

厚生労働省科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書(平成25年度)

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた
肝炎ウイルス制御に関する研究

HCV制御に関わるNK細胞機能分子の解析

研究分担者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)の感染抑制に働く自然免疫細胞Natural killer(NK)細胞のフェノタイプ解析を肝移植ドナー/レシピエントの肝臓内単核球および末梢血単核球を用いて実施した。その結果、ドナーグラフト肝内在NK細胞のNKp46の発現強度には個体差があり、NKp46^{bright}細胞高含有率が肝移植後早期のHCV感染抑制に影響する可能性を確認した。本研究は、NK細胞のHCV複製抑制にNKp46^{bright}細胞が関与し、そのメカニズムはHCV感染細胞との接触によるIFN- γ 産生を介した増幅抑制であることを*in vitro HCV replicon assay system*を用いて明らかとした。

A. 研究目的

肝移植後には免疫抑制療法のため獲得免疫であるT/B細胞応答性が抑制される。一方、自然免疫細胞であるマクロファージ、樹状細胞、Natural Killer(NK)細胞は、免疫抑制剤の影響を受けにくい。しかし、肝硬変・肝臓がんの患者ではNK細胞の数・活性ともに低下していることが報告されている。そこで我々は、肝移植術後のHepatitis C virus(HCV)再感染における肝臓内のNK細胞の関与を解析した。その結果、肝移植レシピエントのNK細胞活性は肝障害度に従って低下していることが分かった。すなわち、NKp46とNKG2Dの表出が肝障害度に関連して低下していた。また、NKp46^{bright}細胞の含有率が高いドナーグラフト肝の移植を受けた患者の術後1週間における血中HCV-RNA値の抑制な低下を確認した。

本研究では、NK細胞のNKp46分子がHCV増幅抑制に関与するメカニズムを*in vitro HCV replicon assay system*を用いて解析した。

B. 研究方法

1. HCV replicon 細胞を用いたNK細胞によるHCV複製抑制効果解析

広島大学病院で施行し、同意を得られた肝移植ドナー9例の摘出肝の臓器灌流液に含まれる肝内単核球を用いた。NK細胞はNK cell isolation Kitを用い、磁気ソーティング法で分離した。NK細胞のHCV増幅抑制効果について、HCV replicon 保持肝細胞株(Huh-7)をTargetとして*in vitro replicon assay system*で評価した。E:T ratio=4:1、Recombinant human IL-2(25IU/ml)の存在下で、肝内NK細胞とHCV replicon 保持肝細胞株を共培養し、48時間後のHCV replicon 細胞のルシフェラーゼ活性をルミ

ノメーターで測定した。また、培養上清中のサイトカインを CBA assay 法で測定した。

2 . 肝内 NK 細胞の NKp46 分子の HCV 抑制能評価

昨年度の研究で、肝局在 NK 細胞の活性化因子である NKp46 表出強度は個体差に富むことを突き止めた。また、ドナー肝グラフト内の NKp46^{bright} 細胞高含有率は肝移植術後 1 週間におけるレシピエント血中 HCV-RNA 値の低下と関連していた。そこで、anti-NKp46 ブロッキング抗体によって HCV 増幅抑制能が減弱するか否かを検討した。さらに、NK 細胞の他の活性化分子であり HCV 感染との関連が報告されている NKp30、NKG2D についても同様の検討を行った。

C . 研究結果

1 . HCV replicon 細胞を用いた NK 細胞による HCV 複製抑制効果解析

フローサイトメトリー (FCM) による NK 細胞 (CD56⁺CD3⁻) の NKp46 表出と HCV replicon 細胞のルシフェラーゼ活性抑制能との関係を解析した結果、NKp46^{bright} 細胞の存在比率が高いほどルシフェラーゼ活性抑制率も高く、両者には正の相関を認めた (図 1)。

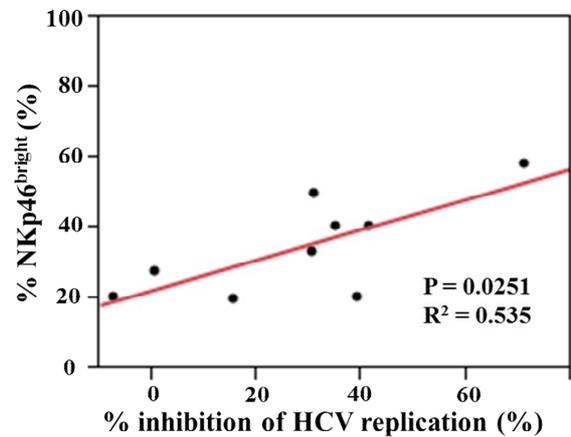


図 1 . 肝内 NK 細胞の HCV 増殖抑制能は NKp46^{bright} 分画比率と最もよく相関した

また、48 時間後の培養上清中に存在するサイトカインを CBA アッセイにより評価した。その結果、IFN- γ 産生とルシフェラーゼ活性抑制率には有意差をもって関連していることがわかった (図 2)。

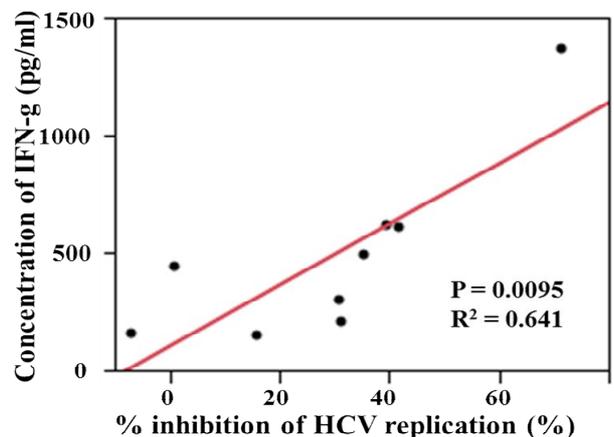


図 2 . H C V 増殖抑制能は IFN- γ 産生能と相関を認めた

2 . 肝内 NK 細胞の HCV 抑制能に関わる機能分子の解明

HCV の増幅抑制に NK 細胞の NKp46 分子の直接関与を確認するため、*in vitro* HCV replicon assay system に抗ヒト NKp46、NKp30、NKG2D モノクローナル抗体を添加した。その結果、各々のブロッキング抗体の添加により、ルシフェラーゼ活性抑制能の解除を認めた (図 3)。さらに、NKp46 とそ

の他の分子との相乗効果を検討し、NKG2Dとのコンビネーションにおいて有意な抑制の解除を示した(図4)。

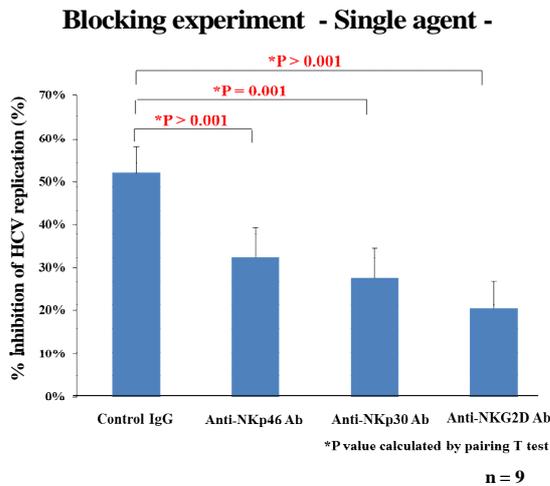


図3. Blocking抗体投与によりHCV増殖抑制能は有意に抑制された

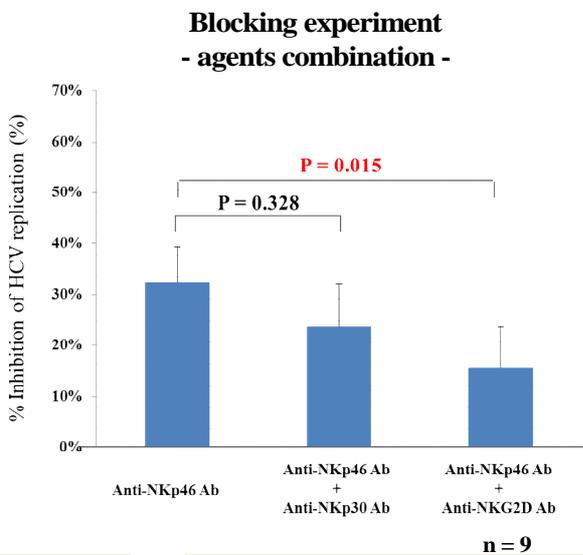


図4. 抗NKp46抗体と抗NKG2D抗体はHCV増殖抑制能に対して相乗的に作用した

D. 考察

NK細胞は、腫瘍細胞に対する傷害能やInterferon(IFN)産生能が高い。しかし、肝硬変・肝臓がんの患者ではNK細胞の数・活性ともに低下していることが報告されている。我々の検討でも、肝移植術後のHCV再感染防御における肝内のNK細胞の関与を解析したが、肝移植レシピエントのNK細胞の

活性化は自己の肝障害度に従って低下していることが分かった。またグラフト肝内のNK細胞のNKp46の表出強度が移植後のHCV増幅と深く関わるが、NKp46がHCV感染細胞と接触しIFN- γ を介しHCV増幅抑制効果を発揮する事が判明した。しかし、NKp46の発現に個体差が存在する理由は未だ明らかではない。IL-28B SNPは、HCVに対するIFN治療応答性に関与することが知られているが、今後、IL-28B SNPとNKp46の個体差が関連し、HCV感染制御やIFN治療への応答性を予測する指標となりうるか解析を進める予定である。

E. 結論

肝臓移植後のレシピエントのHCV再感染およびその抑制には、グラフト肝内のNK細胞上のNKp46分子の表出強度が移植後のHCV増幅と深く関わり、HCV抑制機構にはNK細胞のIFN- γ 産生が関わる事が解明された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, Ohdan H, Tzakis AG. Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells via interferon-gamma production. Transplant Proc. 2013.45(5):2045-2050.

2. Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro

H, Ohdan H. Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation. Transplantation. 2013.95(12):1521-1527.

3.大段秀樹. State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery. Frontiers in Gastroenterology. 2013. 18(3):203-213.

2. 学会発表

1.谷峰直樹, 田中友加, 石山宏平, 井手健太郎, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 安部智之, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 清水誠一, 佐伯吉弘, 五十嵐友香, 田代裕尊, 大段秀樹. 硬変肝に局在する Natural Killer 細胞の機能抑制機構. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.11-13. 福岡.

2. Ohdan H. Do Allograft Responses Effect HCV Recurrence? ILTS 19th. 2013.6.12-15. Sydney, Australia.

3. 御厨美洋, 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 安部智之, 橋本昌和, 大段秀樹. NAFLD 関連肝細胞癌における臨床病理と外科的治療成績 : C 型関連肝細胞癌との相違. 第 25 回日本肝胆膵外科学会. 2013.6.12-14. 宇都宮.

4.谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田澤宏文, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝内在 NKp46 高発現 NK 細胞は移植後 HCV 再感染初期に抑制的機能を有する. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013.7.4-5. 熊本.

5.田中友加, 大平真裕, 尾上隆司, 井手健

太郎, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後抗ドナーT 細胞応答に伴い産生される IFN- γ は術後 HCV-RNA 抑止に關与する. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013.7.4-5. 熊本.

6.大平真裕, 石山宏平, 堀田龍一, 清水誠一, 田中友加, 田代裕尊, Andreas Tzakis, 西田正剛, 大段秀樹. 肝臓由来ナチュラルキラー細胞を用いた肝細胞癌肝移植に対する補助免疫療法 : 広島大学・マイアミ大学共同研究の臨床経過報告. 第 49 回日本移植学会総会. 2013.9.5-7. 京都.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

