

C型肝炎に対する樹状細胞の機能制御による 細胞免疫治療法の開発

Regulation of dendritic cell function and cell-based
therapy in chronic hepatitis C virus infection

林 紀夫 (Hayashi Norio)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

C型肝炎において樹状細胞の数的・機能的異常があることをサブセットレベルで明らかにした。その分子基盤として Toll 様レセプターや RIG-I などのパターン認識受容体の発現レベル、シグナル伝達に変調があることを示した。また、ミエロイド DC が HCV に対して感受性であることを実験的に証明した。C型肝炎における持続 ALT 正常化やインターフェロン/リバビリン治療による生化学的な肝炎の鎮静化に制御性 T 細胞の増加が関与しており、予測因子としての可能性を示した。C型肝炎では樹状細胞による NK 細胞の活性化に障害があり、この活性化には MICA-NKG2D を介した新規の分子メカニズムがあることを明らかにした。さらに、C型肝炎では NK 細胞の NKG2A 抑制レセプターの発現亢進があり、肝がんに進展すると NKG2D 活性化レセプターの発現低下が起こることを見出した。先天免疫細胞が豊富であるという肝臓の特殊性を考慮し、NKT、NK 細胞の活性化を標的とした DC 治療の具体的な方法論を提示した。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード：C型肝炎、肝がん、樹状細胞、NK細胞、自然免疫

1. 研究開始当初の背景・動機

C型肝炎は効率に持続感染をおこし、インターフェロン治療に対しても抵抗性を示す症例があることが問題となっている。このような病態の免疫学的な背景を明らかにするために樹状細胞 (DC) や NK 細胞を中心とした自然免疫担当細胞に焦点をあてて解析し、このような細胞の機能修飾が C型肝炎の病態の改善に寄与するかどうか明らかにするために研究を行う。

2. 研究の目的

(1) C型肝炎患者における DC サブセットの機能解析 (2) HCV の DC サブセットへの感染機構の解析 (3) DC サブセットによる NK 細胞活性化機構の解析 (4) DC サブセットによる CD4 ヘルパー T 細胞 polarization の制御機構の解析 (5) DC サブセットの in vivo mobilization の検討

3. 研究の方法

【ヒト末梢血リンパ球の機能解析】フローサイトメトリー解析、細胞内染色、MACS によるソーティング、エリスポットアッセイ、ELISA によるサイトカインアッセイ、末梢血単球からの樹状細胞の分化誘導

【動物モデルでの解析】骨髄細胞からの樹状細胞の分化誘導、フローサイトメトリー、MACS、エリスポット、ELISA、マウスへのヒトあるいはマウス細胞の接種、マウスへの遺伝子投与 (ハイドロダイナミックインジェクション)、アデノウイルスベクターの作成、免疫不全マウスの遺伝子型解析

4. 研究の主な成果

C型肝炎慢性肝炎では DC に主要なサブセット (MDC、PDC) における数の減少と機能の低下がみられた。HCV 感染により MDC の Th1 誘導能が低下し、MDC、PDC の調節性 T 細胞誘導能が増強した。後者は特に持続 ALT 正常者で顕著であった。C型肝炎患者の MDC は RIG-I や TLR2/4 を過剰発現していたが、それぞれのリガンド刺激によるサイトカイン産生能 (IFN β 、TNF α 、

IL-12p70) が低下していた。その分子基盤としてこれらのパターン認識レセプターの下流にあるアダプター分子 TRIF、TRAF6 の発現低下があることが示された。HCV の E1E2 蛋白を介した細胞へのウイルス侵入を評価できる pseudo-HCV の実験系を用いて、健常者由来の様々な DC に対する感染効率を評価した。検討した DC のなかで GM-CSF で誘導した Day 4 の単球由来 DC が Pseudo-HCV に対して最も高い感受性を示した。DC はある特定の成熟段階において HCV 感染に対して感受性となり、このことが DC の数的、機能的異常に関与する可能性が示唆された。DC による NK 細胞活性化の新規のメカニズムとして 1 型 IFN による DC の MICA 発現とそれによる NK 細胞の NKG2D 活性化機構が存在することを明らかにした。C 型肝炎患者ではこの活性化機構が減弱しており。その機序として 1 型 IFN による IL-15 産生低下があることを明らかにした。C 型肝炎患者では NK 細胞の抑制性レセプター NKG2A の発現が低下しており、肝がん細胞に対する細胞傷害性が低下していることを明らかにした。C 型肝炎における持続 ALT 正常化の成立やインターフェロン/リビリン治療による生化学的な肝炎の鎮静化に制御性 T 細胞の誘導が関与することを示した。進行した肝疾患である肝がんにおいては樹状細胞の機能低下が認められる。このような障害を克服し、細胞治療を実現するには樹状細胞の機能を最大限に引き出すことが必要である。マウス担がんモデルを用いて樹状細胞への IL-12 の導入が樹状細胞機能を改善し、抗腫瘍効果を増強することを示した。また、NKT 細胞のリガンドである α GalCer は、これを樹状細胞にパルスすることにより NKT 細胞の活性化が強い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。この効果は腫瘍抗原由来のペプチドパルスよりも強力であった。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

C 型肝炎において樹状細胞と NK 細胞に機能異常がみられ、その機序として TLR/RIG-1 経路および NK レセプター経路に異常があることを同定した。このような機能障害の分子基盤を明らかにしたことは世界に先駆けた研究成果である。また、自然免疫細胞が豊富な肝臓の特殊性から、これらの細胞の活性化を目標にした樹状細胞による細胞治療の具体的な戦略をマウスモデルを用いて示した。

6. 主な発表論文

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)
Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, **Hayashi N**. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on interferon α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170:1249-1256, 2003.

Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Suzuki T, Miyagi T, **Hayashi N**. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 171: 5423-5429, 2003.

Kaimori A, Kanto T, Limn CK, Komada Y, Oki C, Inoue M, Miyatake H, Itose I, Sakakibara M, Yakushijin T, Takehara T, Matsuura Y, **Hayashi N**. Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324: 74-83, 2004.

Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, **Hayashi N**. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173: 6072-6081, 2004.

Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, **Hayashi N**. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190: 1919-1926, 2004.

Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Sakamori R, Yamaguchi S, **Hayashi N**. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 43: 1013-1020, 2005.

Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Sakamori R, Ohkawa K, Kohga K, Uemura A, **Hayashi N**. Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. *Hepatology* 45: 22-30, 2007.

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.htm>