

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461015

研究課題名(和文) 自然免疫活性化によるB型肝炎ウイルス特異的T細胞応答の誘導

研究課題名(英文) Induction of hepatitis B virus specific T cell responses by activating innate immune response

研究代表者

五十川 正記 (ISOGAWA, Masanori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50723201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではB型肝炎ウイルス(HBV)特異的T細胞応答を誘導するために、実質細胞による内因性抗原提示と骨髄由来細胞による外因性抗原提示のどちらがより重要かを検討した。肝臓内でHBVを発現するトランスジェニックマウス(HBV-Tgマウス)を利用し、MHC class Iの発現が実質細胞、または骨髄由来細胞上で欠如するHBV-Tgマウスを作成した。これらマウスにHBV特異的T細胞を養子移入し、その応答性を解析した結果、骨髄由来細胞による外因性抗原提示がHBV特異的T細胞の最適な増殖に必要であるが、実質細胞による内因性抗原提示がT細胞の増殖と細胞傷害能の誘導においてより重要という結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we determined whether endogenous antigen presentation by hepatocytes or cross-presentation by bone marrow derived cells is more important in the induction of hepatitis B virus (HBV)-specific T cell responses. To do so, we employed transgenic mice that replicate HBV at high level in the liver (HBV-Tg mice) to generate HBV-Tg mice whose MHC class I expression is absent on bone marrow derived cells, or parenchymal cells. We then adoptively transferred HBV-specific T cells, and monitored their responsiveness. Our data suggest that cross-presentation by hematopoietic cells is required for the optimum expansion of HBV-specific T cells, but endogenous antigen presentation by non-hematopoietic cells, presumably hepatocytes, is far more essential in the expansion and cytolytic differentiation of HBV-specific T cells.

研究分野：肝臓、ウイルス、免疫

キーワード：B型肝炎ウイルス HBV特異的CD8+T細胞 抗原提示

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルスはエンベロープで覆われた不完全二本鎖 DNA ウイルスであり、急性または慢性肝炎の原因となり、B型肝炎の多くは肝硬変、さらには肝細胞癌へと進行する。HBVの排除には感染細胞を選択的に破壊することの出来るHBV特異的CD8+T細胞応答が必要不可欠である。しかしながら、そのようなT細胞応答がどのような機序で誘導されるのかは明らかにされていない。申請者らはHBV特異的T細胞受容体(TCR)を発現するTCRトランスジェニックマウス(TCR-Tgマウス)を作成し、そのマウスから単離したHBV特異的ナイーブCD8+T細胞を上記のHBV-Tgマウスに養子移入後、経時的にHBV特異的CD8+T細胞応答を解析した(Isogawa M, et al. PLOS Pathogen 2013)。ナイーブT細胞は通常リンパ組織でまず活性化されるという免疫学的定説に反し、HBV特異的ナイーブCD8+T細胞は肝臓内で速やかに活性化され増殖した。しかしながら、肝臓内で活性化されたHBV特異的ナイーブCD8+T細胞は、IFN- $\gamma$ 産生能も細胞傷害能も獲得しなかった。さらに、これらの機能的に欠陥のあるHBV特異的CD8+T細胞は、HBV複製の抑制も出来ず、肝障害もほとんど誘発しなかった。興味深いことに、機能的に欠陥のあるHBV特異的CD8+T細胞は機能抑制分子であるPD-1を発現していたため、肝臓内で抗原認識したHBV特異的ナイーブCD8+T細胞はPD-1を介して、免疫寛容に導かれるとがんがえられた。注目すべきことに、HBV-Tgマウスの樹状細胞(DCs)を抗CD40抗体( $\alpha$ CD40)で刺激することにより、HBV特異的ナイーブCD8+T細胞はIFN- $\gamma$ 産生能と細胞傷害能を獲得し、HBVを排除し、肝障害を誘起した。このような機能的HBV特異的CD8+T細胞はPD-1をほとんど発現していなかったため、DCsを活性化することにより、抗原認識によるPD-1を介したHBV特異的T細胞の免疫寛容を克服出来ると考えられた。以上の結果はDCsの活性化がB型肝炎に対する有効な治療となりうることを示唆するものであった。

### 2. 研究の目的

上記の結果は、HBV特異的ナイーブCD8+T細胞が肝臓内で抗原認識することによって免疫寛容へと導かれること、そのようなHBV特異的免疫寛容はDCsを $\alpha$ CD40で刺激することにより克服出来るということを示すものである。しかしながら、 $\alpha$ CD40で活性化されたDCsがどのような機序でHBV特異的CD8+T細胞の機能分化を促すのかは十分に理解されておらず、さらには、DCsが $\alpha$ CD40以外の自然免疫刺激物質で活性化された場合でも、HBV特異的免疫寛容を克服し、機能的CD8+T細胞応答を誘導できるかどうかは完全に明らかにされていない。したがって、本研究では、次の二つを目標とした。

**目的 1. 機能的HBV特異的CD8+T細胞応答が**

**活性化DCsにより誘導される機序の解明。**

**目的 2. HBV特異的CD8+T細胞応答の誘導に効果的な自然免疫シグナル伝達経路の同定。**

### 3. 研究の方法

**目的 1. 機能的HBV特異的CD8+T細胞応答が活性化DCsにより誘導される機序の解明。**

**第1シグナルの重要性の検討:** HBV-Tgマウスに1000radのX線を照射し、その後24時間以内に $\beta$ 2-マイクログロブリン( $\beta$ 2m)欠損マウスから取り出した骨髄細胞を移入することにより、実質細胞ではMHC class Iを発現するが、DCsを含む骨髄由来細胞上でMHC class Iを発現しない骨髄キメラHBV-Tgマウスを作成した(図1: red bars)。また、HBV-Tgマウスを $\beta$ 2m欠損マウスと二度交配することによりMHC class Iを発現しない $\beta$ 2m欠損HBV-Tgマウスを作成した。このマウスに1000radのX線を照射し、その後24時間以内に野生型マウスから取り出した骨髄細胞を移入することにより、実質細胞ではMHC class Iを発現せず、DCsを含む骨髄由来細胞上でのみMHC class Iを発現する骨髄キメラHBV-Tgマウスを作成した。図1: blue bars)。骨髄細胞移入2-3ヶ月後、これらのマウスのDCsを $\alpha$ CD40で刺激し、HBV特異的TCR-Tgマウスから単離したHBV特異的ナイーブCD8+T細胞を養子移入した。養子移入3・7日後に骨髄キメラマウスの肝臓、脾臓、リンパ節から細胞を単離し、これらの組織中のHBV特異的CD8+T細胞の活性化状況、IFN- $\gamma$ 産生能、細胞傷害能(グランザイムB発現)をフローサイトメトリー(FACS)により、以前報告したように解析した(Isogawa M, et al. PLOS Pathogen 2013)。これらHBV特異的T細胞応答がHBVの複製・メッセンジャーRNA(mRNA)発現を抑制するかどうかを、それぞれサザンブロット・ノーザンブロットを用いて解析した。さらに、これらT細胞応答の肝障害に対する影響を調べるため、血清中アラニントランスアミナーゼ(sALT)活性を測定した。

**目的 2. HBV特異的CD8+T細胞応答の誘導に効果的な自然免疫シグナル伝達経路の同定。**

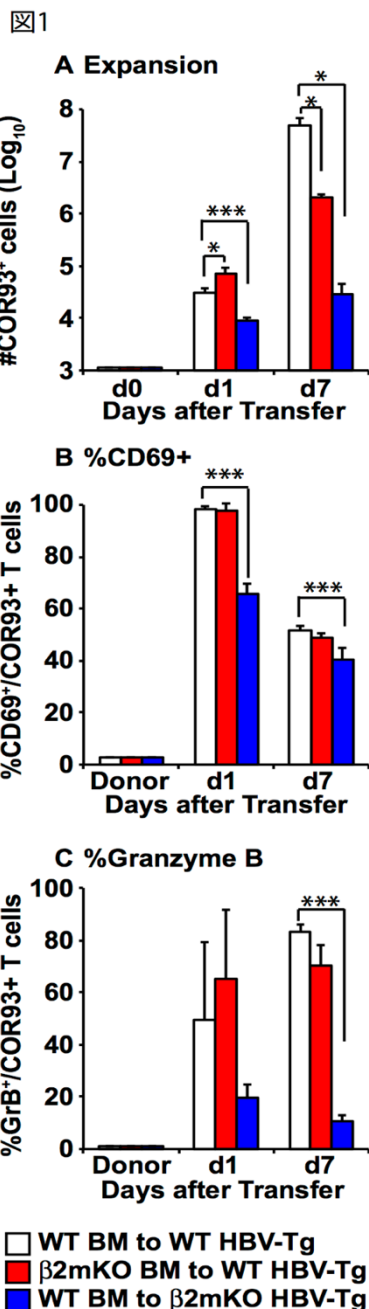
**様々なTLRシグナル伝達経路を刺激することにより、機能的HBV特異的CD8+T細胞応答がHBV持続感染下で誘導出来るかを検証するため、HBV-TgマウスにPoly I-C(TLR3)、CpG ODN(TLR9)を投与し、その翌日にHBV特異的ナイーブCD8+T細胞を養子移入後、HBV特異的CD8+T細胞応答、HBV複製・mRNA発現、肝障害の程度を目的1で記述した様に解析した。**

### 4. 研究成果

**目的 1. 機能的HBV特異的CD8+T細胞応答が活性化DCsにより誘導される機序の解明。**

骨髄由来細胞上でMHC class Iを発現しない骨髄キメラHBV-Tgマウスでは(図1A:red bars)、野生型のHBV-Tgマウス(図1:white bars)に比較して、HBV特異的CD8+T細胞の増殖は抑

制されたが、CD69 (図 1B)とグランザイム B(図 1C)の発現にみられるように、その活性化と細胞傷害能の誘導には変化が認められなかった。以上の結果から機能的 HBV 特異的 T 細胞応答の誘導には、骨髄由来細胞による抗原提示が必要であることが示された。一方で、HBV 特異的 CD8+T 細胞は、骨髄由来細胞のみで MHC class I を発現する HBV-Tg マウス(図 1:blue bars)においても、T 細胞養子移入 7 日後には野生型 HBV-Tg マウスとほぼ同程度、活性化の指標である CD69 を発現していた(図 1B)。このことは骨髄由来細胞が肝細胞で産生された HBV を取り込み、外因性抗原提示機序により、HBV 特異的 CD8+T 細胞を活性化することを示している。このような活性化にもかかわらず、HBV 特異的 CD8+T 細胞は骨髄由来細胞のみで MHC class I を発現する HBV-Tg マウスにおいては全く増殖せず(図 1A)、細胞傷害能の獲得も示さなかった(図 1C)。以上の



結果から、骨髄由来細胞による抗原提示は機能的 HBV 特異的 CD8+T 細胞応答の誘導に十分でなく、肝細胞による抗原提示が細胞の増殖と機能分化、特に細胞傷害能の誘導に必須であることが示された。

## 目的 2. HBV 特異的 CD8+T 細胞応答の誘導に効果的な自然免疫シグナル伝達経路の同定。

HBV-Tg マウスに Poly I-C(TLR3)、CpG ODN(TLR9) を投与しても、機能的な HBV 特異的 CD8+T 細胞応答は誘導されなかった。この事は、α CD40 による自然免疫の活性化が HBV 特異的 CD8+T 細胞応答誘導に非常に強力である事を示している。

## 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 9 件)

- Elkady A, Iijima S, Aboulfotuh S, Mostafa Ali E, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Isogawa M, Tanaka Y. Characteristics of escape mutations from occult hepatitis B virus infected patients with hematological malignancies in South Egypt. *World J Hepatol.* (査読有) 2017 Mar 28;9(9):477-486. doi:10.4254/wjh.v9.i9.477.
- 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.* (査読有) 2017 Feb;89(2):257-266. doi: 10.1002/jmv.24641.
- Hayashi S, Murakami S, Omagari K, Matsui T, Iio E, Isogawa M, Watanabe T, Karino Y, Tanaka Y. Characterization of novel entecavir resistance mutations. *J Hepatol.* (査読有) 2015 Sep;63(3):546-53. doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.020.
- Guidotti LG, Inverso D, Sironi L, Di Lucia P, Fioravanti J, Ganzer L, Fiocchi A, Vacca M, Aiolfi R, Sammicheli S, Mainetti M, Cataudella T, Raimondi A, Gonzalez-Aseguinolaza G, Protzer U, Ruggeri ZM, Chisari FV, Isogawa M, Sitia G, Iannacone M. Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells. *Cell.* (査読有) 2015 Apr 23;161(3):486-500. doi:10.1016/j.cell.2015.03.005.

5. Guidotti LG, Isogawa M, Chisari FV. Host-virus interactions in hepatitis B virus infection. *Curr Opin Immunol*. (査読無) 2015 Oct;36:61-6. doi: 10.1016/j.coi.2015.06.016.

6. Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, Tanaka Y. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One*. (査読有) 2015 Feb 18;10(2) doi:10.1371/journal.pone.0118062.

7. Isogawa M, Tanaka Y. The Immunobiology of Hepatitis B Virus Infection. *Hepatol Res*. (査読無) 2015 Jan;45(2): 179-89. doi: 10.1111/hepr.12439.

[学会発表] (計 50 件)

1. 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. Poster Sessions, The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2016), 2016/11/11, Boston (U. S. A).

2. 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. Poster Sessions, The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2016), 2016/11/11, Boston (U. S. A).

3. 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. Poster Presentation, 2016 International HBV Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2016/9/23, Seoul (Korea).

4. Kawashima K, Isogawa M, Tanaka Y. Retinoic acid inducible gene-I like receptors (RLRs) stimulation suppresses hepatitis B virus (HBV) replication and induces cytolytic ability of HBV-specific CD8 T cells more efficiently than Toll like receptor 3 stimulation. Oral Presentation, 2016 International HBV

Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2016/9/23, Seoul (Korea).

5. Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Suzki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Proanthocyanidin and its analogs are new class of HBV and HDV entry inhibitors that target the viral preS1 region. Poster Presentation, 2016 International HBV Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2016/9/22, Seoul (Korea).

6. 河島圭吾, 五十川正記, 堤進, 村上周子, 齊藤聡, 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. 一般演題口演, 第52回日本肝臓学会総会, 2016/5/19, 東京ベイ幕張ホール 2 階 No.10 (第9会場) (千葉・千葉).

7. 五十川正記, 河島圭吾, 田中靖人. 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. シンポジウム, 第52回日本肝臓学会総会, 2016/5/19, ホテルニューオータニ幕張 2 階 鶴麗・悠 (第1会場) (千葉・千葉).

8. Isogawa M, Kawashima K, Tsutsumi S, Murakami S, Tanaka Y. Clearance rate of hepatitis B virus differs between genotypes in association with CD8+ T cell activation in the liver. Workshop, 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015/11/24, 福岡国際会議場 (福岡・福岡).

9. 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. Poster Sessions, The 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2015), 2015/11/16, Boston (U. S. A).

10. Kawashima K, Isogawa M, Tsutsumi S, Murakami S, Saito S, Nakajima A, Tanaka Y. Differential hepatitis B virus clearance between genotypes is correlated with HBV-specific CD8+T cell responses in the liver. Poster Presentation, 2015 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, 2015/10/7, Dolce Bad Nauheim (Germany).

11. 河島圭吾, 五十川正記, 松波加代子, 堤進, 村上周子, 渡邊綱正, 齊藤聡, 中島淳,

田中靖人. 異なる HBV 遺伝子型間で認められる HBV 抗原遷延化率の違いと肝臓内 CD8+T 細胞応答の相関性, 口頭, 第 51 回日本肝臓学会総会, 2015/5/22, 熊本ホテルキャッスル (熊本・熊本) .

12. 五十川正記, 村田泰洋, 田中靖人. 肝細胞による内因性抗原提示と樹状細胞による外因性抗原提示が HBV 特異的 CD8+T 細胞応答に及ぼす相対的役割, パネルディスカッション, 第 51 回日本肝臓学会総会, 2015/5/22, ホテル日航熊本 (熊本・熊本) .

13. Isogawa M, Murata Y, Sheikh K, Tanaka Y, Chisari FV. Cross-Presentation by Bone Marrow Derived Cells is Required, but not Sufficient, for the Induction of HBV-Specific CD8+ T Cell Responses. The 11th JSH Single Topic Conference. 2014/11/20-21, ホテルグランヴィア広島 (広島・広島) .

15. Isogawa M, Murata Y, Sheikh K, Tanaka Y, Chisari FV; Endogenous Antigen Presentation By Hepatocytes Plays an Essential Role in the Induction of HBV-Specific CD8+ T cell responses. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. 2014/9/5, Los Angeles (USA).

16. 五十川正記, 村田泰洋, 田中靖人. HBV 特異的エフェクターCD8+T 細胞応答誘導における樹状細胞の役割. 第 50 回日本肝臓学会総会. 2014/5/29. ホテルニューオオタニ (東京・東京) .

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/labo/viro.dir/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五十川 正記 (Isogawa, Masanori)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号 : 50723201

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

田中 靖人 (Tanaka, Yasuhito)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 : 90336694

### (4) 研究協力者

なし