

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな(ローマ字)		HAYASHI NORIO					
①研究代表者氏名		林 紀夫		②所属研究機関・部局・職		大阪大学・大学院医学系研究科・教授	
③研究課題名	和文	C型肝炎に対する樹状細胞の機能制御による細胞免疫療法の開発					
	英文	Immunotherapy for chronic hepatitis C by modulating dendritic cell functions					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		22,800	18,900	18,000	13,500	13,500	86,700
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
林 紀夫	大阪大学・大学院医学系研究科・教授	消化器病学	研究の総括、樹状細胞機能の解析				
竹原 徹郎	大阪大学・大学院医学系研究科・助教授	消化器病学	HCV 遺伝子発現ベクターの構築、動物実験、NK 細胞に関する検討				
考藤 達哉	大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座・助教授	消化器病学	樹状細胞分離と機能解析				
平松 直樹	大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座・助手	消化器病学	Pseudo-HCV を用いた感染能の解析				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>現在、難治性 C 型肝炎に対する標準的な治療としてペグインターフェロンとリバビリンの1年間投与が行われているがウイルスの排除率は 50%にとどまっております。新たな治療戦略の開発が必要である。樹状細胞（DC）は強力な抗原提示細胞であり、ウイルス、癌などに対する免疫応答の中心的役割を果たしている。また、DC のみならずナチュラルキラー（NK）細胞などの初期免疫担当細胞もその後の獲得免疫応答の形成に関与することが明らかにされつつある。我々は C 型肝炎患者において DC の機能が低下していることを明らかにした。本研究課題では、C 型肝炎ウイルス（HCV）に対する免疫応答を賦活化し、生体より排除する治療法を開発するため、1) HCV 感染における DC サブセットの機能的意義の解明、2) HCV 感染による DC 機能低下の分子機序の解明、3) DC と初期免疫担当細胞との相互作用の解明、4) HCV 感染におけるインターフェロン反応性の低下の分子機構の解明を中心に研究を行う。</p>							

⑦これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1. C型慢性肝炎患者における樹状細胞（DC）サブセットの数的・機能的解析

末梢血単核球の中で lineage マーカー（CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56）が陰性で HLA-DR 陽性の細胞を DC とし、さらに CD11c と CD123 の染色性でミエロイド DC（lineage(-), HLA-DR(+), CD11c(+), CD123(+)) と形質細胞様 DC（lineage(-), HLA-DR(+), CD11c(-), CD123(++)) を同定した。ミエロイド DC、形質細胞様 DC のいずれも C 型慢性肝炎患者群では非感染者群に比較し有意にその数が低下していた。また、機能的にもサイトカイン産生能および T 細胞に対する同種刺激能が低下していた。また、naïve T 細胞に対する刺激が Th2 にシフトしていた。

2. Pseudo-HCV を用いた感染系の構築

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。このようなことから、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であることが明らかとなった。

3. DC による NK 細胞活性化機構の解析

末梢血単球分画より GM-CSF と IL-4 を用いて未成熟 DC を誘導し、IFN α あるいは IL-15 で 24 時間刺激を加えた。刺激後の DC は刺激前に比し、NK 細胞活性化能が増強しており、これは刺激による MICA/B の発現誘導によるものであった。C 型慢性肝炎患者の DC は IL-15 に対する反応性は保たれていたが、IFN α に対しては反応性が欠如していた。

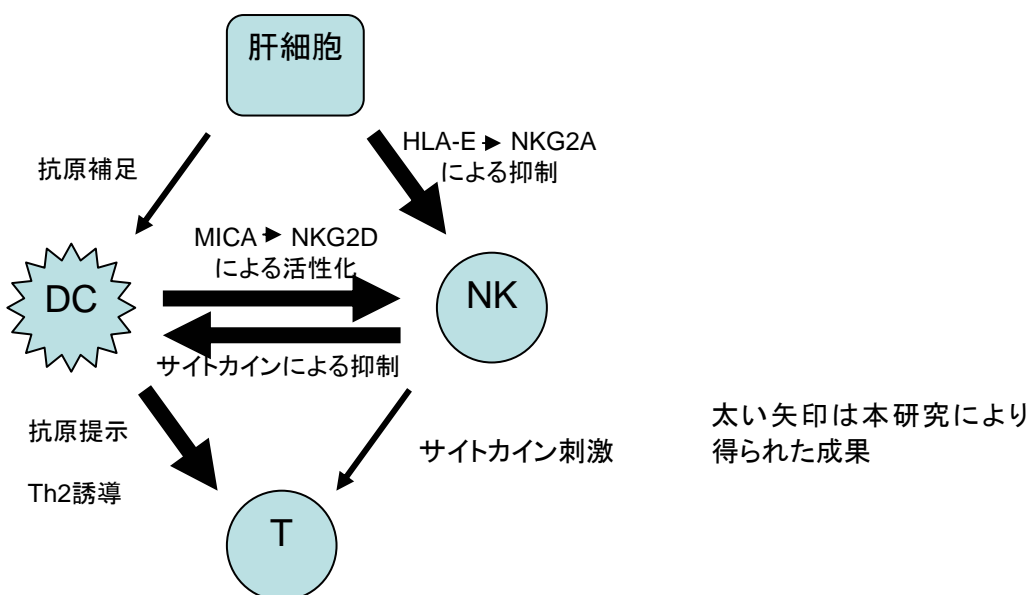
4. NK 細胞レセプターの発現解析と DC の機能修飾

C 型肝炎患者と健常者において NK 細胞に発現する抑制性レセプターと活性化レセプターの発現を網羅的に解析し、C 型肝炎患者では CD94/NKG2A 抑制性レセプターが高発現していることを明らかにした。肝細胞は NKG2A のリガンドである HLA-E を発現しており、C 型肝炎患者の NK 細胞は肝細胞に対して低反応性であった。また、NK 細胞による DC の活性化は肝細胞の存在下において低下していた。

以上の研究成果より、

C 型肝炎患者では単球由来 DC のみならず、流血中の DC の各サブタイプの数と機能に異常が認められることが明らかとなった。このような DC の数的・機能的異常に HCV 感染が関与している可能性を示した。また、DC は他の先天免疫担当細胞である NK 細胞との間に相互作用があり、DC の機能低下が NK 細胞の活性化を抑制し、NK 抑制性レセプターの高発現による NK 細胞の機能低下が DC の活性化を抑制していることを明らかにした。

初期免疫担当細胞による獲得免疫応答の制御



⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1. 樹状細胞による NK 細胞活性化の分子機序解明

樹状細胞 (DC) は生体内で最も強力な抗原提示細胞であり、従来 T 細胞を活性化する細胞と考えられてきた。1999 年に Fernandez らが DC の活性化により NK 細胞が活性化されるという現象を見出し、先天免疫応答における意義についても急速に注目されるようになっていく。今回の研究により 1 型インターフェロン刺激による DC の NK 細胞の活性化に MICA-NKG2D 活性化機構が関与することが示された。DC による NK 細胞の活性化の分子機構をはじめて明らかにしたものであり基礎的な研究としても新規性の高い成果である。

2. 「疾患における NK 細胞レセプターの発現異常による樹状細胞機能修飾」という新たな概念の提示
C 型肝炎においては NK 細胞の機能が低下しているという報告とこれを否定する報告があり一致した見解は得られていなかった。従来の研究はクラシカルな NK 感受性細胞 (K562 細胞株など) を標的とした NK 細胞活性を解析した研究が主であり、本研究課題のように NK 細胞の活性を NK 細胞レセプターの観点から解析した研究はなかった。今回の研究により HCV 感染者においてレクチン型抑制性レセプターである CD94/NKG2A の発現亢進がみられることを見出された。NK 細胞が DC 機能を制御するという現象は近年急速に解析が進んでいるが、DC 機能を NK 細胞レセプターの機能修飾により制御できることを示したのは今回の研究成果がはじめてである。このことは疾患による NK 細胞の発現異常が樹状細胞の機能を修飾し得るという新たな概念を提示したものである。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

論文発表

1. Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. **J Gastroenterol Hepatol** 18(1):32-40, 2003.
2. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Groh V, Spies T, Kimura R, Miyagi T, Mochizuki K, Sasaki Y, Hayashi N. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and their regulation by retinoic acid. **Int J Cancer** 104(3):354-361, 2003.
3. Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Ishida H, Jinushi M, Miyagi T, Sasaki Y, Hayashi N. Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice. **Biochem Biophys Res Commun** 300(3):784-788, 2003.
4. ○ 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(3):1249-1256, 2003.
5. Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Sato A, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Changes in gene expression profile by HCV core protein in cultured liver cells: analysis by DNA array assay. **Hepatol Res** 25(4): 396-408, 2003.
6. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Suzuki T, Jinushi M, Sugimoto Y, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. CD1d-mediated stimulation of natural killer T cells selectively activates hepatic natural killer cells to eliminate experimentally disseminated hepatoma cells in murine liver. **Int J Cancer** 106(1): 81-89, 2003.
7. Iyoda K, Sasaki Y, Horimoto M, Toyama T, Yakushijin T, Sakakibara M, Takehara T, Fujimoto J, Hori M, Wands JR, Hayashi N. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. **Cancer** 97(12): 3017-3026, 2003.
8. Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Sato A, Nakanishi F, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Hepatitis C virus core protein differentially regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. **J Biol Chem** 278(31): 28562-28571, 2003. [2003 Aug 1;278(31):28562-71]
9. 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(10): 5423-5429, 2003.
10. Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Ueda K, Takehara T, Hori M, Hayashi N. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. **J Biol Chem** 279(12): 11719-11726, 2004.
11. 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(1): 74-83, 2004.
12. Hiramatsu N, Kasahara A, Nakanishi F, Toyama T, Tsujii M, Tsuji S, Kanto T, Takehara T, Kato M, Yoshihara H, Naito M, Katayama K, Hijioka T, Hagiwara H, Kubota S, Oshita M, Meren H, Masuzawa M, Haruna Y, Mita E, Suzuki K, Hayashi N. The significance of interferon and ribavirin combination therapy followed by interferon monotherapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. **Hepatol Res**(3) 29: 142-147, 2004.
13. Ishida H, Ohkawa K, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Ueda K, Takehara T, Hayashi N. Involvement of p38 signaling pathway in interferon- α -mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. **Biochem Biophys Res Commun** 321(3): 722-727, 2004.

14. Toyama T, Sasaki Y, Horimoto M, Iyoda K, Yakushijin T, Ohkawa K, Takehara T, Kasahara A, Araki T, Hori M, Hayashi N. Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatoma cells. **J Hepatol** 41(4):637-643, 2004.
15. Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker III EB, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. **Gastroenterology** 127(4): 1189-1197, 2004.
16. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Jinushi M, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Kanto T, Tsuji S, Hori M, Hayashi N. Concanavarin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an anti-tumor effect in murine liver. **Hepatology** 40(5): 1190-1196, 2004.
17. ○ 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(10): 6072-6081, 2004.
18. ○ 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(11): 1919-1926, 2004.
19. Nakanishi F, Ohkawa K, Ishida H, Hosui A, Sato A, Hirama tsu N, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Alteration in gene expression profile by full-length hepatitis B virus genome. **Intervirology** 48(2-3): 77-83, 2005.

口頭発表

The American Association for the Study of Liver Diseases (54th Annual Meeting)

October 24-28, 2003; Hynes Convention Center, Boston, MA

[Presidential Plenary] Takehara T, Suzuki T, Ohnishi C, Rucker III EB, Jinushi M, Miyagi T, Hiramatsu N, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to spontaneous and persistent hepatocyte apoptosis and liver fibrogenic response: in vivo evidence for the link between apoptosis and fibrosis.

[Poster] Kanto T, Sato A, Inoue M, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Takehara T, Hayashi N. IFN- γ or IL-15 restores the impaired helper T-cell polarizing ability of blood dendritic cell subsets in chronic hepatitis C.

[Presidential Poster of Distinction] Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Suzuki T, Kanto T, Hayashi N. Autocrine IL-15 is required for MHC class I-related chain A and B expression on monocyte-derived dendritic cells in response to interferon α/β .

[Poster] Sato A, Kanto T, Limn K, Komoda Y, Oki C, Inoue M, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Takehara T, Matsuura Y, Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus infects immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin.

[Presidential Poster of Distinction] Ohnishi C, Takehara T, Suzuki T, Jinushi M, Miyagi T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. IL-12 and IFN α gene therapy for hepatic metastasis of colon cancer: Difference in generation of innate and adaptive immune responses.

[Presidential Poster of Distinction] Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Ishida H, Ohnishi C, Jinushi M, Miyagi T, Hayashi N. Long-term productive replication of hepatitis B virus (HBV) in the liver by single intravenous injection of naked HBV DNA in immunocompromised mice.

[Presidential Poster of Distinction] Miyagi T, Takehara T, Suzuki T, Jinushi M, Ohnishi C, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. CD1d-mediated stimulation of natural killer T cells selectively activates hepatic natural killer cells in interferon-gamma independent manner and induces the activation of acquired immunity against murine hepatocellular carcinoma.

The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting)**October 30~November 2, 2004; Hynes Convention Center, Boston, MA**

[Oral] Tetsuo Takehara, Tomohide Tatsumi, Takahiro Suzuki, Masahisa Jinushi, Takuya Miyagi, Yoshiyuki Kanazawa, Ohkawa Kazuyoshi, Naoki Hiramatsu, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi. A mechanism of hepatocyte apoptosis-mediated liver fibrosis: Production of TGF β through hepatocyte and macrophage engulfment of apoptotic cells.

[Poster] Takuya Miyagi, Tetsuo Takehara, Tomohide Tatsumi, Takahiro Suzuki, Masahisa Jinushi, Yoshiyuki Kanazawa, Naoki Hiramatsu, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi. Concanavarin A injection activates liver innate immune cells, NKT cells and NK cells, to provoke an anti-tumor effect in murine liver.

[Poster] Masahisa Jinushi, Tetsuo Takehara, Tomohide Tasumi, Tatsuya Kanto, Takuya Miyagi, Takahiro Suzuki, Norio Hayashi. The critical role of NKG2A inhibitory receptor for NK cell-induced dendritic cell modulation of T cell responses in chronic hepatitis C virus infection.

[Poster] Hiramatsu N, Kasahara A, Yamaguchi S, Ishii S, Miyazaki M, Toyama T, Yasumaru M, Kanto T, Takehara T, Hayashi N. Necessity of early re-treatment for patients with chronic hepatitis C who do not achieve sustained response by interferon monotherapy.

[Oral] Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Housui A, Jinushi M, Tatsumi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Involvement of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA in sustained HBV replication in immunocompromised mice after hydrodynamic injection of a naked plasmid encoding HBV DNA.

Second Joint Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology and the American Gastroenterological Association**April 16-17, 2005 Tokyo International Forum, Tokyo, Japan**

“Hepatitis C: Clinic-Basic Interface”

[Invited Lecture] Tetsuo Takehara and Norio Hayashi. Innate Immune System in Hepatitis C Virus Infection