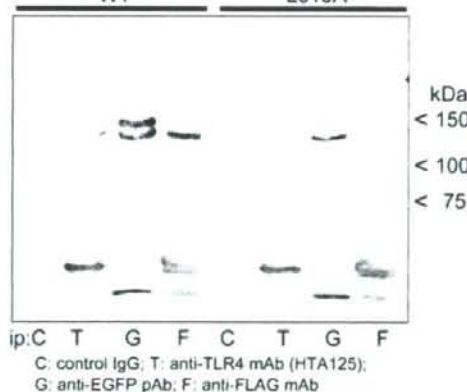


C immunoprecipitation of WT and mutant TLR4



blot: anti-EGFP mAb

FIGURE 8. A, TLR4 mutants L815A and L816A with and without EGFP fusion exhibit the same phenotypes in LPS responsiveness and plasma membrane expression. HEK293T cells were transfected with the wild-type, the L815A or L816A mutant TLR4_{fl}His₆ plasmid plus the human MD-2 plasmid and luciferase reporter, or control plasmids. After 36 h, cells were stimulated with LPS (10 ng/ml) for 7 h, and luciferase reporter gene activity was measured. The data were from three independent experiments. Small bars indicate 95% confidence intervals of the mean (*p* values for * are: TLR4 (WT) *fl*His₆/MD-2 (+), *p* = 0.046; TLR4 (L816A) *fl*His₆/MD-2 (+), *p* = 0.003). N.S.: not significant. B, wild-type and mutant TLR4s L815A and L816A were tagged by biotinylation of the cell surface proteins and affinity-purified. Human MD-2 and CD14 were coexpressed. TLR4 was visualized by immunoblotting using an anti-FLAG monoclonal antibody (mAb). Faint bands below 100 kDa are considered to be unbiotinylation intracellular TLR4 proteins that were not washed off during the process. Samples from TLR4 (WT), TLR4 (L815A), and TLR4 (L816A),

An Important Amino Acid of TLR4 for Its Function

associated with TLR4 (9), it is logical to expect that immunoprecipitating MD-2-FLAG-His₆ with anti-FLAG antibody should cause TLR4 to be coprecipitated with it. It is suggested by the result here that the association of the TLR4 mutant with MD-2 is impaired.

DISCUSSION

In this research, we performed mutagenesis analyses of particular amino acid residues in TLR4 to explore the mechanisms of TLR4 intracellular signal transduction and subcellular distribution. We found the candidate residues by analyzing truncation mutants of TLR4 in the cytoplasmic region, in which both signaling and normal subcellular distribution of TLR4 are disturbed. Because we are focusing on a common mechanism for the impaired signaling and distribution, we finally picked a single amino acid mutant that does not respond to LPS stimuli, as measured with NF- κ B reporter luciferase assay, and one that does not localize on the plasma membrane. TLR4 (L815A) is a mutant that meets these conditions, and our results suggest that the leucine at position 815 of TLR4 is required for both signal transduction and plasma membrane localization.

The best known single amino acid mutant of TLR4 is TLR4 (P712H) known as the *Lps^d* mutation in the C3H/He mouse, which corresponds to position 714 in this study of human TLR4 (5, 6, 20). Mice carrying this mutation opened up the rediscovery of TLR4 as a key player in innate immunity. Because this proline residue at this position is within the TIR domain and is conserved among TLRs or TLR4s of other species, it is assumed that the residue plays an important role in TLR4 function. The association of TLR4 (P712H) with its adapter proteins is reported to be intact, and the explanation for the functional impairment of TLR4 (P712H) is not clear (21–23).

Some single amino acid variants are found in humans, and these are related to the incidence or prognosis of some infections and other diseases. A growing body of data suggests that the ability of certain individuals to respond properly to TLR4 ligands may be impaired by single-nucleotide polymorphisms within TLR4 genes (24). The D299G and T399I alleles of the TLR4 gene have been associated with increased risk of severe infections (25).

By clarifying the subcellular component where the mutant protein is retained, or by clarifying to which compartment the mutant is not delivered, the abnormal intracellular sorting that is caused by the mutation in TLR4 (L815A) could be elucidated more precisely. Usually a sorting signal motif is comprised of several amino acids. In this regard, if the leucine at position 815 is a part of a motif, there should be other amino acids that are also members of the motif. Although replacement of leucine with alanine at position 816 did not cause an apparent signal transduction impediment, plasma membrane expression of TLR4 (L816A) was impaired to a certain extent. Positive

respectively, were prepared from the same number of cells as for the biotinylation experiment. C, immunoprecipitation with antibodies further reveals the characteristics of TLR4 (L815A). Anti-TLR4 monoclonal antibody (HTA125) does not precipitate the mutant TLR4, whereas anti-GFP polyclonal antibody (pAb) precipitates both wild-type and mutant TLR4. Mutant TLR4 was not coprecipitated with MD-2-FLAG-His₆. Lysates were prepared from cells transiently expressing wild-type or mutant TLR4-EGFP and MD-2-FLAG-His₆.

An Important Amino Acid of TLR4 for Its Function

response to LPS stimulation by TLR4(L816A) could be attributable to this small amount of expression on the plasma membrane. Mutagenesis analyses of neighboring amino acids of the leucine at 815 were not definitive, but the results could be suggestive that the adjacent leucine at 816 may work together with the leucine at 815. Leucines at position 815 and 816 could be in the same motif, and the leucine at position 816 may be less critical.

Several proteins have been reported to be involved in TLR4 cell surface expression. Heat shock protein gp96 is necessary for TLR4 association with MD-2 in the ER and for subsequent cell surface expression (26). PRAT4A and PRAT4B are associated with TLR4 and regulate TLR4 cell surface expression (27, 28). In embryonic fibroblasts of MD-2 knockout mice, TLR4 localization on the cell surface is severely impaired, and most TLR4 is retained in the ER or Golgi apparatus (15). MD-2 binds to TLR4 at its extracellular domain and is essential for LPS recognition by TLR4 (29). Although proteins such as CD14 and LPS-binding protein are reported to have important roles in LPS recognition by TLR4, in an *in vitro* setting HEK293T cells gain LPS responsiveness by introducing only TLR4 and MD-2 genes when measured by NF- κ B reporter assay (9, 30). Without transfection, HEK293 cells do not express TLR4, MD-2, or CD14, which are involved in LPS-induced intracellular signaling (31, 32). In this study, we show that the association of the TLR4 mutant and MD-2 is impaired (Fig. 8C).

Post-translational modification is another important factor for TLR4 function. Asparagine residues in the extracellular portion of TLR4 need to be glycosylated for plasma membrane expression of TLR4 (15, 19, 33). TLR4-MD-2 association is necessary for this glycosylation as well. The difference in the proportion of the heavy band to lighter band between wild-type and L815A mutant TLR4 immunoprecipitated with anti-GFP polyclonal antibody suggests that there may be some difference in glycosylation between wild-type and L815A mutant TLR4 (Fig. 8C). Although leucine at position 815 is located in the cytoplasmic tail of TLR4, we speculated that substitution of leucine at position 815 may cause a conformational change in the extracellular portion of the protein, which may interfere with the association between L815A mutant TLR4 and MD-2, leading to inhibition of glycosylation and cell surface expression of the mutant protein. Further investigation may reveal the mechanism involved in this phenotypic change in TLR4 (L815A), which would lead to better understanding of the mechanism of wild-type TLR4 signaling and trafficking.

Acknowledgment—We greatly appreciate the gift of human TLR4 and MD-2 cDNA from Dr. Kensuke Miyake (Institute of Medical Science, University of Tokyo, Japan).

REFERENCES

- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003) *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335–376
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabet, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., and Beutler, B. (2003) *Nature* **424**, 743–748
- Oshiumi, H., Sasaki, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 49751–49762
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002) *J. Immunol.* **169**, 6668–6672
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 615–625
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998) *Science* **282**, 2085–2088
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. A., and Segal, D. M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12156–12161
- Nishitani, C., Mitsuzawa, H., Hyakushima, N., Sano, H., Matsushima, N., and Kuroki, Y. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 586–590
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999) *J. Exp. Med.* **189**, 1777–1782
- Bonifant, J. S., and Traub, L. M. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447
- Nishimura, N., and Balch, W. E. (1997) *Science* **277**, 556–558
- Nufer, O., and Hauri, H. P. (2003) *Curr. Biol.* **13**, R391–R393
- Slack, J. L., Schooley, K., Bonnett, T. P., Mitcham, J. L., Qvarnstrom, E. E., Sims, J. E., and Dower, S. K. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4670–4678
- Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Kurt-Jones, E. A., Golenbock, D. T., and Espevik, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 47834–47843
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 667–672
- Hein, C., and Andre, B. (1997) *Mol. Microbiol.* **24**, 607–616
- Beutler, B. (2000) *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 20–26
- Akashi, S., Ogata, H., Kirikae, F., Kirikae, T., Kawasaki, K., Nishijima, M., Shimazu, R., Nagai, Y., Fukudome, K., Kimoto, M., and Miyake, K. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **268**, 172–177
- Ohnishi, T., Muroi, M., and Tanamoto, K. (2003) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 405–410
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., and Tong, L. (2000) *Nature* **408**, 111–115
- Dunne, A., Ejdebäck, M., Ludidi, P. L., O'Neill, L. A., and Gay, N. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41443–41451
- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A., and O'Neill, L. A. (2001) *Nature* **413**, 78–83
- Horng, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001) *Nat. Immunol.* **2**, 835–841
- Schroder, N. W., and Schumann, R. R. (2005) *Lancet Infect. Dis.* **5**, 156–164
- Agnese, D. M., Calvano, J. E., Hahn, S. J., Coyle, S. M., Corbett, S. A., Calvano, S. E., and Lowry, S. F. (2002) *J. Infect. Dis.* **186**, 1522–1525
- Randow, F., and Seed, B. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 891–896
- Wakabayashi, Y., Kobayashi, M., Akashi-Takamura, S., Tanimura, N., Konno, K., Takahashi, K., Ishii, T., Mizutani, T., Iba, H., Kouro, T., Takaki, S., Takatsu, K., Oda, Y., Ishihama, Y., Saitoh, S., and Miyake, K. (2006) *J. Immunol.* **177**, 1772–1779
- Konno, K., Wakabayashi, Y., Akashi-Takamura, S., Ishii, T., Kobayashi, M., Takahashi, K., Kusumoto, Y., Saitoh, S., Yoshizawa, Y., and Miyake, K. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 1076–1082
- Nishitani, C., Mitsuzawa, H., Sano, H., Shimizu, T., Matsushima, N., and Kuroki, Y. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 38322–38329
- Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., and Miyake, K. (2000) *J. Immunol.* **164**, 3471–3475
- Espevik, T., Latz, E., Lien, E., Monks, B., and Golenbock, D. T. (2003) *Scand. J. Infect. Dis.* **35**, 660–664
- Muta, T., and Takeshige, K. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 4580–4589
- da Silva Correia, J., and Ulevitch, R. J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 1845–1854

NKT細胞とウイルス肝炎

Natural killer T cells in viral hepatitis



考藤達哉

Tatsuya KANTO

大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学、同樹状細胞制御治療学

○NKT細胞は多様なサブセットを構成し、臓器特異的に多彩な機能を発揮する免疫調節細胞である。肝炎ウイルスの複製の場である肝臓はNKT細胞の豊富な臓器である。B型肝炎ウイルス遺伝子のトランスジェニックマウスを用いた検討によって、肝臓のNKT細胞には肝炎ウイルスの複製抑制に働くサブセットと肝細胞障害に関与するサブセットが存在することが明らかになった。著者らは、C型慢性肝炎患者において末梢血 invariant NKT細胞($V\alpha 24^+V\beta 11^+$ 細胞)の頻度は非感染者と同等であるが、活性化したNKT細胞はIL-13産生能が亢進していることを報告した。一方、C型肝炎患者の肝臓には肝細胞障害に関与する non-invariant NKT細胞が存在することが報告されている。NKT細胞はさまざまなサブセットが相互に機能調節を行い、ウイルス肝炎における肝細胞障害、肝線維化などの病態に関与していると考えられる。

C型肝炎ウイルス、自然免疫、CD1d、 α -ガラクトシルセラミド

わが国において肝癌の約7割はC型肝炎、約2割はB型肝炎を基盤に発生する、とくにC型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)感染者は全国で約200万人存在すると推定されており、C型肝炎は今後も増加すると考えられる。C型肝炎による死亡者数を減らすためには、HCVの排除によって肝病変の進展を抑制する必要がある。HCVの排除はHCV感染肝細胞を細胞障害性T細胞(cytotoxic T lymphocyte: CTL)が排除することで達成されると考えられている。したがって、HCVに対する免疫応答の研究は、T細胞を中心とした獲得免疫系の解析が先行した。しかし近年になって、樹状細胞(dendritic cell: DC)、NK細胞、NKT細胞などウイルス感染初期の免疫応答に関与する自然免疫系が効果的な獲得免疫の発動に重要であることが判明し、ウイルス持続感染成立機序にも自然免疫系の機能異常が関与することが報告されている。

本稿ではC型肝炎の病態における自然免疫、と

くにNKT細胞の関与について概説する。

C型慢性肝炎における自然免疫

肝細胞においてHCVの持続感染が成立するためにはまず、初感染時に発動するI型インターフェロン(IFN)の誘導による抗ウイルス機構や、肝臓に豊富に存在する自然免疫系細胞(NK細胞、NKT細胞)の攻撃から逃れる必要がある。HCV感染の急性期ではHCV RNA量は急速に増加し、潜伏期の間は高値が持続する。この時期のHCV感染肝細胞ではI型IFNやIFN誘導遺伝子群が高発現となっている。抗ウイルス活性をもつ分子の発現にもかかわらずHCV複製が持続する機序として、HCV蛋白が抗ウイルス活性に関与するIRF-3、NF- κ Bなどの遺伝子群を抑制する可能性が想定されている¹⁾。また、本来急性期にHCV排除に働くべきNK細胞、NKT細胞などの機能が低下している可能性が考えられるが、その詳細に関しては不明である。

いったん HCV の持続感染が成立すると、さまざまな免疫細胞が機能低下をきたす²⁾。一般的に C 型慢性肝炎患者では、ヒト免疫不全ウイルス (human immune deficiency virus: HIV) 感染者のように強い免疫抑制状態に陥ることはない。しかし、アメリカ退役軍人を対象とした疫学調査により、HCV 感染者は非感染者に比べて肝硬変例や HIV 合併感染例を除いても、ウイルス感染症や性感染症の有病率が高いことが報告されている³⁾。これは HCV 感染によって緩やかな免疫抑制が生じており、易感染性が亢進していることを示している。

DC は病原体に対する immune sentinel として自然免疫系を発動させるとともに、NK 細胞、NKT 細胞、T 細胞などの活性を統合的に制御する(「サイドメモ」参照)。著者らは C 型慢性肝炎では DC の数や機能が低下していることを報告しており^{4,5)}、その機序として HCV の DC への感染性を示した⁶⁾。一方、NK 細胞、NKT 細胞は DC の機能制御にも関与している⁷⁾。著者らは、C 型慢性肝炎患者の NK 細胞では抑制性レセプターである NKG2A が高発現であり、肝細胞に発現する HLA-E との結合による IL-10 や TGF- β 1 の産生を介して DC 機能を負に制御することを報告している⁸⁾。

サイド メモ

樹状細胞

樹状細胞(dendritic cell: DC)は 1973 年に Steinman により、マウス脾の付着細胞のなかで特異な形態をもつ細胞として発見された。ヒトには myeloid DC (MDC) と plasmacytoid DC (PDC) のサブセットが存在する。骨髄幹細胞から DC 前駆細胞が誘導され、体内のサイトカインや造血因子によって DC に分化する。MDC は炎症刺激によって IL-12 や TNF- α などを産生し、PDC はウイルス感染により多量の I 型インターフェロンを産生する。CD4⁺T 細胞の Th1、Th2 への分化は DC により制御されているが、MDC は Th1 へ、PDC は Th2 へ誘導する能力が高い。各 DC は機能的可塑性に富んでおり、相互に機能を調節・補完することで免疫系を制御している。終免疫の領域では、DC の強力な抗原提示能を利用したワクチン療法の臨床試験が行われている。治療のあらたな選択肢として DC 療法の確立が期待されている。

C型慢性肝炎におけるNKT細胞

—Th2型機能シフト

肝炎ウイルスの増殖の場である肝は、NK 細胞や NKT 細胞などの自然免疫細胞がぎわめて豊富に存在する臓器である。NKT 細胞は NK 細胞と T 細胞の両方の形質と機能をもった細胞として認識されるが、そのサブセットや機能はぎわめて多様性に富んでいる。限られた T 細胞受容体(T cell receptor: TCR)レパトア(ヒトでは V α 24-J α 18)をもつものを invariant(classical)NKT 細胞という。ヒトでは TCR-V α 24 は TCR-V β 11 と連鎖する場合が多く、invariant NKT 細胞=V α 24⁺V β 11⁺NKT 細胞と考えられる。一方、NKT 細胞は DC などの抗原提示細胞に発現する CD1d に提示される何らかの物質によって活性化すると考えられており、この性質を CD1d 拘束性という。現在までにヒトでの生理的な NKT 細胞活性化リガンドは同定されていない。

海綿より抽出されたリン脂質の一種である α ガラクトシルセラミド(α -galactosyl ceramide: α GalCer)は CD1d 拘束性に NKT 細胞を強く活性化し、NKT 細胞の研究に汎用されている。ヒト invariant NKT 細胞は CD1d 拘束性であるが、上記の TCR レパトアをもたない non-invariant(non-classical)NKT 細胞のなかにも、CD1d 拘束性に活性化する NKT 細胞群が存在する。また、特定の TCR-V β 鎖をもつ δ T 細胞、CD3⁺CD56⁺細胞、CD3⁺CD161⁺細胞なども NKT 細胞の範疇に入る。これらの多様な NKT 細胞群は局在する臓器によっても機能が異なることが知られている⁹⁾。

CD1d 拘束性 NKT 細胞は病原体や他の刺激に反応し、Th1、Th2 サイトカインを産生する。これらのサイトカインや CD40 リガンドなどの表面抗原によって他の免疫細胞を活性化し、免疫反応の方向性と強度を制御している。肝炎ウイルス感染においても CD1d 拘束性 NKT 細胞は二面性をもっており、ウイルス複製や炎症の抑制に働くものと肝細胞障害に働くものとが存在する。B 型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)感染においては HBV トランスジェニックマウスの系で肝の invariant NKT 細胞が IFN- α/β や IFN- γ の産生を介して HBV 複製の抑制に関与していることが

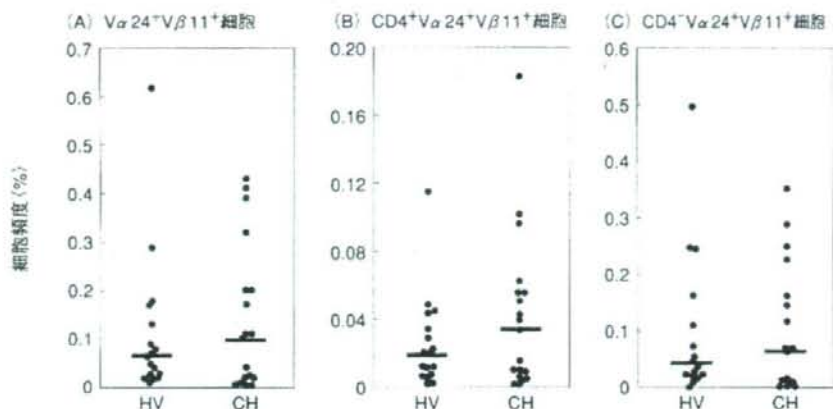


図1 C型慢性肝炎患者末梢血invariant NKT(iNKT)細胞頻度
末梢血中Va24⁺Vβ11⁺細胞(A), CD4⁺Va24⁺Vβ11⁺細胞(B), CD4⁻Va24⁺Vβ11⁺細胞(C)
の頻度をC型慢性肝炎患者と非感染者とで比較した。HV:非感染者, CH:C型慢性肝炎患者。

報告されている¹⁰⁾。一方、別のグループからはHBVトランスジェニックマウスを用いた肝炎モデルにおいて、CD1d拘束性のnon-invariant NKT細胞は肝炎発症に関与することが報告された¹¹⁾。その機序として、HBVによって肝細胞での活性化リガンドRAE-1の発現が亢進し、そのレセプターであるNKG2Dを介してNKT細胞が活性化されることが示された¹²⁾。しかし、ヒトB型肝炎におけるNKT細胞の意義に関する報告はない。

C型慢性肝炎患者におけるNKT細胞に関しては、末梢でのVa24⁺NKT細胞数が減少しているという報告¹³⁾や、肝でのCD3⁺/CD56⁺細胞やVa24⁺細胞が非感染者肝よりも減少しているという報告¹⁴⁾があるが、NKT細胞の機能に関しては明らかではない。そこで著者らはC型慢性肝炎でのNKT細胞の意義を明らかにするために、CD1d拘束性invariant NKT細胞(Va24⁺Vβ11⁺細胞)の頻度と機能を解析した¹⁵⁾。

ヒトinvariant NKT細胞には、機能的にも異なるCD4⁺NKT細胞、CD8⁺NKT細胞とCD4⁻CD8⁻NKT細胞のサブセットが存在する。そこでまずC型慢性肝炎患者末梢血でのNKT細胞サブセットの頻度を非感染者と比較した。その結果、NKT細胞(Va24⁺Vβ11⁺細胞)とCD4陽性、CD4陰性の各NKTサブセットともに両群で差を認めなかった(図1)¹⁶⁾。また、末梢血中のCD1d/αGalCer反応性IFN-γ産生細胞数(NKT細胞数)も、C型

慢性肝炎患者と非感染者とで差を認めなかった。

NKT細胞は末梢血中では定常状態にあるが、肝や他臓器など免疫反応の場では活性化されていると考えられる。実際に末梢血NKT細胞は、IL-4、IL-13などのTh2サイトカインの産生能はきわめて低い。ExleyらはTh1型に機能シフトしたnon-invariant CD1d拘束性T細胞をHCV感染肝で同定しており、肝細胞障害への関与を報告している¹⁶⁾。そこで活性化NKT細胞の機能を検討するために、αGalCer添加DCによってNKT細胞を増幅培養し、高純度のCD4⁺Va24⁺Vβ11⁺細胞とCD4⁻Va24⁺Vβ11⁺細胞を分取した。これらをαGalCer添加DCにて再刺激し、サイトカイン産生能を検討した。

その結果、C型慢性肝炎患者由来NKT細胞は、CD4⁺NKT細胞、CD4⁻NKT細胞ともに非感染者に比べてIL-13の産生能が高かった(図2)¹⁵⁾。IL-5も同様の傾向であったが、IFN-γ産生能は同等であった。この結果は、C型慢性肝炎患者の活性化NKT細胞はTh2サイトカイン産生型に機能シフトしていることを示している。C型慢性肝炎患者の肝組織では肝細胞または肝浸潤リンパ球にCD1dが発現していることが報告されている¹⁷⁾。炎症肝へと遊走したNKT細胞はCD1dや未知のリガンドによって活性化し、IL-13やIL-5などのTh2サイトカインを産生すると考えられる。これらのサイトカインはTh1反応に抑制的に働き、

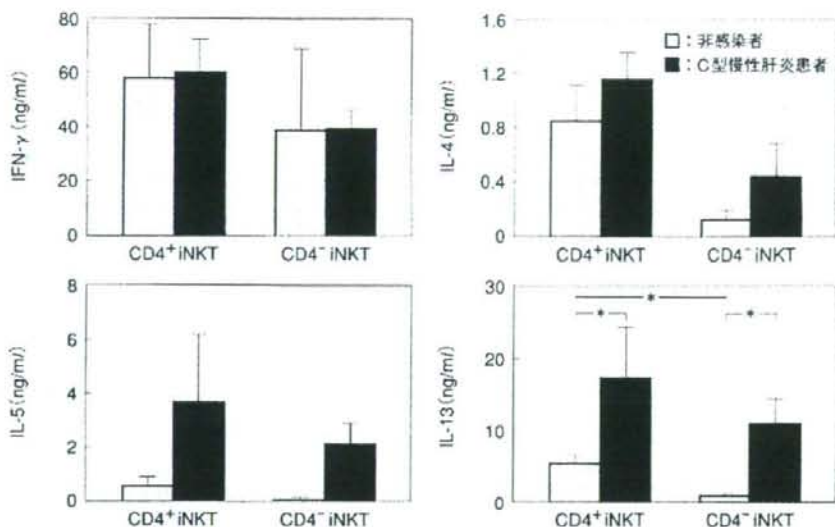


図2 C型慢性肝炎患者invariant NKT (iNKT)細胞のサイトカイン産生能
 α GalCer 添加 DC と CD14 陰性細胞を IL-2 存在下で共培養し、CD1d 拘束性 NKT 細胞を増幅した。5 週間の培養後、ソーティングにて CD4⁺V α 24⁺V β 11⁺細胞と CD4⁻V α 24⁺V β 11⁺細胞を分取し、 α GalCer 添加 DC で再刺激、上清中の各サイトカインを ELISA で測定した。
 * : $p < 0.05$.

肝での強い炎症反応を緩和しているのかもしれない。また、IL-13 は星細胞に働き TGF- β の産生誘導を介して肝線維化に関与することが報告されている。したがって、NKT 細胞は C 型慢性肝炎の線維化にも関与している可能性が考えられる。

おわりに

HCV 感染肝細胞の排除に直接関与するのは主として HCV 特異的 CTL である。自然治癒例においても抗 HCV 療法による著効例においても、CTL の誘導や活性の維持のためには HCV 特異的 CD4⁺T 細胞の活性維持が重要である。DC はこれらの獲得免疫系細胞の活性維持にきわめて重要であり、NK 細胞や NKT 細胞との cross-talk によって自然免疫系と獲得免疫系をつなぐ細胞である。NK 細胞、NKT 細胞は本来、初感染時に発動する細胞群であるが、持続感染が成立した後も免疫調節細胞として DC へ作用し、持続感染の維持や肝での炎症、さらには肝病変の進展などへも関与すると考えられる。今後は、HCV 感染高リスク群を対象とした感染初期の自然免疫応答の解析や、肝という特殊な免疫環境における自然免疫細胞

の機能解析が必要である。それにより HCV 持続感染のメカニズムの全体像やその制御方法が明らかになるとと思われる。

文献

- 1) Gale, M. et al. : Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*, **436** : 939-945, 2005.
- 2) Kanto, T. and Hayashi, N. : Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection : multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern. Med.*, **45** : 183-191, 2006.
- 3) El-Serag, H. B. et al. : Association between hepatitis C infection and other infectious diseases : a case for targeted screening? *Am. J. Gastroenterol.*, **98** : 167-174, 2003.
- 4) Kanto, T. et al. : 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.
- 5) Kanto, T. et al. : Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J. Immunol.*, **162** : 5584-5591, 1999.
- 6) Kaimori, A. et al. : Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology*, **324** : 74-83, 2004.
- 7) Kanto, T. and Hayashi, N. : Innate immunity in

- hepatitis C virus infection : Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatol. Res.*, **37**(Suppl. 3) : S319-S326, 2007.
- 8) Jinushi, M. et al. : 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.
 - 9) Exley, M. A. and Koziel, M. J. : To be or not to be NKT : natural killer T cells in the liver. *Hepatology*, **40** : 1033-1040, 2004.
 - 10) Kakimi, K. et al. : Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J. Exp. Med.*, **192** : 921-930, 2000.
 - 11) Baron, J. L. et al. : Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity*, **16** : 583-594, 2002.
 - 12) Vilarinho, S. et al. : Blockade of NKG2D on NKT cells prevents hepatitis and the acute immune response to hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104** : 18187-18192, 2007.
 - 13) Lucas, M. et al. : Frequency and phenotype of circulating *Vα24 Vβ11* double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *J. Virol.*, **77** : 2251-2257, 2003.
 - 14) Deignan, T. et al. : Decrease in hepatic CD56(+) T cells and *Vα24*(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. *J. Hepatol.*, **37** : 101-108, 2002.
 - 15) Inoue, M. et al. : Enhanced ability of peripheral invariant natural killer T cells to produce IL-13 in chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, **45** : 190-196, 2006.
 - 16) Exley, M. A. et al. : Cutting edge : Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver. *J. Immunol.*, **168** : 1519-1523, 2002.
 - 17) Durante-Mangoni, E. et al. : Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive T cells. *J. Immunol.*, **173** : 2159-2166, 2004.

* * *

平成20年度厚生労働科学研究費補助金社会保障国際協力推進研究事業
主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資する為の
日米合作的肝炎ウイルス基礎研究
研究報告書

発行日:2009年3月31日

発行者:主任研究者 三代俊治(東芝病院研究部)

発行所:主任研究者所属機関 〒140-8522東京都品川区東大井6-3-22東芝病院研究部

印刷:京浜印刷(株)

本報告書に掲載されました論文及び図表には著作権が発生しております。御利用にあたり御留意ください。