

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860305

研究課題名(和文) C型肝炎を正常化するHCV非構造蛋白質発現組換えワクチニアウイルスの作用機序解明

研究課題名(英文) The functional mechanism of a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus

研究代表者

大槻 貴博(OHTSUKI, Takahiro)

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：10593642

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)：これまでにIL-6、TNF- $\alpha$  産生マクロファージ(M $\phi$ )がC型慢性肝炎を引き起し、HCVの非構造蛋白質を発現する組換えワクチニアウイルス(rVV-N25)接種によりC型慢性肝炎の病態が正常化する事を見出した。HCV-Tgマウスの肝臓では、M1様M $\phi$ でなくM2様M $\phi$ がIL-6、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生する事でC型慢性肝炎を呈しており、M1様M $\phi$ のような機能を持つM2様M $\phi$ についての初めての知見が得られた。さらにrVV-N25は、炎症性サイトカイン産生M2様M $\phi$ を減少させることで肝臓の病態を改善し、治療ワクチンとしての効果を発揮することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Macrophages (M $\phi$ ) in liver are widely defined as important inflammatory cells in chronic viral hepatitis due to their pro-inflammatory activity. We reported previously that IL-6 and TNF- $\alpha$  played significant role to cause chronic hepatitis in HCV transgenic mice. In addition, we showed recombinant vaccinia viruses expressing HCV nonstructural protein (rVV-N25) could ameliorate chronic hepatitis. The number of M2-like M $\phi$  (M2M $\phi$ ) in the liver of HCV transgenic mice was notably increased compared to that of age-matched control mice. These M2M $\phi$  in the liver produced elevated levels of IL-6 and TNF- $\alpha$ . rVV-N25 infection suppressed the number and activation of M2M $\phi$  in liver tissue. These results suggested that inflammatory cytokines produced by M2M $\phi$  contribute to the induction of chronic liver inflammation in HCV transgenic mice. Collectively, we showed here that the therapeutic effect of rVV-N25 results from suppression of the number and activation of hepatic macrophages.

研究分野：感染免疫

キーワード：HCV 慢性肝炎 ワクチン マクロファージ 感染免疫

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) は感染後、慢性 C 型肝炎、肝硬変、肝細胞癌に進展する。近年効果的な抗ウイルス剤が開発されているが、現在までに根治治療のワクチンはなく、開発が強く望まれている。慢性 C 型肝炎において IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインは病態の悪化に關与する事が知られている。我々は HCV-トランスジェニック (Tg) マウスを用いた実験から、IL-6、TNF- $\alpha$  を産生するマクロファージ (M $\phi$ ) が C 型慢性肝炎を引き起こしていること、さらに HCV の非構造蛋白質を発現する組換えワクシニアウイルス (rVV-N25) をこのマウスに接種すると、接種 7 日で血清中の炎症性サイトカインが減少し、C 型慢性肝炎を呈する肝臓の病態を正常化した。さらに接種 28 日後には CD4、CD8T 細胞依存的に肝臓内のウイルス抗原を排除することを見出した。これは rVV-N25 が免疫賦活化する事で C 型慢性肝炎に対する治療ワクチンとして働くことを示唆しているが、rVV-N25 が炎症性サイトカインを産生する M $\phi$  にどのように作用し、C 型慢性肝炎を改善するかについてはあまりよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

今回我々は病態進行に關与する HCV-Tg マウスの肝臓内炎症性 M $\phi$  について免疫学的解析を行い、rVV-N25 接種後の肝臓内 M $\phi$  を調べることによって rVV-N25 の作用機序解析を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

C 型慢性肝炎を呈する HCV-Tg マウス (CN2-29<sup>(+/-)</sup>/Mx1-Cre<sup>(+/-)</sup>) の作製のために HCV 遺伝子を持つ R6CN2HCV-Tg マウス (CN2-29<sup>(+/+)</sup>) と、インターフェロン応答性に Cre を発現する MX1-Cre Tg マウスを交配させた。8 週齢の HCV-Tg マウスに poly(I:C)

を 2 日毎に 3 回腹腔内投与して HCV 遺伝子を誘導発現し、C 型慢性肝炎を呈する 3 ヶ月後に実験に使用した。同週齢マウス Non-Tg マウス (CN2-29<sup>(+/-)</sup>/MxCre<sup>(-/-)</sup>) も同様に poly(I:C) を投与して実験に使用した。

### (2) HCV-Tg への rVV-N25 接種方法

poly(I:C) 投与後 3 ヶ月の HCV-Tg または Non-Tg マウスに  $1 \times 10^8$  PFU/50  $\mu$ l の rVV-N25 または rVV-Emp (空の rVV ベクター) を皮内接種した。

### (3) M $\phi$ 枯渇実験

慢性 C 型肝炎を呈する HCV-Tg マウスにおける M $\phi$  の役割を解析するために、rVV-N25 接種前日および接種 3 日後に M $\phi$  を枯渇させる clodronate-liposome を静脈内投与した。rVV-N25 接種 7 日後に血清、肝臓、脾臓を採材し免疫学的、組織病理学的解析を行った。

### (4) 抗 IL-6 受容体抗体による IL-6 シグナル阻害実験

抗マウス IL-6 受容体ラットモノクローナル中和抗体 (MR16-1) は中外製薬より分与された。MR16-1 の腹腔内投与によりマウス IL-6 受容体への IL-6 結合が阻害され、IL-6 によるシグナルが阻害される。そこで MR16-1 あるいはコントロールとしてラット IgG1 を HCV-Tg マウスに 0.5mg/0.1ml を 7 日毎に 2 回腹腔内投与して最終投与 7 日後に採材した。

### (5) 血清の解析

心採血により全血から血清を分離し、血清中の炎症性サイトカインを Bioplex (Bio-Rad) により解析した。

### (6) 肝臓の組織病理学的解析と評価

肝臓の組織病理解析のために、採材した肝臓はホルマリン固定後、パラフィン包埋し、薄切後に H&E 染色を行った。Histology Activity Index (HAI) score により肝臓の病態を数値化する事で評価した。

### (7) 免疫染色

採材した肝臓は OCT コンパウンドで包埋凍結し、薄切後 AlexaFluoro555 標識 CD206 お

よび FITC 標識 F4/80 により M2 様マクロファージ (M2M) の免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で 10 視野を観察し、共局在している陽性細胞をカウントした。

#### (8) FACS 解析

肝臓からの白血球は、DNase I, Collagenase IV 消化後に Lympholyte-M により分離した。脾臓からは cell strainer を通すことで白血球を分離した。その後、recombinant IL-2 (50U/200  $\mu$ l), LPS (0.5  $\mu$ g/ml) Golgi plug 存在下で 37、4 時間刺激した。細胞内サイトカイン染色を行うために CD16/32 により Fc block 後、F4/80, CD11b, CD206, CD11c, CD4, CD8 抗体で細胞表面を染色した。固定後さらに細胞内サイトカイン抗体 (IL-6, TNF-) で染色して、CantolI (BD) により FACS 解析を行った。

#### (9) 肝臓内ウイルス抗原の定量

凍結肝臓をプロテアーゼ阻害剤入り RIPA buffer 存在下でセラミックビーズを入れ攪拌し肝臓組織抽出液を作製した。肝臓組織抽出液中のウイルス抗原 (HCV コア蛋白質) 発現量は市販の HCV core ELISA アッセイキット (Xpress Bio) を用いて定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) M 枯渴により HCV-Tg マウスの肝臓の病態は改善する

これまでに M により産生される炎症性サイトカイン (IL-6 と TNF-) が慢性肝炎を呈する HCV-Tg マウスにおいて病態進行に深く関与することを報告してきた。慢性 C 型肝炎における M の役割についてさらに解析するために、HCV-Tg マウスに clodronate liposome あるいは Vehicle (PBS) を 4 日毎に 2 回静脈内投与して Mac を枯渴させ、同時に rVV-N25 あるいは rVV-Emp を皮下接種し、7 日後に採材した。M 枯渴による血清中の炎症性サイトカインへの影響

を調べたところ、clodronate liposome を投与したマウスでは血清中の IL-6 および TNF- の産生が減少した。FACS により clodronate liposome 投与後の CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>肝臓内 M 数をカウントしたところ、clodronate liposome 投与により約 91%が減少した。rVV-N25 接種群もまた肝臓内 M 数は減少し、clodronate liposome 投与との組合せる事でさらに肝臓内 M 数が減少した。肝臓の病理学的変化を H&E 染色後に HAI scoring により評価したところ、clodronate liposome 投与マウスは肝臓の病態が改善し、HAI score が減少した。これは Mac が C 型肝炎に寄与することを示唆している。さらに FACS 解析の結果と一致して、免疫染色でも clodronate liposome 投与群では F4/80 陽性 M が減少した。

#### (2) M2M は C 型肝炎を呈する HCV-Tg マウスの肝臓と脾臓で増加する

肝臓における HCV 蛋白質の発現が M の極性に影響するかどうか調べるために、HCV-Tg マウスと Non-Tg マウスの肝臓、脾臓における M の数、極性、炎症性サイトカイン産生について解析した。FACS 解析により CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> M を CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>陽性 M1 様マクロファージ (M1M) と CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>陽性 M2M に分類し、産生される IL-6、TNF- $\square$  の発現を調べた。HCV-Tg マウスの肝臓では Non-Tg マウスと比べて約 3 倍 M 数が増加していた。C 型肝炎を呈する HCV-Tg マウス肝臓では M2M が主に増加していた。さらに Non-Tg マウスに比べて M1M, M2M からの IL-6, TNF- 産生が有意に増加していた。これまでの報告では炎症性サイトカインは主に M1M から産生されることが知られていたが、興味深いことに HCV-Tg マウスの肝臓では主に M2M が IL-6, TNF- を産生していた。免疫染色の結果からも HCV-Tg マウスの肝臓では

F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>M2M の増加していたことから、IL-6, TNF- $\alpha$  産生する M2M が C 型慢性肝炎の進展に関与することが示唆された。

(3) IL-6 受容体に対する中和抗体は肝臓の M2M の蓄積に影響しない

IL-6 シグナリングが HCV-Tg マウスの肝臓に M2M の蓄積を誘導するかどうか確認するために、抗 IL-6 受容体中和抗体を腹腔内投与し、肝臓を組織学的に解析した。抗 IL-6 受容体中和抗体の投与により HCV-Tg マウスの肝臓は正常な組織像を示した。次に M1/M2M シフトにおける IL-6 の役割と、活動性慢性肝炎を通して肝臓に M2M の集積が見られるかどうか調べた。さらに IL-6 が M の数、極性、機能について影響するかどうか評価するために、抗 IL-6 受容体中和抗体を HCV-Tg マウスの腹腔内に投与後に IL-6, TNF- $\alpha$  産生 M1/M2M 数を FACS 解析により調べた。抗 IL-6 受容体中和抗体投与により M2M 数に変化は見られなかった。さらに免疫組織学的解析でも抗 IL-6 受容体中和抗体投与による肝臓への M2M 集積に影響しなかった。

(4) rVV-N25 は肝臓内 M2M の数およびサイトカイン産生を減少させる

rVV-N25 は HCV-Tg マウスの肝臓において M を減少させ、さらに肝臓の病態を正常化することを示した。M2M における rVV-N25 の効果を調べるために、rVV-N25 あるいは rVV-Emp を HCV-Tg マウスに接種し、7 日後の肝臓および脾臓の M1/M2M 数とサイトカイン産生を解析した。血清中の IL-6 は rVV-N25 接種後有意に減少した。さらに FACS 解析に結果から、rVV-N25 接種により HCV-Tg マウスの肝臓および脾臓の M2M の数および IL-6 産生が減少していた。

rVV-N25 接種後の HCV-Tg マウスの肝臓での M2M 数の減少は、免疫染色の結果とも一致していた。これらの結果は、M2M が

rVV-N25 の治療ワクチンの標的であることを示唆している。対照的に肝臓では M1M 数に有意差は認められなかった。

HCV 感染による肝傷害と病態進行は、HCV 特異的 CD8T 細胞を介した宿主免疫反応により進行すると考えられている。実際に強い CD8T 細胞反応は HCV 感染を排除した患者で観察される。しかし我々の研究では C 型慢性肝炎は肝臓内 M により産生される TNF- $\alpha$ , IL-6 を介することが示唆された。この違いを明らかにするために、C 型慢性肝炎における M の役割について明らかにした。HCV-Tg マウスの肝臓および脾臓では CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> M が増加しており、M を枯渇することで肝臓の病態が正常化したことから、M が C 型慢性肝炎の原因であることを結論づけた。実際にクッパー細胞由来の IL-18, TNF- $\alpha$  のレベルが HCV 患者の病態と相関することが報告され、HCV 感染により IL-1, IL-18 などの type I 炎症性サイトカインの産生を誘導するが、HCV により誘導される M の極性について *in vitro*, *in vivo* の両方で調べた報告はこれまで殆ど無い。我々は慢性肝炎を呈する HCV-Tg マウスの肝臓では M1M ではなく、M2M 数がおよそ 10 倍増加しており、高レベルの TNF- $\alpha$ , IL-6 を産生していることを明らかにした。M2M は炎症の抑制や組織修復の促進に関与するので、M2M へのスイッチは HCV による肝傷害を制御するための宿主の防御反応であるかもしれないが、一般的には TNF- $\alpha$  や IL-6 を産生するのは M1M である。IL-4, IL-10, IL-13 のような Th2 サイトカインの産生については調べていないが、今回の結果から M2M がある条件下で Th1 サイトカインを産生することが示唆された。これらの知見は M2M が慢性肝炎下では優位であり、M の極性が肝臓の病態に依存して変化することを示している。最近、HBV が慢性感染したヒト化マウスモデルでも、M2M が

優位であることが報告された。我々の実験から抗 IL-6 受容体に対する中和抗体の投与では M2M 数に影響を与えなかった。M に直接的 IL-6 シグナリングの阻害は行っていないが、M2M へのシフトにおける IL-6 の役割についてはさらに調べる必要がある。HCV-Tg マウスは脂肪変性を引き起こすが、脂肪酸と同族受容体の PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  は M2M の成熟を誘導する事が知られており、脂肪変性が M2M の集積に関与するかもしれない。データは示さないが HCV-Tg マウスの肝臓での M2M 数の増加を調べるために、骨髄の CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>+</sup>陽性炎症性単球の相対率を解析したところ、HCV 蛋白質の発現の有無で炎症性単球に有意な差は認められなかったことから、M2M は肝臓で限局的に増加していることが示唆された。

rVV-N25 は肝臓内の炎症性サイトカインを産生する M2M 数を減少させるが、rVV-N25 がどのように減少させるかについてはわかっていない。rVV-N25 接種後の M の減少はアポトーシスの増加によるものではないことが分かった。さらに、rVV-N25 が M に感染するかどうか PCR 解析したところ、ワクチニアウイルス DNA は接種した皮膚だけに存在し、M が浸潤した肝臓、脾臓では検出されなかった。これらの結果は M の減少が、ワクチニアウイルスの M への直接的な感染による細胞毒性ではなく、接種後の宿主免疫反応に起因していることが示唆された。C 型慢性肝炎における M2M 数の増加と rVV-N25 による M2M の減少機序についてはさらに実験が必要とされる。

まとめると、HCV-Tg マウスの肝臓では、M1M でなく M2M が IL-6, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを産生する事で C 型慢性肝炎を呈しており、M1M のような機能を持つ M2M についての初めての知見が得られた。さらに rVV-N25 は、炎症性サイトカイン

産生 M2M を減少させることで肝臓の病態を改善し、治療ワクチンとしての効果を発揮することが明らかとなった。

今後治療ワクチンの安全性を高めるために、rVV-N25 の NS3 プロテアーゼ、ヘリケース活性部位および NS5B の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性領域に変異を入れたワクチンを GMP に準拠して作製する。加えてさらなる rVV-N25 の作用機序解明するため、NS2 単独あるいは E1-NS5B (E1N5) を発現する rVV-HCV を作製し、治療ワクチン効果に必要な部位を決定したい。

## 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3件)

Islam S, Kanbe K, Shimizu N, Ohtsuki T, Jinno-Oue A, Tanaka A, Hoshino H. CKR-L3, a deletion version CCR6-isoform shows coreceptor-activity for limited human and simian immunodeficiency viruses. BMC Infect Dis. 2014 Jul 1;14:354. doi: 10.1186/1471-2334-14-354. 査読有

Watanabe T, Hatakeyama H, Matsuda-Yasui C, Sato Y, Sudoh M, Takagi A, Hirata Y, Ohtsuki T, Arai M, Inoue K, Harashima H, Kohara M. In vivo therapeutic potential of Dicer-hunting siRNAs targeting infectious hepatitis C virus. Sci Rep. 2014 Apr 23;4:4750. doi: 10.1038/srep04750. 査読有

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

〔学会発表〕(計5件)

口頭発表

大槻貴博, 木村公則, 徳永優子, 林幸子, 小原道法. C型肝炎トランスジェニックマウスにおいて肝臓内組織炎症性 M2 マクロファージが慢性肝炎を引き起こす. 第61回日本ウイルス学会学術集会. 2013年11月10-12日. 神戸国際会議場. 兵庫

\*Kiminori Kimura, Takahiro Ohtsuki, Yuko Tokunaga, Satoshi Sekiguchi, Michinori Kohara. Tissue macrophages are responsible for inflammatory liver disease in the HCV transgenic mice. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 1 - 5 Nov 2013, Washington, USA.

Yuko Tokunaga, Kiminori Kimura, Takahiro Ohtsuki, Yukiko Hayashi, Mitsuko Hara, Keisuke Muneakata, Tsunekazu Hishima, Hiroyuki Kouji, Soichi Kojima, Michinori Kohara. Selective inhibitor of Wnt/ - catenin/ CBP signaling ameliorates hepatitis C virus- induced liver fibrosis. Selective inhibitor of Wnt/ - catenin/ CBP signaling ameliorates hepatitis C virus- induced liver fibrosis. 21th International symposium on Hepatitis C Virus and Related viruses. 2014年09月7-11日 Banff, Canada

徳永 優子、木村 公則、大槻 貴博、林 幸子、原 詳子、宗片 圭祐、比島 恒和、小嶋 聡一、小原 道法. 選択的Wnt/ - catenin/ CBP シグナル阻害剤による肝線維症改善作用. 第62回日本ウイルス学会. 2014年11月10-12日. パシフィコ横浜, 神奈川

ポスター発表

Takahiro Ohtsuki, Kiminori Kimura, Yuko Tokunaga, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara. Tissue macrophages are responsible for inflammatory liver disease in the HCV transgenic mice. 20<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Melbourne convention and exhibition centre, Australia, 6-10 Oct, 2013.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/infectious/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大槻 貴博 (OHTSUKI, Takahiro)

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: 10593642