する研究は推進されている。また、C 型肝炎の治療において IFN 治療助成制度が開始され積極的にウイルス肝炎の制圧に向けて行政面でも重要視されている。さらに、40 歳以上の肝炎スクリーニングが開始され今後感染者数の増加も見込まれ、ウイルス肝炎の治療法の早急な整備が望まれている。国外でも欧米を中心として、HCV 陽性患者が増加しておりそれに伴い肝細胞癌による死亡も急増しており、NIH を中心として C 型慢性肝炎の PEG-IFN+リバビリンの併療法のガイドラインが策定された (AASLD, 2010)。また HCV に対しての抗ウイルス薬の開発も進んでおり、現在 HCV NS5B polymerase をターゲットとした化合物の臨床試験も進行中である。このように国内国外を問わず、現在 HCV に対する治療法の開発は、感染症分野においてインフルエンザ、HIV と並んで最重要課題の一つと思われる。

## 2. 研究の目的

HCV は RNA ウイルスでフラビウイルスに属し全長約 9500bp で、慢性持続感染を生じることが特徴である。HCV はヒトとチンパンジーにしか感染せず、持続感染のメカニズム等解析するためにマウスなどの小動物感染モデルの樹立が望まれていた。既に、HCV core transgenic (Tg) マウス (Koike, Nat Med 1998, Lemon SM 2002) が作製され、HCV core 蛋白質と発癌の関与が示されより、HCV と宿主との相互作用の詳細な解析が可能となった。しかし、このマウスモデルは誕生時より肝臓内に HCV core 蛋白質を発現しており、ヒトの C 型慢性肝炎のように成人特に免疫システムが確立されてからの感染ではないため HCV と宿主の免疫反応の解析をするうえでは不十分であった。この点を補うべく、我々は、Cre/loxP のスイッチングシステムを用いて、ある一定の時期より肝臓内に HCV 蛋白質を持続発現できる (約 1 年) マウスモデルを樹立した。このマウスでは、HCV core の発現が poly-I.C. を 3 回投与後 4 日後に肝臓内でピークになり、それに伴って血清 ALT 値の上昇が認められる。これは、ヒトの急性肝炎と同様の経過であり、C 型肝炎の肝細胞での発現から如何に宿主が抗原特異的な反応を誘導するか解明出来ることを示唆している。さらに、このマウスは HCV 発現後 90 日後では慢性肝炎様の肝臓組織所見 (肝細胞索の異常構造、肝細胞の脂肪化、門脈域のリンパ球浸潤) を認め 360 日後では肝細胞癌を生じた。この

ように、我々が作製した HCV Tg マウスは、ヒトの HCV 感染と同様な経過をとることが確認された。このマウスを用いて既に我々は、野生型マウスの脾臓細胞を移入することにより投与後 2 日目に肝臓内の HCV core 蛋白質量が減少することを認めた。この際、活性化している細胞は移入した細胞ではなくレシピエント側の NK 細胞、CD8 陽性 T 細胞であることが判明した。この知見は、HCV Tg マウスの免疫反応を活性化することにより HCV が排除出来る可能性を示唆するものであった。このため我々は、弱毒性ワクシニアウイルスに HCV 構造蛋白、非構造蛋白領域を挿入したワクチン株を作製し、抗ウイルス効果および肝炎に対する免疫反応を解析した。非常に興味あることに、非構造領域の蛋白質を挿入したワクシニアウイルス株 (rVV-N25) のみが投与後 28 日で組織学的に慢性肝炎像の改善を認め、さらに HCV core の発現の低下を認めた。今回の我々の研究は、このようにヒト類似の C 型慢性肝炎モデルを用いて、rVV-N25 がどのようなメカニズムで慢性肝炎を治癒出来るのかおよびウイルスを排除出来るのか、特に抗原特異的 CTL に着目し検討することを目的とし、IFN や核酸合成阻害剤などの現存の治療に効果を認めない感染者にもワクチンにより治癒出来る可能性を検討したい。

## 3. 研究の方法

C 型慢性肝炎モデルにおけるワクチンの有効性の検討; C 型慢性肝炎は、高率に肝硬変、肝細胞癌へと移行するため肝臓の機能が比較的保たれている慢性肝炎の状態の際に、HCV を体内から排除されることが望ましい。近年、HCV は複製可能な細胞株 (JFH-1) (Wakita, Nat. Med. 2005) の樹立により、詳細な解析が可能になり viral entry に CD81 (Science, 1998), claudin-1 (Nature. 2007) などが関与していることが報告されている。また replication には、RIG-I などの innate immune system (Nature 2008) が関与していることも証明されている。このようにウイルスの解析はかなり進んでいるが、HCV がどうして持続感染を引き起こし、宿主の免疫応答が不十分なのかは未だ不明な点が多い。一つの要因として従来から HBV (Chisari, Annu Rev Immunol 1995) LCMV (Ahmed, Cell 2009) のマウスモデルで解析されてきたが、抗原特異的 CTL の機能の低下があげられる。一般に CTL の機能として、抗原認識後の cytokine 産生や cytotoxicity があり、前者では主に IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  が後者には、perforin や granzyme B の産生能として計測される (Ahmed, 2008)。実際、HBV Tg マウスの肝臓内には major な epitope である HBs28-39 の領域を認識する CTLs は存在するものの、killing 活性や IFN $\gamma$  産生能は低下していた (Kimura, J. Immunol 2002)。またヒトの C 型慢性肝炎の患者からの血液を採取し、抗原特異的 CTL の解析がおこなわれているが

(Reherman & Chisari, JCI 1995)、epitope に対する IFN $\gamma$ 産生能が低下しており、非常に数も低下していた。これらの報告をふまえて、本研究で HCV Tg マウスの慢性肝炎が改善した宿主の責任因子として、

(1) 抗原特異的 CTL の機能が回復；通常はアナジーになっている状態から活性化出来る状態に変化出来る最近では、PD-1 が関与している (Nature, 2008) といわれている。

(2) 抗原特異的 CTL 数が増加

(3) CTL の機能を修飾すると考えられる、CD4 陽性 Foxp3 陽性の抑制性 T 細胞の減少

(4) 抗原提示細胞、特に樹状細胞の抗原提示能が回復

上記の仮説を実証するため免疫学的手法を用いて下記の項目につき検討する。

HCV Tg マウス (CN2-29(+/-)/MxCre(+/-)) に poly I. C. を投与後 90 日の慢性肝炎状態のマウスに HCV 蛋白を挿入した 4 種類のワクシニアウイルス株 (rVV-LC16M8 (control), rVV-CN2 (構造領域+NS2), rVV-CN5 (全領域), rVV-N25 (非構造領域)) を皮下投与し、28 日後に以下の項目を解析。

抗原特異的 CTL の解析；

(1) 血清 HCV core 抗原、HCV 抗体価

(2) 血清 ALT の測定、血清 cytokine, chemokine の測定；血清 cytokine や chemokine は Bioplex を用いて同時に 18 種類測定する。

(3) 肝臓、脾臓内の抗原特異的 CTLs の数量、機能解析；肝臓、脾臓よりリンパ球を採取し、既に樹立した EL-4/CN2, EL-4/NS2 の H-2b 由来の細胞株と共培養後 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GranzymeB, perforin 産生能を測定。同時に PD-1 の発現を検討する。また Regulatory T 細胞の測定のため、CD4 陽性 FoxP3 陽性細胞を計測。

遺伝子の発現解析；肝臓を取り出し、RNA を抽出しサイトカインやケモカインの発現を real-time PCR でおこなう。

#### 4. 研究成果

rVV 接種後 4 週で N25 接種群のみで肝臓 HCV 蛋白量が減少しており、脾臓内の NS2 特異的 CTL 数の増加が認められた。また N25 接種群では接種後 1 週で肝臓の索状構造や線維化、steatosis などの組織学的改善が認められ、血清 IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6 などの cytokine が低下していた。さらに、macrophages や monocytes の肝臓内浸潤数が著明に減少し同時に TNF- $\alpha$  や IL-6 の産生が control と比較し低下していた。また TNF- $\alpha$  や IL-6R の中和抗体を HCV-Tg に投与することにより慢性肝炎の組織像が改善し、同様に Lipo-clodronate 投与後でも肝組織像が改善していた。N25 接種により HCV 蛋白の減少および慢性肝炎の組織像が著明に改善し、これは抗原特異的 CTL の誘導のみならず肝臓内へのマクロファージの浸潤が抑制され TNF- $\alpha$  や

IL-6 の産生が低下したことに起因していると考えられた。これらの知見は N25 が抗ウイルス作用だけでなく抗炎症作用も有することを認め慢性肝炎に対する治療薬としての可能性が示唆された。

#### 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 5 件)

(1) Kinetics of peripheral hepatitis B virus-specific CD8+ T cells in patients with onset of viral reactivation. Aoki J, Kowazaki Y, Ohtsuki T, Okamoto R, Ohashi K, Hayashi S, Sakamaki H, Kohara M, Kimura K. J Gastroenterol. 2013 Jun;48(6):728-37. doi: 10.1007/s00535-012-0676-y. Epub 2012 Sep 26.

(査読あり)

(2) Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. PLoS One. 2012;7(12):e51656. doi: 10.1371 (査読あり)

(3) The development of therapeutic vaccine for hepatitis C virus. Kimura K, Kohara M. Gan To Kagaku Ryoho. 2012 Oct;39(10):1451-7. Review. (査読あり)

(4) An experimental mouse model for hepatitis C virus. Kimura K, Kohara M. Exp Anim. 2011;60(2):93-100. Review. (査読あり)

(5) Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. Kimura K, Sekiguchi S, Hayashi S, Hayashi Y, Hishima T, Nagaki M, Kohara M. J Leukoc Biol. 2011 Mar;89(3):433-42. doi: 10.1189/jlb.0710412. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

(1) Yoshioka K, Kimura K, et al. The efficacy of entecavir in patients with hepatitis B virus reactivation after allo-HSCT. 第75回日本血液学会学術集会、Poster presentation PS-1-374、札幌 2013年11月9日

(2) 木村公則、坂巻壽 他. 造血幹細胞移植後のHBV再活性化における宿主の免疫応答の解析. 第17回日本肝臓学会大会、東京 2013年10月9日

(3) Kimura K, Aoki J, Kowazaki Y, et al. Kinetics of peripheral hepatitis B virus-specific CD8+ T cells in patients with onset of viral reactivation. Poster presentation, AASLD (American Association for the study of Liver Disease) Single topic Conference, Washington DC, Mar 21 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 公則 (KIMURA, Kiminori)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：70397339

(2) 研究分担者

永木 正仁 (NAGAKI, Masahito)

岐阜大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30293559