

令和元年6月12日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08746

研究課題名(和文) B型肝炎ワクチンに対する初期および記憶免疫応答に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of the initial immune-responsiveness and memory immunity to the hepatitis B vaccine

研究代表者

宮坂 昭生 (Miyasaka, Akio)

岩手医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80382597

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)：B型肝炎ワクチンに対する免疫応答を明らかにするため、5人の健常者を対象としてワクチン接種前後のT細胞受容体鎖(TCR chain)およびB細胞受容体IgG重鎖(BCR IgG H chain)について解析を行なった。ワクチン2回接種後のTCR chain、BCR IgG H chainレパトアの変化はHBs抗体獲得と関連していると考えられた。TCR chain、BCR IgG H chainレパトアは同じ数のリード数が変化していた。HBワクチンに対する特異的なクローンは同定できなかった。HBs抗体獲得後の免疫記憶の有効性の検討ではワクチン接種経験者の血液中に記憶B細胞が僅かに存在した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBワクチンに対する初期免疫応答について解析を行ない、HBs抗体獲得者において2回接種後のTCR chainレパトア、BCR IgG H chainレパトアの変化はHBs抗体獲得のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された。今後、さらに解析をすすめることにより不応例への対策やワクチン回数を減らすための方策などに役立つと考えられた。

また、HBワクチン接種歴ある者ではmemory B細胞は末梢血中に僅かに存在している可能性があった。HBワクチンのユニバーサルワクチン化が施行されるようになりHBs抗体獲得後の免疫記憶の有効性を明らかにすることは追加接種を減らすなどの有用性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify an immune response for the hepatitis B (HB) vaccine, we conducted high-throughput sequencing of the T cell receptor (TCR) beta chain and B cell receptor (BCR) IgG heavy (H) chain complementary determining region 3 (CDR3) repertoires in 5 volunteers before and after the immunizations with the HB vaccine. The all 5 participants acquired HBs antibody. The TCR beta chain CDR3 repertoire diversity significantly increased, while the BCR IgG H chain CDR3 repertoire diversity significantly decreased after the second vaccination. These diversity changes might be associated with a better response to the HB vaccine. It is possible that the TCR beta chain and BCR IgG H chain CDR3 repertoires may have changed within the same numbers of unique reads. Our data failed to identify the specific dominant clones that responded to the HB vaccine. As for our investigation of the memory immunity, the HB-vaccinated subjects had very low numbers of memory B cells in their peripheral blood.

研究分野：肝臓

キーワード：HBワクチン TCR レパトア BCR IgG H chain レパトア

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 (hepatitis B virus: HBV) は血液もしくは血性体液を介して感染する肝炎ウイルスであり、その感染性は極めて高く、通常、成人が HBV に感染すると、約 20~30% が急性肝炎を発病するが、稀に劇症肝炎へと進展する場合がある。一方、母子感染や乳幼児期に HBV 感染を受けると約 90% が HBV キャリアとなり、成人になって肝炎、肝硬変、肝癌へと進展する例がある。HBV キャリアの母親から生まれた子供に生後 B 型肝炎ワクチン (HB ワクチン) と抗 HBs 人免疫グロブリンを投与することで HBV 感染を防ぐことを目的とした母子感染防止事業が 1985 年から始まり、現在、乳幼児の HBs 抗原陽性率は 0.05% 未満まで減少している。しかし、HBV は水平感染によっても伝播し、成人での HBV 感染は減少していないばかりでなく、約 10% が慢性化するとされる Genotype A の B 型肝炎が增加している。乳幼児期の感染は年少児ほど持続感染へ移行する可能性が高い。HBs 抗原陰性、HBs 抗体陽性といった臨床的治癒の状態でも肝臓内で感染性のある HBV が産生され続け免疫が弱まると HBV の再活性化が起こる。といった問題があるため HB ワクチン投与により HBV 感染を未然に防ぐことが望まれる。

HB ワクチンは HBs 抗原を酵母で発現させた不活化ワクチンであり、予防のためには、0 ヶ月、1 ヶ月後、6 ヶ月後と 3 回接種が必要であるが、HB ワクチンに反応しない不応例も存在する。一般に、HB ワクチン接種後、抗原が抗原提示細胞に取り込まれ分解産物と HLA が細胞表面に提示され、CD4<sup>+</sup>T 細胞が活性化される。また、抗原自体が B 細胞受容体に認識され、初期には IgM 抗体が分泌されるが、その後、活性化 CD4<sup>+</sup>T 細胞の補助を受けた活性化 B 細胞が形質細胞に分化し、IgG 抗体が産生されるとされているが、抗体獲得率は年齢が上がるほど低下するなど、HBs 抗体を獲得するための免疫応答については不明な点も多い。また、抗体獲得後に HBs 抗体価が低下する例に対して追加接種が必要であるかについても議論がある。

## 2. 研究の目的

今回、HB ワクチンに対する初期免疫応答の機序および HBs 抗体獲得後の免疫記憶の有効性を明らかにすることを目的として本研究を行なった。

## 3. 研究の方法

### (1) HB ワクチンに対する初期免疫応答の検討

初回 HB ワクチン接種予定の健常者 5 名 (男性 5 名、平均年齢 23.4 歳) を対象として HB ワクチン接種前、HB ワクチン 2 回接種後、HB ワクチン 3 回接種後に採血を行ない、HB ワクチン接種前の HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体および HLA-DPB1、HLA-DQB1、HLA-DRB1 typing、HB ワクチン 2 回接種後、HB ワクチン 3 回接種後の HBs 抗体を測定するとともに、HB ワクチン接種前、HB ワクチン 2 回接種後、HB ワクチン 3 回接種後に T 細胞受容体 (TCR) / B 細胞受容体 (BCR) レパトア解析を行った。

なお、HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体は CLIA 法、HLA-DPB1、HLA-DQB1、HLA-DRB1 typing は SBT 法で測定を行ない、T 細胞受容体 (TCR) / B 細胞受容体 (BCR) レパトアについては、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) を分離し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) で RNA を抽出後、5' 末端 (多様性をもつ遺伝子の外側) にアダプターを結合し、アダプタープライマーと (多様性のない) 3' 側の定常領域に設定したプライマーを用いて PCR を行い (非バイアス遺伝子増幅技術)、PCR 増幅された TCR や BCR 遺伝子を次世代シーケンサーで配列決定後、解析を行なった。

### (2) HBs 抗体獲得後の免疫記憶の有効性の検討

HB ワクチン接種歴のある健常者 16 名の末梢血を採取し、比重遠心法により PBMCs を分離した。CD19 磁気マイクロビーズを用いて PBMCs より CD19<sup>+</sup>B 細胞を分離し分離された CD19<sup>+</sup>B 細胞に HBs 抗原結合マイクロビーズを加えた後、PE 標識 HBs 抗原、さらに、FITC 標識抗 CD27 抗体、PreCP 標識抗 CD14 抗体、APC 標識抗 CD19 抗体を加え、HBs 抗原特異的 memory B 細胞をフローサイトメトリーで分析した。対照者として HB ワクチン接種歴のない健常者 5 名についても同様の解析を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 研究結果

#### HB ワクチンに対する初期免疫応答の検討

HB ワクチン接種後、抗原が抗原提示細胞に取り込まれ、分解産物と HLA class II が細胞表面に提示され、CD4<sup>+</sup>T 細胞の TCR により認識され CD4<sup>+</sup>T 細胞が活性化するため、今回、次世代シーケンサーを用いて T 細胞受容体鎖 (TCR chain) について解析を行なった。また、抗原自体が BCR に認識され、初期には IgM 抗体が分泌されるが、その後、活性化 CD4<sup>+</sup>T 細胞の補助を受けた活性化 B 細胞が形質細胞に分化し、IgG 抗体が産生されるとされているため、同時に B 細胞受容体 IgG 重鎖 (BCR IgG H chain) についても解析を行なった。その結果、

- A. HBs 抗体価は、HB ワクチン 2 回接種後 10mIU/mL 未満であったが、3 回接種後 10mIU/mL 以上であり、5 例全例が HBs 抗体を獲得した。
- B. 5 例全例が HBs 抗体を獲得したため、HLA-DPB1、HLA-DQB1、HLA-DRB1 との明らかな関係は見いだせなかった。

- C. HB ワクチン 2 回接種後に TCR chain レパトアは上昇、BCR IgG H chain レパトアは低下していた (Figure.1)。
- D. 上記 A,C より、HBs 抗体獲得者においては HB ワクチン 2 回接種後 HBs 抗体価は 10mIU/mL 未満ではあったが、TCR chain レパトア、BCR IgG H chain レパトアには変化があったため、その変化は HBs 抗体獲得のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された。

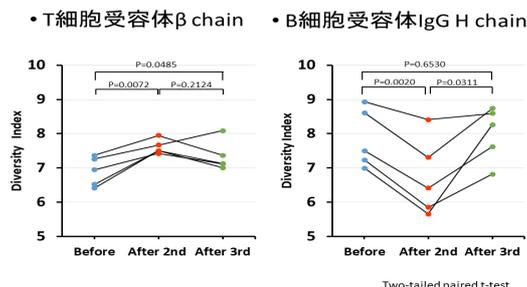


Figure.1 Diversity index の変化

- E. TCR と BCR IgG H chain のリード数の分布は 50%以上が 1 であり、個人間や HB ワクチン接種前、HB ワクチン 2 回接種後、HB ワクチン 3 回接種後で変化はなかった。
- F. TCR および BCR IgG H chain レパトアの 3D image すなわち、TCR chain V segment と TCR chain J segment、BCR IgG H chain V segment と BCR IgG H chain J segment においても個人間や HB ワクチン接種前、HB ワクチン 2 回接種後、HB ワクチン 3 回接種後で明らかな変化はとらえられなかった。
- G. HB ワクチン接種前と HB ワクチン 2 回接種後、HB ワクチン接種前と HB ワクチン 3 回接種後、HB ワクチン 2 回接種後と HB ワクチン 3 回接種後を比較して、最も変化に富む部位である complementary determining region 3(CDR3)は TCR で 0.69%-3.36%、BCR IgG H chain で 0.21%-1.94%しか変化していなかったことより、ほとんどが変化していると考えられた。
- H. HB ワクチン接種前と HB ワクチン 2 回接種後、HB ワクチン接種前と HB ワクチン 3 回接種後の比較では、増加した TCR と BCR IgG H chain のクローン Top 3 は、TCR chain においては 5 人中 3 人に同一のクローンがみられたが、BCR IgG H chain においては同一なクローンの増加はみられなかった。

#### HBs 抗体獲得後の免疫記憶の有効性の検討

HB ワクチン 3 回接種後の HBs 抗体価は、個人差があり、経時的に低下するが、HBs 抗原特異的 memory B 細胞の機能と反応性が確認できれば、追加接種を減らすことが可能性となる。HB ワクチン接種歴ある者と HB ワクチン接種歴のない者の PBMCs を分離後、マイクロビーズを用いて分離した B 細胞に標識付 CD19, CD14, CD27 抗体を加え、さらに HBs 抗原および標識付 HBs 抗体を添加した前後でフローサイトメトリーを用いて解析を行なった。その結果、HB ワクチン接種歴ある者では memory B 細胞は末梢血中に僅かに存在している可能性がある。

#### (2) 成果の位置づけ

##### HB ワクチンに対する初期免疫応答の検討

HB ワクチンに対する応答については年齢、HLA 遺伝子多型、サイトカイン受容体遺伝子、Toll-like receptor などの報告があるが、今回、HB ワクチンに対する初期免疫応答に関して、TCR chain、BCR IgG H chain について、次世代シーケンサーを用いて解析を行なった。HBs 抗体獲得者において HB ワクチン 2 回接種後 HBs 抗体価は 10mIU/mL 未満ではあったが、TCR chain レパトア、BCR IgG H chain レパトアに変化がみられたため、HB ワクチン 2 回接種後には HBs 抗体産生のための準備ができていたものと考えられ、それらの変化は HBs 抗体獲得のサロゲートマーカーとなる可能性が示唆された。

##### HBs 抗体獲得後の免疫記憶の有効性の検討

HB ワクチン接種歴ある者では memory B 細胞は末梢血中に僅かに存在している可能性があった。HB ワクチンのユニバーサルワクチネーションが施行されるようになったが、追加接種の必要性については議論がある。しかし、追加接種前に HBs 抗原特異的 memory B 細胞の発現およびその反応性を確認できれば不必要な追加接種が減ることになるためさらに研究をすすめることは有用であると考えられた。

#### (3) 今後の展望

##### HB ワクチンに対する初期免疫応答の検討

今回の検討は少数例の検討であったため、症例数を増やして検討する必要がある。また、T 細胞のサブセットを含めた解析も今後の課題である。さらに、初期免疫応答の解析をすすめるにより、不応例への対策や、ワクチン回数を減らすための方策や混合接種の対策などに役立つ

と考えられる。

HBs 抗体獲得後の免疫記憶の有効性の検討

今回の測定法では、はっきりした結果が得られなかったため、測定法を含め再考する必要がある。また、HBs 抗原特異的であるかの検討も必要であるため、新たな知見と新たな測定を追加して研究をすすめてゆく必要があると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Miyasaka A, Yoshida Y, Wang T, Takikawa T. Next-generation sequencing analysis of the human T-cell and B-cell receptor repertoire diversity before and after hepatitis B vaccination. Hum Vaccine Immunother. 2019 Apr 4. doi: 10.1080/21645515.2019.1600987. [Epub ahead of print] **査読有り**

Kakisaka K, Sakai A, Yoshida Y, Miyasaka A, Takahashi F, Sumazaki R, Takikawa Y. Hepatitis B Surface Antibody Titers at One and Two Years after Hepatitis B Virus Vaccination in Healthy Young Japanese Adults. Intern Med. 2019 May 22. doi: 10.2169/internalmedicine.2231-18. [Epub ahead of print] **査読有り**

Sakai A, Noguchi E, Fukushima T, Tagawa M, Iwabuchi A, Kita M, Kakisaka K, Miyasaka A, Takikawa Y, Sumazaki R. Identification of amino acids in antigen-binding site of class II HLA proteins independently associated with hepatitis B vaccine response. Vaccine. 35(4): 703-710, 2017. **査読有り**

〔学会発表〕(計 3 件)

宮坂昭生、黒田英克、柿坂啓介、及川隆喜、吉田雄一、遠藤啓、鈴木悠地、佐藤寛毅、阿部珠美、藤原裕大、岡本卓也、米澤美希、滝川康裕 . 当科における肝硬変の成因別実態 . 第 54 回日本肝臓学会総会 (大阪) 2018 年 6 月 .

吉田雄一、米澤美希、鈴木彰子、宮坂昭生、滝川康裕 . 北東北における B 型肝炎ウイルス genotype A 感染による肝障害の検討 . 第 54 回日本肝臓学会総会 (大阪) 2018 年 6 月 .

宮坂昭生、吉田雄一、滝川康裕 . 次世代シーケンサーを用いた HBV ワクチン接種前後の末梢血中における免疫多様性の検討 . 第 21 回日本ワクチン学会学術集会 (福岡) 2017 年 12 月 .

〔図書〕(計 1 件)

宮坂昭生、黒田英克、柿坂啓介、及川隆喜、吉田雄一、遠藤啓、鈴木悠地、佐藤寛毅、阿部珠美、藤原裕大、岡本卓也、米澤美希、滝川康裕 . 当科における肝硬変の成因別実態 . 医学図書出版 . 肝硬変の成因別実態 2018 . 2019 , 165 ( 36-37 ) .

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 滝川 康裕

ローマ字氏名 : ( Takikawa, Yasuhiro )

研究協力者氏名 : 王 挺

ローマ字氏名 : ( Tang, Wang )

研究協力者氏名 : 吉田 雄一

ローマ字氏名 : (Yoshida, Yuichi )

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。