

PKR遺伝子プロモーターを含むルシフェラーゼレポータープラスミドを構築して検討したところ、予想外にコア蛋白質による活性化の度合いは低いことが明らかとなった。そこで、IFNにより誘導される遺伝子プロモーター内に存在するISREの配列を比較したところ、2'-5'-OAS遺伝子プロモーター内のISREは1塩基短く配列もconsensus配列とは3塩基異なっていることが分った。これらの塩基配列の違いがコア蛋白質による活性化能の違いに寄与している可能性を考え、ISREのconsensus配列 (AGTTTCACTTCC) の5回繰り返し配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するベクター (pISRE-Luci, Stratagene) と pISRE-Luciを鋳型としてPCR法により、consensus配列をGGTTTCACTTCCとISREとは機能しないと思われる配列に改変した pISRE(V1)-Luciと2'-5'-OAS遺伝子と同じ配列 GGTTTCTTCCに改変したpISRE(V2)-Luciを作成して、PH5CH8細胞を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、pISRE-Luciに比べてpISRE(V2)-Luciの方を効率よくコア蛋白質が活性化することと、pISRE(V1)-Luciではコア蛋白質による活性化能はほとんど消失することが分った。この結果から、コア蛋白質によるルシフェラーゼの活性化はISREを介していることと、ISREのconsensus配列よりも2'-5'-OAS遺伝子型のvariantタイプのISRE配列が好まれることが分った。このような視点に基づいて、2'-5'-OAS遺伝子に存在するISRE配列と同じ配列を有する遺伝子を探索したところ、IFNにより誘導される2本鎖RNA特異的アデノシンデアミナーゼ(ADAR1)遺伝子プロモーター内に存在するISRE配列はGCTTTCGTTTCCであり、2'-5'-OAS遺伝子のものと1塩基しか変わらないことが明らかとなった。そこで、ADAR1遺伝子プロモーターをPCR法により単離して、ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入してレポータープラスミドを作成してコア蛋白質により活性化されるかどうかの検討を行った。その結果、コア蛋白質(少なくとも遺伝子型1bと3a)がADAR1遺伝子プロモーターを効率よく活性化することが分った。

D. 考察

(1) SV40ラージT抗原により不死化したPH5CH8とNKNT3細胞では我々のマイクロサテライト不安定性アッセイ系が機能したが、肝癌由来のレプリコン細胞では機能しないことが分った。不死化肝細胞でマイクロサテライト不安定性が認められる原因として、SV40

ラージT抗原によるp53の不活性化が考えられたが、p53を欠くSaos-2細胞でもpuromycin耐性のコロニーがまったく認められないことから、p53の機能状態には関与していないことが示唆された。最近、SV40ラージT抗原によりミスマッチ修復系に関わる遺伝子の一部(hPMS1やhMSH3など)の発現抑制が報告されていることから、今後はその可能性を調べる必要があり、コア蛋白質によっても、これら遺伝子の発現抑制が引き起こされてマイクロサテライト不安定性につながっている可能性がある。

PH5CH8細胞やHepG2細胞においては塩基除去修復に関するアッセイによりコア蛋白質を発現している細胞において修復効率が低い傾向が今回得られたが、細胞から核を単離するステップでの効率にばらつきが認められるというアッセイ自体の問題点もあることから、この点を改善できる条件を探ることや実験の回数を増やす必要があると思われた。また、コアやNSSA以外のHCV蛋白質についての検討や、レプリコン細胞についてもこのアッセイを試みる必要がある。今回は8-oxoG:Cを損傷塩基としたが、これ以外にも8-oxoG:AやethanoadeninおよびAP siteを有するプラスミドを入手済みであることから、これらについても今後検討する予定である。

(2) 今回、コア蛋白質によるIFN誘導遺伝子の活性化はISREを介していることを明らかにしたが、ISREのconsensus配列よりも2'-5'-OAS遺伝子に存在しているようなvariant配列に強く作用することは、予想外であった。これまでに、コア蛋白質による2'-5'-OAS遺伝子の活性化はHCVの増殖レベルの自己調節機構に関与しているのではないかと推定していたが、今回、コア蛋白質によるADAR1遺伝子プロモーターの活性化を見出したことは、コア蛋白質は2'-5'-OAS遺伝子のみならず、RNA editing酵素として知られているADAR1遺伝子をも動員している可能性を示唆するものとして興味深い。今後は、これらの点を実験的に証明していくことが必要であると思われる。しかし、ヒト不死化肝細胞で見出したこのような現象は、残念なことに、最近我々がHCVゲノムの自己複製細胞として樹立したHCVレプリコン細胞では認められないことから、ヒト不死化肝細胞を基にしたHCVレプリコン細胞の樹立が必要と考えられる。Huh7肝癌細胞から由来しているHCVレプリコン細胞はIFNに対する応答性を低いことから、IFNによる活性化機構も正常に作用していない可能性がある。

コア蛋白質のN末端部20アミノ酸が2'-5'-OAS遺伝子プロモーターの活性化に重要であることが今回明らかになったが、この領域はHCV遺伝子型間でも高度に保存されていることから、これまでの結果を支持するものである。これまでの結果から、この20アミノ酸の部分を通じて、ISREの活性化に関与する何らかの蛋白質と会合するのではないかと予想される。最も、可能性の高い分子としては、STAT1であるが、現在までのところ、コア蛋白質により、STAT1遺伝子の発現が高進するとか、STAT1のリン酸化状態が高進するというような現象は認められていない。今後は、インターフェロン受容体遺伝子に及ぼす影響や、STAT1,STAT2への直接的相互作用について検討する予定である。

E. 結論

(1) HCVコア蛋白質によるマイクロサテライト不安定性の増強効果を測定できる実験系がレプリコン細胞など他の細胞においても再現できるかどうかの検討を行った。培養細胞を用いた塩基除去修復活性を測定できる実験系の構築を行った。

(2) HCVコア蛋白質がISREを介してIFNにより発現誘導される遺伝子を活性化することとコア蛋白質のアミノ末端部20アミノ酸がこの活性化に必須であることを明らかにした。コア蛋白質はISREのconsensus配列よりも2'-5'-OAS遺伝子に存在するようなvariant配列に対して強く作用することを見い出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Nozaki, A., Ikeda, M., Naganuma, A., Nakamura, T., Inudoh, M., Tanaka, K., and Kato, N. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.* (2003) in press.
2. Kishine, H., Sugiyama, K., Hijikata, M., Kato, N., Takahashi, H., Noshi, T., Nio, Y., Hosaka, M., Miyanari, Y. and Shimotohno, K. Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus. *Biophys. Res. Commun.*, (2002) 293, 993-999.
3. Hara, K., Ikeda, M., Saito, S., Matsumoto, S., Numata, K., Kato, N., Tanaka, K. and Sekihara, H. Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes.

Hepatology Res. (2002) 24, 228-235.

4. Nozaki, A. and Kato, N. Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR. *Acta Med. Okayama*, (2002) 56, 107-110.
5. Alam, S.S., Nakamura, T., Naganuma, A., Nozaki, A., Nouso, K., Shimomura, H. and Kato, N. Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: The core protein-encoding region. *Acta Med. Okayama*, (2002) 56, 141-147.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

C型慢性肝炎における樹状細胞サブセットの意義

主任研究者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科 分子制御治療学教授

研究要旨: C型慢性肝炎患者では樹状細胞(DC)とそのサブセット(DC1, DC2)が健康成人に比べて減少しており、NK細胞、T細胞の刺激能が低下していた。特にDC1のTh1誘導能の低下はHCV持続感染の機序として重要であることが明らかになった。

A. 研究目的

C型慢性肝炎の病態にTh細胞サブセット(Th1/Th2)の動態が関与している。HCV感染細胞の排除にTh1細胞が関与すると考えられるが、C型肝炎におけるTh1/Th2の制御機構は明らかではない。一般にnaïve CD4 T細胞からTh1/Th2への分化(polarization)は樹状細胞(DC)サブセットによって制御されている。本研究ではC型肝炎のTh polarizationにおけるDCの関与を明らかにし、DC機能の修飾によるThバランスの制御方法を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

C型慢性肝炎患者(ALT異常を伴う肝炎[CH]10例、ALT正常のキャリア[ASC]8例)と健康成人(NV)10例を対象とした。PBMCからのDC1とDC2の分離は磁気標識抗体を用いて行った。各DCをnaïve CD4 T細胞と共培養したのち、PMA/ionomycinにて刺激し、CD4 T細胞のIFN- γ 、IL-4、IL-10産生能を評価し、Th1、Th2細胞を決定した。また種々のサイトカインや中和抗体を添加し、DCによるTh1/Th2へのpolarizationの修飾を試みた。

(倫理面への配慮)対象者には研究の意義、目的、匿名性の確保につき事前に説明し、同意を得た。

C. 研究結果

NV群のDC1、DC2はそれぞれTh1(高IFN- γ 、低IL-4)、Th2(低IFN- γ 、高IL-4)細胞を高率に誘導した。CH群のDC1はNV群DC1に比べTh1誘導能が低かった(IFN- γ 陽性細胞、NV 46%、CH 20%)。またCH群DC2のTh2誘導能はNV群DC2と同等であったが、CH群DC2はIL-10産生細胞をより高率に誘導した(IL-10陽性細胞、NV 2.5%、CH 7.2%)。ASC群DC1のTh1誘導能はCH群DC1より更に低かった(IFN- γ 陽性細胞12%)、ASC群DC2のIL-10産生細胞誘導能はCH群より高かった(IL-10陽性細胞、9.3%)。共培養時にIL-12、IFN- γ を添加すると患者DC1のTh1誘導能は回復したが、IL-12は患者DC2のIL-10産生細胞誘導能も増加させた。

D.E. 考察、結論

C型慢性肝炎患者における低Th1、高IL-10の免疫環境はDC1、DC2によって制御されていることが明らかとなった。患者DC1のTh1誘導能を高め、DC2のIL-10産生細胞誘導能を抑制することでHCV排除の免疫応答を導きうると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Jinushi M. et al. J Immunol 170: 1249-1256, 2003.

G. 知的所有権の取得状況

なし。

厚生労働省「肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）」
分担研究報告書

C型慢性肝炎への Rib/IFN 投与時の HCV dynamics と Th1/Th2 cytokine、
chemokine receptor

分担研究者 岡上 武 京都府立医科大学第三内科学教室 教授

研究要旨：IFN/Rib 療法を行った C 型慢性肝炎患者 72 例で、治療開始 1 カ月、3 カ月後の HCV RNA 陰性化に影響を与える因子について検討した。HCV RNA dynamics の検討では、治療開始 1 カ月後に HCV RNA が陰性化した 20 症例では、治療開始 24 時間以前、以降の 1st および 2nd phase の HCV RNA の半減期が、いずれも HCV RNA が 1 カ月後に陽性であった症例よりも短く、24 時間後の HCV RNA 量は、18/20 例で治療開始前より 1log 以上減少していた。Th1/Th2 バランスの評価として IFN γ /IL-4 と chemokine receptor の CXCR3/CCR4 を測定したが、1 週間後に軽度 Th1 優位になったが、1 カ月および 3 カ月後に HCV RNA が陰性化した症例と陽性であった症例で有意な差はなく、2nd phase の HCV RNA の半減期の長さとは Th1 系へのバランスの変化の間に関連性は見られなかった。

共同研究者

京都府立医科大学第三内科学教室

助手 伊藤義人

大学院生 牧山明子、藤井秀樹

A. 研究目的

インターフェロン(IFN)単独治療で完治しなかった C 型慢性肝炎(CH-C)症例では、肝硬変への移行や肝発癌例が多くみられる。日本においては平成 13 年年末より IFN/Rib 療法が始まっており、1b 高ウイルス量で難治性と考えられる CH-C 症例の約 20%において著効が得られると報告されている。

IFN/Rib 療法の効果予測においては、治療開始 1 カ月後、3 カ月後の HCV RNA の陰性化が重要であるが、その背景因子は十分には解析されていない。

本年度の研究目的は、IFN/Rib 療法を行った CH-C 患者で、治療開始 1 カ月後、3 カ月後に HCV RNA が陰性化した症例において HCV dynamics や Th1/Th2 バランスの変化に特徴的な点があるか否かを検討することである。

B. 研究方法

IFN/Rib 療法を行った C 型慢性肝炎患者 72 例で HCV dynamics の検討を行った。すなわち、IFN/Rib 治療開始前、

6、12、48時間、4、7、14日、1、3カ月後に採血し、リアルタイムPCR法でHCV RNAを定量した。

さらに、72例中25例ではTh1/Th2バランスの評価として、IFN γ /IL-4、および、chemokine receptorのCXCR3/CCR4を測定した。細胞内IFN γ /IL-4陽性細胞の測定はthree color flow cytometryで行った。すなわち、患者PBMCをPMA、および、ionomycinで刺激した後、anti-CD4、anti-IL4、および、anti-IFN γ を反応させ、IFN γ (+)IL4(-)細胞をTh1細胞、IFN γ (-)IL4(+)細胞をTh2細胞とし、Th1/Th2比を求めた。

CXCR3/CCR4陽性細胞は、患者PBMCを無刺激でanti-CD4、anti-CXCR3、および、anti-CCR4と反応させ、flow cytometer (FACS caliber)でCD4陽性細胞中のCXCR3(+)CCR4(-)細胞をTh1細胞、CXCR3(-)CCR4(+)細胞をTh2細胞を表すものと考え、Th1/Th2比を求めた。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、既に、京都府立医科大学における人間を対象とする医学研究審査委員会において承認(MCHS-72)されている。本研究においては、協力者(肝炎患者)に研究の目的、医学的意義、侵襲の程度を十分に

説明する。さらに、研究結果の匿名性のみならず、いつでも同意を撤回できること、研究への同意は診療内容には一切関係しないこと、研究終了後は検体を破棄することについても説明し、予め、同意書に署名・捺印を得た後、研究を始めることとしている。

C. 研究結果

治療開始24時間以内(1st phase)のHCV RNAの半減期は、HCV RNA1カ月陰性群[1M(-)]で 5.3 ± 2.6 時間であり、HCV RNA1カ月陽性3カ月陰性群[1M(-)3M(+)]の 7.2 ± 4.1 時間とHCV RNA3カ月陽性群[1M(+)-3M(+)]の 19.7 ± 19.4 時間に比べて短かった(表1)。

治療開始24時間以降(2nd phase)のHCV RNAの半減期は、1M(-)で 32.6 ± 17.3 時間であり、1M(-)3M(+)
の 166.3 ± 111.6 時間と1M(+)-3M(+)
の 540.2 ± 35.4 時間に比べて著しく短かった(表1)。

治療開始24時間後のHCV RNAの減少率が1log以上であった症例が72例中30例、1log未満であった症例が42例(表2)あったが、1log以上の減少率を示した症例の1M(-)に対する敏感度は90.0%、特異度は76.9%であり、3M(-)に対する敏感度は60.4%、特異度は95.8%であった。

IFN/Rib療法中のTh1/Th2比の変

化として IFN γ (+)IL4(-)細胞/IFN γ (-)IL4(+)細胞比と、CXCR3(+)CCR4(-)細胞/CXCR3(-)CCR4(+)細胞比の経時的な変化を検討した。治療開始1週間後に、IFN γ (+)IL4(-)細胞/IFN γ (-)IL4(+)細胞比(表3)の値は治療開始前の1.49倍に増加し、また、CXCR3(+)CCR4(-)細胞/CXCR3(-)CCR4(+)細胞比(表4)の値も治療開始前の4.60倍に増加しており、Th1/Th2 バランスのTh1側へのシフトが考えられたが、治療開始1週間後、1カ月後、3カ月後のいずれにおいても、1M(-)、1M(-)3M(+), および、1M(+) 3M(+)の3群間において差は認められなかった。

D. 考案

我々は、既に、CH-C患者にIFN単独治療を行った場合、HCV RNAの減少曲線が2相性を示すことを報告している。また、IFN/Rib療法を行った報告でも同様の結果が示されている。IFN/Rib療法では治療開始1カ月後のHCV RNAの陰性化が重要であり、3カ月の陰性化例でも著効例がみられる。また、IFN/Rib療法を受けるCH-C患者では、IFN投与後のHCV dynamicsにおける2nd phaseのHCV RNA減少率が治療効果と密接に関連している。

そこで、1M(-)、1M(-)3M(+), およ

び、1M(+)3M(+)の3群に分けてHCV dynamicsを検討すると、2nd phaseのみならず1st phaseの半減期も1M(-)で最も短いことが明らかとなった。さらに、治療開始24時間後のHCV RNA量の1 log以上の低下は、1カ月後、3カ月後のHCV RNA陰性化の予測に有用であることも判明した。

一方、IFN/Rib療法では、HCVの排除が最も重要な治療目標であり、そのためには、2nd phaseの生体の免疫応答が重要であることが知られている。今回の検討で、IFN γ (+)IL4(-)細胞/IFN γ (-)IL4(+)細胞比とCXCR3(+)CCR4(-)細胞/CXCR3(-)CCR4(+)細胞比は、治療開始1週間後をピークに増加しており、IFN/Rib療法は生体をTh1側へシフトさせるものと考えられた。しかし、Th1/Th2比の変化は1M(-)、1M(-)3M(+), および、1M(+)3M(+)の3群間で差はなく、2nd phaseのHCV RNA減少率との関係も明らかでなかった。このことより、Th1/Th2比の変化からみた2nd phaseにおける生体の免疫応答の変化が、IFN/Rib療法の治療効果と関連することを支持する知見は得られなかった。

E. 結論

- 1) IFN/Rib投与開始1カ月後にHCV RNAが陰性化した症例では陰性化

しなかった症例に比べて 1st phase、2nd phase の HCV RNA の半減期は有意に短かった。

2) IFN/Rib 投与 24 時間後の HCV RNA 量の 1.10g 以上の減少は、1 カ月後、3 カ月後の HCV RNA 陰性化の予測に有用である。

3) IFN/Rib 療法中の Th1/Th2 バランスの変化は、1 カ月後、3 カ月後の HCV RNA 陰性化、および、3 カ月後陽性の 3 群間で明らかな差を認めなかった。

F. 研究発表

1 論文発表

1) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al. Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 38(1) 32-38, 2003.

2) Okanoue T, Itoh Y, Kirishima T, et al. Transient biochemical response in interferon therapy decreases the development of hepatocellular carcinoma for five years and improves the long-term survival of chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 23(1):62-77, 2002.

3) Itoh Y, Morita A, Nishioji K, et al. Clinical significance of elevated serum interferon-inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently

normal serum transaminase levels.

J Viral Hepat 8(5): 341-8, 2001.

4) Nishioji K, Okanoue T, Itoh Y, et al.

Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA in hepatocytes. *Clin Exp*

Immunol 123(2); 271-279, 2001.

2 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

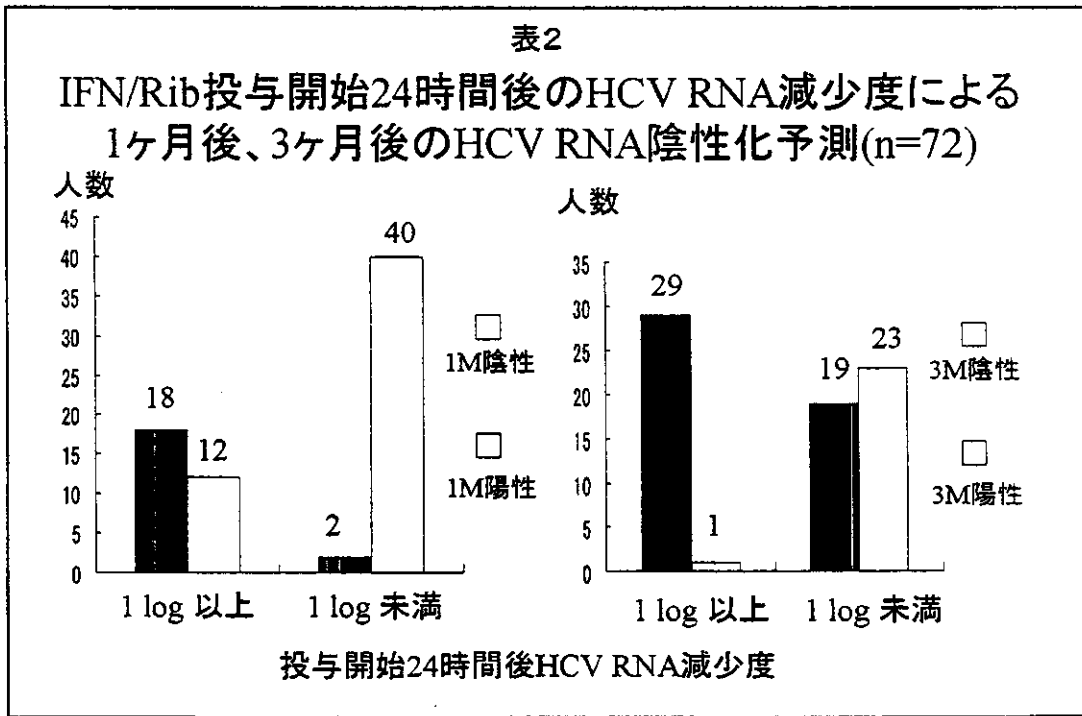
なし

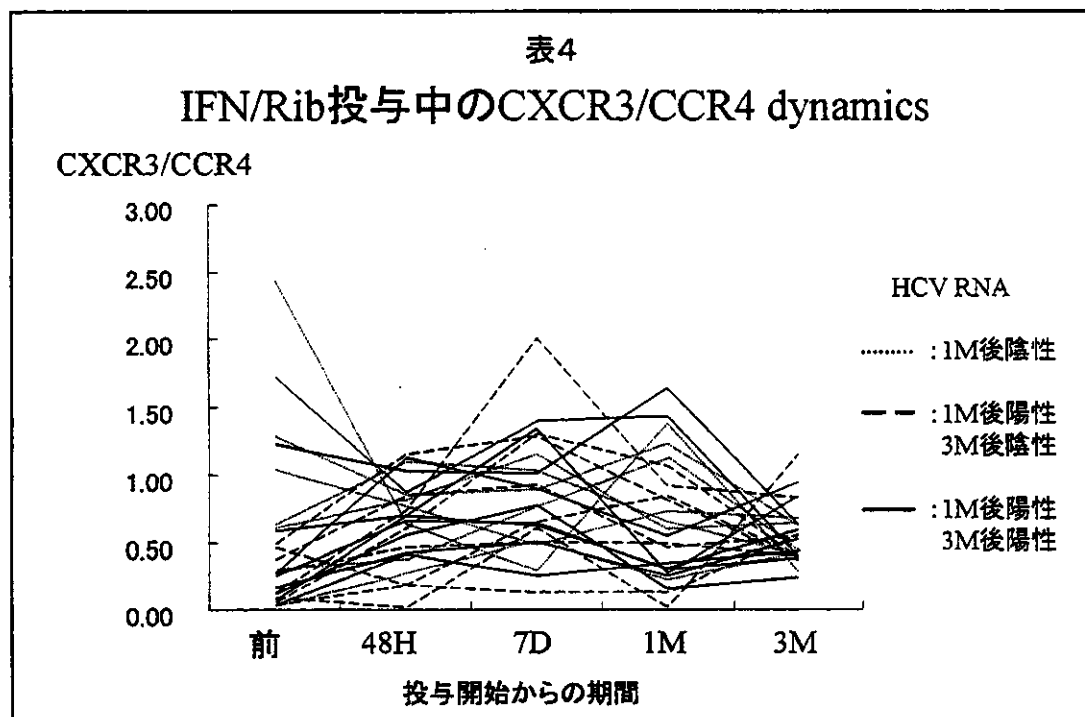
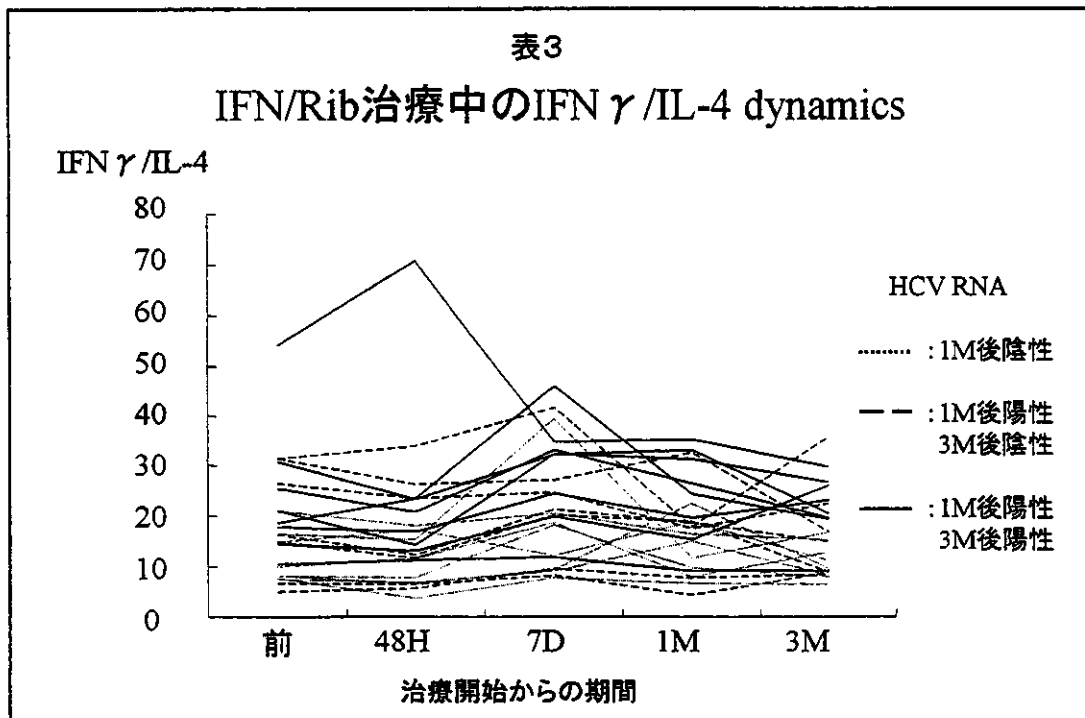
表1
3群のHCV dynamicsの
1st phase(pre-24H)、2nd phase(24H-3M)の半減期

	1st phase (hour)	2nd phase (hour)
HCV RNA 1M(-)	5.3 ± 2.6	32.6 ± 17.3
HCV RNA 1M(+) 3M(-)	7.2 ± 4.1	166.3 ± 111.6
HCV RNA 1M(+) 3M(+)	19.7 ± 19.4	540.2 ± 435.4

(Mann-Whitney U test)

p=0.039 (between 1M(-) and 1M(+), 3M(-) in 1st phase)
p=0.0004 (between 1M(-) and 1M(+), 3M(+) in 2nd phase)





**厚生労働科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書**

**C型肝炎ウイルス感染における樹状細胞機能低下の分子機構：
1型インターフェロンによる NKG2D 活性化リガンド MICA/B の
発現誘導の解析**

**主任研究者： 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科・教授
共同研究者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・助教授**

研究要旨：MHC Class I 関連分子である MICA および MICB は NK 細胞の活性化レセプターである NKG2D のヒトにおけるリガンドである。一般に MICA/B はストレスやトランスフォーメーションを受けた上皮系の細胞にのみ限局的に発現し、その NK 細胞感受性を規定する主要な分子であることが知られている。今回我々は、非上皮系細胞である樹状細胞(DC)が 1型インターフェロン(IFN)刺激による分化の過程で MICA/B を発現し、これが DC による NK 細胞の活性化のシグナル分子であることを明らかにした。さらに、この機構は C型肝炎患者では完全に欠損していた。今回の知見は C型肝炎における DC 機能低下のメカニズムの一端をはじめて明らかにしたものであり、また、C型肝炎においては IFN によって始動される広範な免疫応答が障害されている可能性を示唆している。

A. 研究目的

MIC (MHC class I chain-related gene) は HLA class I 領域に同定された遺伝子群であり A と B が HLA class I と構造的に類似する分子をコードしている。MICA/B は古典的 HLA class I 分子とは異なり、ストレスや形質変換を受けた上皮細胞にのみ極めて限定的に発現している。一方、NKG2D は NK 細胞に発現する抑制性 C 型レクチン様レセプターである NKG2 ファミリーに属する分子であるが、他のファミリーとの相同性が低く、DAP10 アダプター蛋白と複合体を形成し、NK 細胞に活性化シグナルを送る

特異な分子である (Wu, et al. Science 285:730, 1999)。MICA/B の機能は 1994 年の発見以来不明であったが、最近 NKG2D のヒトにおけるリガンドであることが明らかにされた (Bauer, et al. Science 285:727, 1999)。このようなことから、限定された上皮系細胞に発現する MICA/B の免疫学的な意義が注目されており、我々も平成 13 年度の本研究事業において肝癌の約 50% の症例で MICA/B が発現しており、その NK 細胞感受性を規定していることを報告している。

本年度は、MICA/B が非上皮系の細胞である樹状細胞においても発現し、活性化リ

ガンドとして免疫調節作用の一翼を担っているのではないかと考え、検討を行った。

B. 研究方法

健常者あるいはC型肝炎ウイルス(HCV)感染者の末梢血より単球を分離しGM-CSF、IL-4存在下に6日間培養し未分化な表現型を有するDCを誘導した。これをさらにLPS、CD40L、poly I:C、IFN α などの分化誘導因子で24時間刺激した。これらの細胞のMICA/Bの発現を6D4モノクロナル抗体を用いてFACS解析した。AllogeneicなドナーよりCD56を用いてNK細胞を分離し、DCと混合培養することによりNK活性化能を検討した。

C. 研究成果

(1) MICA/Bは1型IFN刺激により樹状細胞の膜上に発現誘導される。

単球より誘導したDCにおけるMICA/Bの発現をFACS解析したところ、未分化なDCには発現を認めなかった。LPS、CD40Lあるいはpoly I:C刺激により分化誘導を受けたDCにもMICA/Bの発現は認められなかった。しかし、IFN α あるいはIFN β で24時間刺激をしたDCは特異的にMICA/Bを発現した。RT-PCR解析によりMICAおよびMICBのmRNAの発現が確認された。

(2) 1型IFN刺激を受けた樹状細胞はMICA/B-NKG2Dを介してNK細胞を活性化する。

末梢血より分離したpolyclonalなNK細胞の多くはNKG2Dを発現していた。そこでDCとNK細胞を24時間混合培養し、その後にNK細胞のK562に対する細胞障害活性とIFN γ 産生(intracellular

staining)を解析した。NK細胞はIFN α で刺激したDCと24時間混合培養することにより、著明に細胞障害活性が増強した。未分化なDCとの混合培養あるいはNK細胞のIFN α のみによる刺激では、このようなNK活性の上昇は認められなかった。また、IFN α で刺激したDCとの24時間混合培養はNK細胞からのIFN γ 産生を有意に増強させた。

このようなNK細胞の活性化は、混合培養をトランスウエルで行った場合や、あるいはMICA/Bの $\alpha 1\alpha 2$ ドメインを認識するモノクロナル抗体やNKG2Dモノクロナル抗体存在下に行った場合には完全に消失した。したがって、IFN α 刺激DCとの混合培養によって獲得されるNK細胞の活性化には、NK細胞とDCとのcell-to-cell contactが必要であり、しかもIFN α によってDC上に誘導されるMICA/BとNKG2Dが必須の役割を持っていることが明らかとなった。

(3) C型肝炎患者では樹状細胞の1型IFN刺激によるMICA/Bの発現が欠損している。

IFN α 刺激によるMICA/Bの発現を健常者10例、HCV感染者10例で検討した。HCV感染者のDCではIFN α によるMICA/Bの発現が全く認められなかった。また、C型肝炎患者のDCはIFN α 刺激を受けてもNK活性化能が全く認められなかった。

D. 考察

MICA/BがIFN α の刺激によりDCに発現誘導され、これがNKG2Dを介してNK細胞を活性化するという知見は、上皮系細胞に極めて特異的に発現すると考えられていたMICA/Bが非上皮系細胞においても発現

するということ、さらに MICA/B が NK 細胞による障害の際の単なる "altered-self" シグナルとしてだけではなく、NK 細胞を活性化しその後の免疫応答を調節する分子であることを示唆している点で重要であると考えられる。また NKG2D は NK 細胞のみならず CD8 陽性 T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、NKT 細胞など広範な免疫担当細胞に発現していることが知られていることから、直接の証明は今後の課題ではあるが、DC に発現する MICA/B はより広範な免疫担当細胞の活性化に関与している可能性がある。

HCV 感染者における DC 機能の低下に関しては、我々を含めた複数の施設から報告されているコンセンサスの得られた現象である。しかしながら、このような現象に具体的にどのような免疫関連分子が関与しているのかという細胞レベルでの説明はなされていなかった。HCV 感染者の DC において 1 型 IFN の刺激により MICA/B の発現誘導がみられないという知見は、この現象の少なくとも一部に関与する分子を初めて示したものである。また、HCV 感染においては 1 型 IFN によって始動される免疫応答が障害されている可能性を示唆しており、興味ある知見と考えられる。

E. 結論

DC は 1 型 IFN 刺激により MICA/B を発現し、これにより NKG2D 陽性細胞を活性化するという新規の免疫調節メカニズムが存在することを示した。HCV 感染者ではこの発現誘導が完全に欠損していた。

F. 研究発表 論文発表

1. Sugimoto Y, Kuzushita N, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Miyagi T, Jinushi M, Ohkawa K, Horimoto M, Kasahara A, Hori M, Sasaki Y, Hayashi N. A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hep* 9:377-384, 2002.
2. 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 Gastro Hepatol* 18:32-40, 2003.
3. 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* 104:354-361, 2003.
4. 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* 300:784-788, 2003.
5. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T,

Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MICA/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.

学会発表

1. Suzuki T, Takehara T, Kanto T, Miyagi T, Jinushi M, Sugimoto Y, Sasaki Y, Hayashi N. Intravenous injection of recombinant hepatitis B virus (HBV) DNA achieves high-level expression of HBV as well as humoral immune response in mice. April, 2002. Madrid (Spain). Biennial Meeting of the International Association for the Study of the Liver.
2. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Sasaki Y, Hayashi N. Retinoic acid enhances susceptibility of human hepatoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity via up-regulation of MICA. April, 2002. Madrid (Spain). Biennial Meeting of the International Association for the Study of the Liver.
3. Hosui A, Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Sato A, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hayashi N. Possible mechanism for HCV core-mediated regulation of Jak-Stat signaling pathway. November, 2002; Boston (USA). The American Association for the Study of Liver

Diseases (53rd Annual Meeting)

4. Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Takehara T, Sasaki Y, Hayashi N. HCV core-mediated suppression of CDK-activating kinase (CAK) activity. November, 2002; Boston (USA). The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)
5. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Impaired MICA/B induction on dendritic cells recovered from patients with chronic hepatitis C leads to reduced natural killer cell-mediated immune responses. The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)
6. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Jinushi M, Sugimoto Y, Kanto T, Sasaki Y, Hayashi N. CD1d-mediated stimulation of natural killer T cells by α -galactosylceramide specifically activates hepatic natural killer cells and eliminates experimentally disseminated hepatoma cells in murine liver. The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)
7. Takehara T, Suzuki T, Rucker EB, Miyagi T, Jinushi M, Kanto T, Sasaki Y, Hayashi N. Conditional deletion of the bcl-x gene reveals Bcl-xL as a critical apoptosis antagonist in primary murine hepatocytes. The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1. 劇症肝炎例の予後予測

	肝移植適応ガイドライン 脳症発症時 5日後		武藤らの式	高橋らの式	King's College Hospital
	① S.M. 29女 不明/亜急性型	死亡(3)	死亡	$\lambda : 1.38$ 80%	RS: 3.64 97%
② U.T. 26女 薬剤性疑い/ 亜急性型	死亡(2)	死亡	$\lambda : 2.03$ 88%		死亡
③ M.N. 14男 非A非B非C型/ 亜急性型	死亡(3)	死亡	$\lambda : 1.34$ 79%	RS: 2.86 95%	死亡
④ M.K. 51男 不明/亜急性型	死亡(5)	死亡	$\lambda : 3.78$ 98%	RS: 6.69 100%	死亡
⑤ S.K. 56女 B型/亜急性型	死亡(3)	死亡	$\lambda : 2.33$ 91%	RS: 4.66 99%	死亡

表2. 劇症肝炎症例の転帰

年齢・性	脳死移植	生体移植	転帰
① 29歳・女	登録	施行	生存
② 26歳・女	—	施行	生存
③ 14歳・男	登録	施行	生存
④ 51歳・男	希望せず	希望せず	死亡
⑤ 56歳・女	登録	希望せず	死亡

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅲ.研究成果に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
1) Ueda Y. (下遠野)	Wnt/ β -catenin signaling uppresses apoptosis in low serum medium and in duces morphological change in rodent fibroblasts.	International Journal of Cancer	99	681-688	2002
2) Masui O. (下遠野)	RelA suppresses the Wnt/beta-catenin pathway without exerting trans-acting transcriptional ability.	International Journal of Molecular Medicine	9	489-493	2002
3) Kishine H. (下遠野)	Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus.	Biochemical and Biophysical Research Communications	293	993-999	2002
4) Shimotohno K. (下遠野)	Hepatitis C virus and its roles in cell proliferation.	Journal of Gastroenterology	37	50-54	2002
5) Kishine H. (加藤)	Subgenomic replicon derived from a cell line infected with the hepatitis C virus.	Biochemical and Biophysical. Research Communications	293	993-999	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
6) Hara K. (加藤)	Lactoferrin inhibits hepatitis B virus infection in cultured human hepatocytes.	Hepatology Research	24	228-235	2002
7) Nozaki A. (加藤)	Quantitative method of intracellular hepatitis C virus RNA using LightCycler PCR.	Acta Medica Okayama	56	107-110	2002
8) Alam S. (加藤)	Hepatitis C virus quasispecies in cancerous and noncancerous hepatic lesions: The core protein-encoding region.	Acta Medica Okayama	56	141-147	2002
9) Yasushi S. (小原)	Pax-6 controls the expression of Lewis x epitope in the embryonic forebrain by regulating 1,3-fucosyltransferase IX expression.	Journal of Biological Chemistry	277	2033-2039	2002
10) Takahito K. (小原)	Kinetic analysis of C-terminally truncated RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus.	Biochemical and Biophysical Research Communications	290	1188-1194	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
11) A.Okayama. (小原)	Incident hepatitis C virus infection in a community-based population in Japan.	Journal of Viral Hepatitis	9	43-51	2002
12) Takahito K. (小原)	Promoter/ origin structure of the complementary strand of hepatitis C virus genome.	Journal of Biological Chemistry	277	28700-28705	2002
13) Yoshiko M. (小原)	Direct Evidence for IFN- γ Production by Effector-Memory-Type Intraepidermal T Cells Residing at an Effector Site of Immunopathology in Fixed Drug Eruption : A Model for Epidermal Injury Mediated by Skin Resident T Cells.	American Journal of Pathology	161	1337-1347	2002
14) Takafumi Y. (小原)	Activation of STAT3 by the Hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation.	Journal of Experimental Medicine	196	641-653	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
15) Sumida Y. (岡上)	Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.	Journal of Hepatology	38(1)	32-38	2002
16) Okanoue T. (岡上)	Transient biochemical response in interferon therapy decreases the development of hepatocellular carcinoma for five years and improves the long-term survival of chronic hepatitis C patients.	Hepatology Research	23(1)	62-77	2002
17) Itoh Y. (岡上)	Clinical significance of elevated serum interferon-inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels.	Journal of Viral Hepatitis	8(5)	341-348	2002