

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 感染症実用化研究事業 肝炎等克服実用化研究事業 肝炎等克服緊急対策研究事業

(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名：(日本語) C型肝炎ウイルス排除を目指したワクチン開発に関する研究

(英語) Pathogenesis and Immuno-therapy of Hepatitis C virus Infection

研究開発担当者 (日本語) 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 シニア研究員 小原 道法

所属 役職 氏名：(英語) Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Senior Researcher Michinori Kohara

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) DNA ワクチンの肝炎ウイルス感染における特異的免疫反応の解析

開発課題名：(英語) The effect of HCV prime-boost vaccine in HCV Tg mouse

研究開発分担者 (日本語) 保富 康宏

国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所

霊長類医科学研究センター センター長

所属 役職 氏名：(英語) Yasuhiro Yasutomi

National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition

Tsukuba Primate Research Center, Director

分担研究 (日本語) C型肝炎ウイルスワクチン評価に資する動物モデルの基盤研究

開発課題名：(英語) Basic study on the animal model for the evaluation of hepatitis C virus vaccine

研究開発分担者 (日本語) 小原 恭子

鹿児島大学共同獣医学部 教授

所属 役職 氏名：(英語) Kohara Kyoko

Kagoshima University, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Professor

分担研究 (日本語) HCV ワクチンに用いる Th1 優位アジュバントの化学合成

開発課題名：(英語) Chemical synthesis of Th1-skewing adjuvant for HCV vaccines

研究開発分担者 (日本語) 志馬 寛明 北海道大学大学院医学研究科 助教
所属 役職 氏名: (英語) Hokkaido University Graduate School of Medicine,
Assistant professor Hiroaki Shime

II. 成果の概要 (総括研究報告)

[和文]

HCV の非構造蛋白領域を発現する組換えワクチニアウイルス(HCVN25-rVV)及び DNA ワクチン (HCVN25-DNA) は構造蛋白質を発現する慢性肝炎発症 HCV-CN2/Cre-Tg マウスの肝臓中の HCV コア蛋白量を有意に減少させ、脂肪化、線維化などの形態学的異常を顕著に改善させた。これらの結果は、HCV の持続感染症に対する治療ワクチン有効性を示唆している。しかし、HCV の全コード蛋白質を発現するトランスジェニックマウス (RzB15 マウス) では DNA ワクチンまたは rVV ワクチン単独では微弱な細胞性免疫の誘導しか見られず、肝臓の病理的な解析でも顕著な治療効果は認められず、野生型マウスに比べて HCV Tg マウスでは、ワクチン投与時 CD8 T 細胞性免疫の誘導が抑制されていることを見いだした。また、DNA ワクチンと rVV ワクチン双方を用いる Prima/boost ワクチネーションにおいても、同一の遺伝子領域を発現させていると特異的細胞性免疫は誘導されなかった。そこで、一部の遺伝子領域を重複させた Prime/boost ワクチンを投与したところ、これまで誘導されなかった強い特異的細胞性免疫が誘導され、肝臓の柵状配列の正常化、肝細胞の形態学的正常化が確認された。さらに、肝臓中の HCV コア蛋白質の有意な減少が認められた一方で、肝障害の指標である血中 ALT 値の上昇が見られなかったことから、一部の遺伝子領域を重複させた DNA ワクチン Prime/rVV boost 療法は肝障害を起こさずにウイルス感染細胞に対する有効な特異的免疫応答を誘導させることが示唆された。より高い治療効果につなげるために、この誘導不全に関わる免疫反応及び特異的免疫応答についてさらなる解析を進め、治療的細胞性免疫を強く誘導できるようなワクチン及び免疫法の開発を進める。

また、RNA アジュバントについて 2 重鎖 RNA に DNA キャップを施したものが炎症を誘導せずに樹状細胞を成熟化するため最善との結果を得た。マウス (C57BL/6) モデルで蛋白抗原とこのアジュバントの CTL 誘導能を既知のアジュバント (polyI:C を含む) と比較した。結果、この核酸合成アジュバントが polyI:C と同等の CTL 誘導機能を有することを証明した。細胞障害を示す NK 活性化は polyI:C よりも低かった。

治療ワクチンの効果を評価するための感染モデル動物であるツパイへの高増殖 HCV 株の選択、感染法や発症評価系の改良を行った。HCV 遺伝子型 1a, 1b, 2a, 4a 株のうち、4a 株で安定した感染成立が見られた。また、腹腔内や静脈内接種に比べ皮下接種に良好な結果が得られた。さらに、発症評価系として免疫応答を解析するために HCV-Core 抗体や NS3 抗体のルシフェラーゼを利用した高感度アッセイ系である GLIP 法を確立した。また、サイトカインや TLR の遺伝子発現を解析する定量 PCR 系を確立し、持続感染時の病態解析を進めた。

C 型肝炎に対する免疫治療の実用化に向けて、HCV 遺伝子組換えワクチニアウイルスワクチン及び DNA ワクチンによる治療効果機序の詳細を解明し、安全かつ強力な治療効果を示すワクチンプログラムを確立し、臨床応用への道を拓く。

[英文]

Chronic hepatitis C caused by infection with the hepatitis C virus (HCV) is a global health problem. To investigate potential vaccine and therapeutic strategies against this disease, we generated immunocompetent mice expressing HCV structural proteins using the Cre/loxP switching system. The HCV core protein was

expressed consistently in the livers of these mice following polyinosinic acid–polycytidylic acid injection, and the animals displayed chronic hepatitis C-related pathological features, liver fibrosis, and hepatocellular carcinoma. We examined the therapeutic effects of a recombinant vaccinia virus (rVV) encoding HCV protein in a mouse model. We showed recombinant vaccinia viruses expressing HCV nonstructural protein (rVV-N25) could protect against the progression of chronic hepatitis by suppression of macrophage activation. Macrophages in liver tissue are widely defined as important inflammatory cells in chronic viral hepatitis due to their pro-inflammatory activity. We focused on the role of macrophages for liver disease progression in the HCV transgenic mice and examined characteristic features of macrophages following rVV-N25 treatment.

We generated immunocompetent mice expressing HCV structural proteins through the Cre/loxP switching system and established various attenuated rVV strains. We assessed the effect on the function of macrophages in the liver of a candidate therapeutic HCV vaccine, recombinant vaccinia virus expressing HCV proteins (rVV-N25), which encoded nonstructural HCV proteins. Immunization with rVV-N25 suppressed serum inflammatory cytokine levels and alleviated the symptoms of pathological chronic hepatitis C within 7 days after injection.

Immunization with one of the rVV strains encoding nonstructural proteins (rVV-N25) suppressed serum inflammatory cytokine levels and improved pathological chronic hepatitis C features at 7 days after injection. Furthermore, HCV protein levels in liver tissue also decreased in a CD4 and CD8 T-cell-dependent manner. Consistent with this result, we showed that rVV-N25 immunization induced robust HCV nonstructural protein 2-specific CD8 T-cell immune response. The number of CD11b⁺F4/80⁺CD11c⁺CD206⁺ (M2) macrophages in the liver of HCV transgenic mice was notably increased compared to that of age-matched control mice. These M2 macrophages in the liver produced elevated levels of IL-6 and TNF- α . rVV-N25 infection suppressed the number and activation of M2 macrophages in liver tissue. These results suggested that inflammatory cytokines produced by M2-like macrophages contribute to the induction of chronic liver inflammation in HCV transgenic mice. Collectively, we showed that the therapeutic effect of rVV-N25 results from suppression of the number and activation of hepatic macrophages.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 27 件）

1. Mohammad Enamul Hoque Kayesha, Sayeh Ezzikouric, Haiying Chib, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Bouchra Kitabb, Takumi Haraguchib, Rika Matsuyama, Chimène Nze, Nkogwea, Hitoshi Hatai, Noriaki Miyoshi, Shuko Murakami, Yasuhiro Tanaka, Jun-ichiro, Takano, Yumiko Shiogama, Yasuhiro Yasutomi, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Interferon- α response is impaired by hepatitis B virus infection in *Tupaia belangeri*. *Virus Research* .2017, 237, 47-57
2. Funami, K., H. Oshiumi, M. Shingai, M. Matsumoto, and T. Seya. Functional interfaces between TICAM-2/TRAM and TICAM-1/TRIF in TLR4 signaling. *Biochem Soc Transac*. 2017, (in press).
3. Kayesh MEH, Kitab B, Sanada T, Hayasaka D, Morita K, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K. Susceptibility and initial immune response of *Tupaia belangeri* cells to dengue virus infection. *Infect Genet Evol*. 2017, S1567-1348(17), 30116-8.
4. Yuko Tokunaga, Yosuke Osawa, Takahiro Ohtsuki, Yukiko Hayashi, Kenzaburo Yamaji, Daisuke Yamane, Mitsuko Hara, Keisuke Munekata, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Tsunekazu Hishima, Soichi Kojima, Kiminori Kimura, and Michinori Kohara. Selective inhibitor of Wnt/b-catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Scientific Reports* 2017, 7(1):325.

5. Takaki, H., H. Oshiumi, M. Shingai, M. Matsumoto, and T. Seya. Development of mouse models for analysis of human virus infections. *Microbiol Immunol*. 2017, 61: 107-113.
6. Shime, H., M. Matsumoto, and T. Seya. Double-stranded RNA promotes CTL-independent tumor cytolysis supported by CD11b⁺Ly6G⁺ intratumor myeloid cells through the TICAM-1 signaling pathway. *Cell Death Differ*. 2017. 24: 385-396.
7. Azuma, M., Y. Takeda, H. Nakajima, H. Sugiyama, T. Ebihara, H. Oshiumi. M. Matsumoto, and T. Seya. Biphasic function of TLR3 adjuvant on tumor and spleen dendritic cells promotes tumor T cell infiltration and regression in a vaccine therapy. *Oncoimmunol*. 2016. 5: e1188244.
8. Tatematsu, M., R. Yoshida, Y. Morioka, A. Watanabe, K. Saeki, T. Seya, and M. Matsumoto. Raftlin controls LPS-induced TLR4 internalization and TICAM-1-dependent signalling. *J Immunol*. 2016. 196(9): 3865-3876.
9. Funami, K., M. Matsumoto, M. Tatematsu, C. Obuse, and T. Seya. 14-3-3-zeta participates in TLR3-mediated TICAM-1 signal-platform formation. *Molec Immunol*. 2016. 73: 60-68.
10. Yoshida, S. H. Shime, K. Funami, H. Takaki, M. Matsumoto, Tomiyama, Ishida, M. Kasahara, and T. Seya. Immunostimulatory function of ergothioneine in Tamogi mashroom. *PLoS ONE*. 2016. 12: e0169360.
11. Takeda, Y., M. Azuma, M. Matsumoto, T. Seya. Tumor killing efficacy coincides with CD11c up-regulation in antigen-specific CD8⁺ T cells during Poly(I:C) vaccine immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016. 35: 143.
12. Leong, C. R., H. Oshiumi, M. , M. G. Deng, M. Okamoto, H. Takaki, M. Matsumoto, and T. Seya. ISG20 inhibits HBV replication by degrading RNA of HBV origin. *Oncotarget*. 2016. 7: 68179-68193.
13. Takaki, H., H. Sato, S. Kure, H. Oshiumi, M. Matsumoto, R. Kurata, H. Hikono, T. Saito, and T. Seya. Cytokine response to eye drop adjuvants in chicken. *Microbiol Immunol*. 2016. 60: 511-515.
14. Takashima, K., Y. Takeda, H. Oshiumi, H. Shime, M. Okabe, M. Ikawa, M. Matsumoto, and T. Seya. STING in tumor and host cells cooperatively work for NK cell-mediated tumor growth retardation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016. 478: 1764-1771.
15. EZZIKOURI S, JADID FZ, HAMDI S, WAKRIM L, TSUKIYAMA-KOHARA K, BENJELLOUN S. Supplementing conventional treatment with Pycnogenol® may improve hepatitis C Virus-associated type 2 diabetes: A Mini review. *Journal of Clin. Transl. Hepatol*. 2016, 4(3), 228-33.
16. Okamura T., Tsujimura Y., Soma S., Takahashi I., Matsuo K., Yasutomi Y. Simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection and simian human immunodeficiency virus SHIV89.6P infection result in progression to AIDS in cynomolgus macaques from Asian country origin. *J General Virol* 97;3413-3426,2016
17. Uchihara T., Endo K., Kondo H., Okabayashi S., Shimozawa N., Yasutomi Y., Adachi E., Kimura N. Tau pathology in aged cynomolgus monkeys is progressive suranuclear palsy/corticobasal degeneration - but not Alzheimer disease -like-ultrastructural mapping of tau by EDX-. *Acta Neuropathologica Commun*. 2016 4;118-126,2016
18. Kobayashi M., Koyama T., Yasutomi Y., Sankai T. Male mate choice among captive long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) *Int J Comp Physiol* in press
19. Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant Disruption of Retrograde Trafficking Is Required for Alteration in β -Amyloid Precursor Protein Metabolism. *Am J Pathol* 186:1952-1966, 2016.
20. Tajiri K., Yasutomi Y., Aonuma K. Recent advances in the management of autoimmune myocarditis:

insights from animal studies. Curr Pharm Des. 2016;22;427-439

21. Suzuki S., Mori KI., Higashino A., Iwasaki Y., Yasutomi Y. Maki N., Akari H. Persistent replication of a hepatitis C virus genotype 1b-based chimeric clone carrying E1, E2 and p6 regions from GB virus in a New World monkey. Microbiol Immunol. 2016;60;26-34.
22. Yasuyo Fujishiro, Hiroshi Koie, H. Shibata, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Chieko Ohno, Kiichi Kanayama, Y. Yasutomi, N. Ageyama. Tracking cells implanted into cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) using MRI. Exp Anim. 2016 Jul 29;65(3):311-8.
23. Tsujimura Y., Yasutomi Y. Allergy vaccines using Mycobacterium secreted antigen and IL-4 antagonist. Methods Mol. Biol. 2016;1403:723-738.
24. Takahisa Kouwaki, Yoshimi Fukushima, Takuji Daito, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Edin J. Mifsud, Chean Ring Leong, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya and Hiroyuki Oshiumi. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection. Front. Immunol. 2016, 7, 335.
25. Rebbani K, Kyoko Tsukiyama-Kohara. HCV-Induced Oxidative Stress: Battlefield-Winning Strategy. Oxid Med Cell Longev. 2016, 2016, 7425628.
26. Takahisa Kouwaki, Yoshimi Fukushima, Takuji Daito, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Edin J. Mifsud, Chean Ring Leong, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya and Hiroyuki Oshiumi. Molecular epidemiological study of adenovirus infecting western lowland gorillas and humans in and around Moukalaba-Doudou National Park (Gabon). Virus Genes. 2016, 52(5), 671-8.
27. Chi Hai-Ying, Kiori Nagano, Sayeh Ezzikouri, Chiho Yamaguchi, Mohammad Enamul Hoque Kayesh, Khadija Rebbani, Bouchra Kitab, Hirohumi Nakano, Hiroyuki Kouji, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Establishment of an intermittent cold stress model using *Tupaia belangeri* and evaluation of compound C737 targeting neuron-restrictive silencer factor. Exp Anim. 2016, 65(3), 285-92.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ツパイ周期性寒冷ストレスモデルの樹立と NRSF を標的とした C737 化合物の評価
口頭、池海英、永野希織、山口千穂、Kayesh, MEH., Khadija, R., Bouchra, K., 中野洋文、小路弘行、小原道法、小原（築山）恭子、第 63 回日本実験動物学会総会 2016/5/18、国内
2. 新規ウイルス感染実験動物 *Tupaia belangeri* の開発、口頭、小原恭子、真田崇裕、小原道法、第 12 回広島肝臓プロジェクトシンポジウム、2016/6/25、国内
3. Susceptibility of tupaia cells to dengue virus infection and their initial immune response. 口頭、Kitab, B., Kayesh, MEH, Sanada, T., Hayasaka, D., Morita, K., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. 第 53 回日本ウイルス学会九州支部総会、2016/9/2、国内
4. Pathogenesis and Immuno-therapy of Hepatitis C virus Infection. 口頭、Tsukiyama-Kohara, K., Sekiguchi, S., Kimura, K., Ohtsuki, T., Tokunaga, Y., Kohara, M. 10th Vaccine Congress、2016/9/7、国外
5. Innate Antiviral Immune Responses to Hepatitis B Virus in *Tupaia belangeri*. ポスター、Kayesh, MEH, Sanada, T., Yamamoto, N., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. HBV2016, 2016/9/21、国外
6. Transcriptome profiling reveals quick immune response in the early stage of HBV infection in *Tupaia belangeri*. ポスター、Sanada, T., Tsukiyama-Kohara, K., Yamamoto, N., Kohara, M. HBV2016, 2016/9/21、国外

7. Serum DHCR24 auto-antibody as a new biomarker for prognosis of hepatitis C. 口頭、Ezzikouri, S., Kimura, K., Kaneko, S., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. 第 75 回日本癌学会 2016/10/7、国内
8. Hepatitis C virus replication requires ribonucleotide reductase M2 to stabilize NS5B protein. 口頭、Kitab, B., Satoh, M., Sudoh, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. HCV2016, 2016/10/12、国内
9. Innate Antiviral Immune Responses to Hepatitis Viruses in *Tupaia belangeri*. ポスター、Kayesh, MEH, Ezzikouri, S., Chi, H., Sanada, T., Yamamoto N., Kitab, B., Matuu, A., Hatai, H., Miyoshi, N., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. HCV2016, 2016/10/12、国内
10. Innate immune response to Hepatitis C virus or Hepatitis B virus in *Tupaia belangeri* Liver or PBL. 口頭、Kayesh, MEH, Ezzikouri, S., Chi, H., Miyoshi, N., Sanada, T., Yamamoto, N., Matsuu, A., Horie, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016/10/23、国内
11. B型肝炎ウイルス (HBV) 分子クローンを用いたHBV持続感染ツパイモデルの確立, ポスター, 高野 淳一朗・塩釜 ゆみ子・相馬 祥吾・山本 直樹・小原 道法・保富 康宏, 第64回日本ウイルス学会, 2016/10/23~2016/10/25, 国内.
12. 新規実験動物モデル「ツパイ」の開発、口演 (招待講演) 小原恭子 第 39 回九州実験動物研究総会 2016/10/29、国内
13. 肝炎ウイルスの病原性と病態モデル、口演 (招待講演) 小原恭子、第 12 回霊長類医科学フォーラム 2016/11/18、国内
14. ツパイ周期性寒冷ストレスモデルの樹立と NRSF を標的とした C737 化合物の評価、ポスター、池海英、永野希織、山口千穂、Kayesh, MEH., Khadija, R., Bouchra, K., 中野洋文、小路弘行、小原道法+, 小原 (築山) 恭子 第 39 回日本分子生物学会年会 2016/12/2、国内
15. インフルエンザウイルス感染阻害活性を示すヘマグルチニン結合性特殊環状ペプチド、ポスター、齊藤誠、安井文彦、棟方翼、飛田良美、小澤真、小原恭子、伊東利紗、菅裕明、窪田規一、小原道法 第 39 回日本分子生物学会年会 2016/12/2、国内
16. 保富康宏 結核ワクチンの開発 大阪シンポジウム 2016 年 12 月 17 日 大阪
17. 新規感染動物モデル「ツパイ」の開発、口演 (招待講演) 小原恭子 第 2 回 鹿児島大学感染症制御のためのシンポジウム 2017/1/23、国内
18. 保富康宏 Novel TB Vaccine シンポジウム 第 6 回国債結核肺疾患予防連合学術大会 2017 年 3 月 22-25 日 東京

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 該当なし

(4) 特許出願

該当なし

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業) 成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 肝炎等克服緊急対策研究事業
(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

補助事業課題名：(日本語) C型肝炎ウイルス排除を目指したワクチン開発に関する研究
(英語) Development of novel therapeutic vaccine for chronic hepatitis C virus disease

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官 鈴木 亮介
所属 役職 氏名：(英語) Ryosuke Suzuki, Ph. D. Senior Researcher
Department of Virology II
National Institute of Infectious Diseases

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究課題名：(日本語)
(英語)

補助事業分担者 (日本語)
所属 役職 氏名：(英語)

II. 成果の概要(総括研究報告)

補助事業代表者：東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト プロジェクトリーダー 小原道法 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 件、国際誌 件)
- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
- (4) 特許出願