

201320016A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による
肝炎治療法の開発と臨床応用

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 26 (2014) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による
肝炎治療法の開発と臨床応用

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による肝炎治療法の開発と臨床応用 大段 秀樹	7
II. 分担研究報告	
1. Licensed /Unlicensed NK 細胞の肝細胞癌切除後再発予後に対する影響 田中 純子・谷峰 直樹・大段 秀樹	17
2. 生体肝移植後の C 型肝炎ウイルス再感染に対する IFN 治療効果の検討 および予防法の開発 今村 道雄	22
3. 肝臓内抗原提示細胞（マクロファージ及び類洞内皮細胞）による HCV 抗原 提示機能の解明 的崎 尚・尾上 隆司	24
4. ヒト不死化肝細胞において HCV タンパク質により発現変動する自然免疫応答 関連遺伝子の探索 加藤 宣之・團迫 浩方	30
5. 多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による肝炎治療法の開発と臨床応用 田原 栄俊	35
6. 『ミラノ基準外肝癌に対する肝移植の肝由来活性化 NK 細胞移入療法』に おける抗肝癌・HCV 効果のメカニズムの解明 渡辺 信和	37
7. iPS 細胞および CD34 ⁺ 細胞からの NK 細胞誘導と効率化の検討 大段 秀樹・田中 友加	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	55

I. 総括研究報告

多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による肝炎治療法の開発と臨床応用

研究代表者 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 肝癌再発予防を目的に臨床応用された肝 NK 細胞療法後の末梢血 NK 細胞のキメリズム解析を行った。CD34⁺造血幹細胞から NK 細胞をリモデリングし、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用い、抗 HCV 効果を確認した。iPS 細胞や CD34⁺細胞から NK 細胞を分化誘導する効率の改善を目指した研究を行った。誘導 NK 細胞の License 効果を予測する目的で、HCV 感染患者の肝細胞癌の再発と KIR-HLA ペアの累積との関連を解明した。また、誘導 NK 細胞の抗体 HCV 機構を解明する目的で、HCV タンパク質を恒常的に発現し非腫瘍性の表現型を持つヒト不死化肝 PH5CH8 細胞を作成し、表面抗原の発現がどのように変動するかをマイクロアレイ法により網羅的に解析し、NK 細胞に対する感受性を確認した。

研究分担者

今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 助教
田原 栄俊 広島大学大学院 細胞分子生物学講座 教授
田中 純子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学講座 教授
田中 友加 広島大学大学院 消化器・移植外科学講座 助教
的崎 尚 神戸大学大学院 生化学・分子生物学講座・シグナル統合学分野 教授
加藤 宣之 岡山大学大学院 腫瘍ウイルス学分野 教授
渡辺 信和 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 特任准教授
尾上 隆司 国立病院機構呉医療センター 臨床研究部分子腫瘍研究室 室長

A. 研究目的

一般に、ウイルスが感染すると natural killer (NK)細胞の非特異的応答によりウイルスは排除される。しかし、C型ウイルス (HCV) 感染ではHCVのE2蛋白とNK細胞上のCD81分子の結合によってNK細胞機能が抑制され、持続感染に移行する。我々は、肝未成熟NK細胞をIL-2存在下で賦活化した場合、CD81を介した抑制機構に抵抗性を示し、強いHCV複製抑制効果を誘導し得た。さらに、多機能造血幹細胞やiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞を誘導することに成功した。本研究では、これらの自然免疫リモデリング技術を応用して、HCVが免疫応答を回避し持続感染に

移行する機構を断ち切る根治療法を確立するため、新たな自然免疫抗HCV制御機構の解明とそれを基盤とした臨床試験を準備する予定である。

CD34⁺造血幹細胞からNK細胞をリモデリングし強力なtypeI IFN産生を誘導する技術は確立した。本研究では、臨床応用規模での効率化を目指す。誘導NK細胞はKiller Immunoglobulin-like receptor (KIR)2DLを欠落しておりunlicensed NK細胞様のフェノタイプを示す。本年度は、KIR遺伝子多型とHLAの解析からlicensingと制癌機構の関連を解析した。NPC1L1拮抗薬は、HCVの細胞間播種を抑制することが確認されたため、細

胞内増殖を抑制するNK細胞移入療法との相乗効果を検討する予定である。

iPS細胞からNK細胞への誘導は可能となったが、効率は臨床に応用できるレベルではない。本研究では誘導効率の改善を図った。また、自然免疫系のTLR3経路/RIG-I経路を再現し得るPH5CH8細胞を用いた解析系を確立し、NK細胞や星細胞のHCV増幅制御の新機構を解明する。さらに類洞内皮細胞およびマクロファージによるHCV抗原提示機能の免疫回避機構を解明し、その克服法を探索する。

B. 研究方法

1. Killer Immunoglobulin-like receptor(KIR)遺伝子多型と制癌機構の関連解析 (担当 大段・田中純)

Natural killer (NK) 細胞は自己のHLAを認識する抑制性Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs)を表出することで潜在的活性強化がおこることが近年報告されており、この機構は「License」と呼ばれている。Licenseに関わる抑制性KIRは5種類 (KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1, 3DL2) 存在し、それぞれ特定のHLA配列を認識すること、抑制性KIRの保有、HLA遺伝子型は個体において遺伝的多様性を認めるため、潜在的な機能性KIR-HLAペアには個体差が存在することが知られている。しかしIn vitroで報告されているLicensed NK細胞の抗腫瘍活性強化が、生体内で固形がんの長期成績に与える影響について十分な知見はない。今年度は遺伝子解析により機能性KIR-HLAペア (個人の潜在的License経路) の肝細胞癌(HCC)術後再発予後に対する影響を検討した。

2. 生体肝移植後のC型肝炎ウイルス再感染に対するIFN治療効果の検討および予防法の開発 (担当 今村)

これまで広島大学でのHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討では、HCV RNA検出前にCD34⁺幹細胞由来NK細胞を移入す

ると感染を予防可能であった。しかし、一旦感染が成立した後には、NK細胞移入のみではHCV RNA量抑制効果は限られており、ウイルス侵入阻止や増殖抑制効果をもつ薬剤の併用が望ましい。我々はこれまで細胞のコレステロール取り込み受容体であるNiemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) が治療的介入に使いやすいHCV侵入因子であることを示した。本年度はJFH1感染性粒子産生系においてHCV感染性粒子産生阻害効果を示したトロンボキサンA2 (TXA2) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤であるオザグレルおよびプロスタグランジンIの受容体 (IP) アゴニストのin vivoにおける抗HCV効果をヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討した。また、NK細胞レシピエントのIL28B遺伝子多型と生体肝移植後のHCV再感染に対するPEGIFN/ribavirin併用療法の治療効果を解析した。

3. マクロファージおよび類洞内皮細胞の抗原提示機能関連分子の解析 (担当 的崎、尾上)

C型ウイルス (HCV) 持続感染には、HCV感染に伴う肝臓内抗原提示細胞の機能抑制が関与することが示唆されているが、その詳細は明らかではない。本研究では、マクロファージなどの抗原提示細胞に高発現する膜型分子SIRP α とそのリガンド分子である膜型分子CD47との相互作用がHCV感染細胞の貪食を介したマクロファージのHCV抗原提示機能の制御に関与するかについて解析する目的で、肝組織の主要な抗原提示細胞であるマクロファージ (クッパー細胞) および類洞内皮細胞でのSIRP α および肝組織でのCD47の発現について検討した。さらに、CD47とSIRP α の結合阻害抗体による、オプソニン化CD47発現細胞のマクロファージによる貪食について解析を進め、抗SIRP α 抗体が外来抗原を表出するHCV感染細胞のマクロファージによる貪食排除の促進につながる可能性について検討し

た。また、肝臓に特徴的な抗原提示細胞である類洞内皮細胞におけるin vivoでの免疫抑制能に関して検討し、類洞内皮細胞がHCV由来ペプチド抗原提示により応答したT細胞を抑制し免疫回避される可能性を検討した。

4. ヒト不死化肝細胞を用いたHCVタンパク質により発現変動する自然免疫応答関連遺伝子の探索 (担当 加藤)

ウイルス感染により誘導される生体内の自然免疫応答は、ナチュラルキラー (NK) 細胞などのリンパ球が関与している。NK細胞はウイルス感染細胞表面上の種々の表面抗原を認識することにより、ウイルス感染を認識し、自然免疫応答を誘導する。本研究は、ヒト不死化肝細胞において、C型肝炎ウイルス (HCV) により発現変動する自然免疫応答関連遺伝子を探索することを目的としている。今年度は、前半領域 (coreタンパク質からNS2タンパク質)、あるいは後半領域のHCVタンパク質 (NS3タンパク質からNS5Bタンパク質) を発現するためのベクターを作成し、これらのHCVタンパク質を恒常的に発現し非腫瘍性の表現型を持つヒト不死化肝PH5CH8細胞を作成した。さらに、HCVタンパク質を発現させたときに表面抗原の発現等がどのように変動するかをマイクロアレイ法により網羅的に解析した。

5. 多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による肝炎治療法の開発と臨床応用 (担当 田原)

ヒトiPS細胞からCD45⁺CD56⁺細胞(NK細胞)を得るためには、iPS細胞からCD34⁺細胞を、さらにCD34⁺細胞からCD56⁺細胞を効率よく分化誘導する必要がある。すでに報告されているヒトES細胞からのNK細胞の分化誘導法を参考に、iPS細胞からCD34⁺細胞、及びCD34⁺細胞からNK細胞への分化誘導を行ったところ、その効率はそれぞれ3~10%と10

~20%であった。一方、ヒト末梢血由来CD34⁺細胞は90%以上の高効率でNK細胞に分化する能力を有している。本研究は、iPS細胞からNK細胞への分化誘導効率が低い原因を明らかにし、効率改善を行うことを目的としている。今年度は分化段階における寿命・老化関連遺伝子の発現解析を行った。

6. 『ミラノ基準外肝癌に対する肝移植の肝由来活性化NK細胞移入療法』における末梢血NK細胞キメラ解析 (担当 渡辺)

NK細胞移入療法の抗肝癌・HCV効果のメカニズムとして、移入したNK細胞が患者の体内で抗腫瘍・HCV効果を発揮することが予想される。しかしながら、そのことをヒトの体内で直接証明するのは極めて困難である。本研究では、現在広島大学と米国マイアミ大学で施行中の『ミラノ基準外肝癌に対する肝移植の肝由来活性化NK細胞移入療法』において、肝移植後の肝由来活性化NK細胞移入療法における抗肝癌・HCV効果のメカニズムを解明することを目的とした。本年度は、移入したドナー由来肝由来活性化NK細胞がNK療法後の患者末梢血で実際に検出されるのかを肝移植後に投与されたNK細胞の生体内動態を末梢血のキメラ解析/HLA-Flow法で検討した。

7. iPS 細胞およびCD34⁺細胞からのNK細胞誘導と効率化の検討 (担当 大段、田中友)

本研究では、我々がこれまでに成功した自然免疫リモデリング技術を応用して、HCVが免疫応答を回避し持続感染に移行する機構を断ち切る根治療法を確立するため、iPS細胞およびCD34⁺細胞から抗HCV効果を有する活性化Natural killer(NK)細胞の分化誘導法の改良を実施した。誘導NK細胞が抗HCV効果を最大限発揮するために必要なNK細胞機能分子の探索と、感染抑制にかかわるサイトカインの検索をin vitro assayで、HCV持続感染

ヒト肝細胞キメラマウスモデルを用い、*in vivo*感染実験による感染抑制能の評価と感染防御あるいは感染助長に関与する分子の探索を行った。

C. 研究結果

1. Killer Immunoglobulin-like receptor(KIR)遺伝子多型と制癌機構の関連解析 (担当 大段・田中純)

HCCに対する初回肝切除症例の内、術前肝予備能不良症例 (Child-Pugh grade BまたはC) および非治癒切除症例を除外した170例を対象とした。遺伝的に有効なKIR-HLAペアが多い患者群(≥ 3 個: Highly licensed NK群)とペアが少ない群 (≤ 2 個: Poorly licensed NK群)を解析すると、Highly licensed NK群の術後再発予後はPoorly licensed NK群に比べ有意に良好であった ($P = 0.0183$)。この再発に対する有意性はHCV感染の有無によるサブ解析では、非HCV感染患者群の解析では統計学的有意差を示したが、HCV感染患者群の解析において統計学的有意差に至らなかった。本研究により遺伝子レベルのKIR-HLAペアの累積により、HCC術後再発予後が良好な患者群が存在し、NK細胞のLicense効果がHCC術後予後に強く関わることを示唆された。また、今回の研究結果におけるHCV感染患者でのLicense効果の減弱は、報告されているHCVウイルス表面分子を介したNK細胞活性抑制と矛盾しない結果であったと考える。

2. 生体肝移植後のC型肝炎ウイルス再感染に対するIFN治療効果の検討および予防法の開発 (担当 今村)

トロンボキサンA2 (TXA2) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤であるオザグレールおよびプロスタグランジンIの受容体 (IP) に対するアゴニスト投与では、いずれの薬剤もヒト肝細胞キメラマウスにおけるHCVの増殖抑制効果を認め、これらの薬剤が生体肝移植後のHCV再感染の予防に有効である可能性が示唆された。

生体肝移植後HCV再感染に対するPEG-IFN/ribavirin (RBV) 療法の治療効果の検討では、genotype 1型のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV療法のSVR率は全体で59% (16/27例)であった。SVR率をレシピエントのIL28B遺伝子型 (rs8099917 SNP) 別に検討すると、TTで68% (13/19例)とTG/GGの37% (3/8例)に比べ高値であり、ドナーのIL28B遺伝子多型別に検討するとTTで68% (15/22例)とTG/GGの20% (1/5例)に比べ有意に高値であった ($p=0.048$)。肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV療法においてドナーおよびレシピエントのIL28B遺伝子型がその治療効果に関与していることを表すものであった。

3. マクロファージおよび類洞内皮細胞の抗原提示機能関連分子の解析 (担当 的崎、尾上)

マウス肝ではF4/80、CD11b陽性のクッパー細胞においてSIRP α が高度に発現していること、CD47が肝細胞に発現していることを確認した。この結果よりHCV感染肝細胞は、クッパー細胞により貪食される際には、CD47-SIRP α 系がその貪食制御に関与している可能性が示唆される。一方、CD47-SIRP α の相互作用を阻害する抗SIRP α 抗体が抗体によりオプソニン化されたCD47発現細胞の貪食を促進する活性を有することが確認された。今後、肝細胞のHCV感染によるCD47発現変動の有無やマクロファージによるウイルス感染肝細胞の貪食がCD47-SIRP α 系を阻害する抗体により促進されるかについて検討を進めて行く必要がある。類洞内皮細胞に関しては高純度で単離する方法を確立できた。単離した類洞内皮細胞でフェノタイピングを行い、抑制性抗原提示細胞であることを確認した。さらに*in vitro*および*in vivo*での同種抗原に対するT細胞応答抑制効果が明らかとなった。類洞内皮細胞にもSIRP- α の表出を認め

たが、その発現はマクロファージと比べて低く、免疫抑制能への関与は今後検討する必要がある。

4. ヒト不死化肝細胞を用いたHCVタンパク質により発現変動する自然免疫応答関連遺伝子の探索 (担当 加藤)

前半あるいは後半領域のHCVタンパク質をコードしている遺伝子を含むレトロウイルスをPH5CH8細胞に感染させ、ブラストサイジンを含む培地中で約2週間培養した。この選択培養により、前半あるいは後半領域のHCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝PH5CH8細胞（PH5CH8/C-NS2細胞とPH5CH8/NS3-5B細胞）を作成することができた。また、コントロール細胞（PH5CH8/Control細胞）も同様に作成した。作成したPH5CH8細胞において、45,000プローブからなるAffymetrix GeneChipを用いるマイクロアレイ解析を行った。この膨大なデータの中から、細胞死受容体、主要組織適合抗原（MHC）の古典的クラス1分子に属するヒト白血球抗原や非古典的クラス1分子に属するMICA、MICBやULBPファミリーのシグナル強度を解析した。PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞において、シグナル強度の低下が確認されたULBP1は、定量的RT-PCR法においても同様に、その遺伝子発現量は有為に低下していた。

5. 多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による肝炎治療法の開発と臨床応用 (担当 田原)

iPS細胞からCD34⁺細胞へ分化誘導開始14、21、28日後の誘導サンプル及び末梢血CD34陽性細胞からRNAを抽出し、CD34、hTERT、Bmi-1、p21、p16の発現をqRT-PCRで測定し、両者を比較検討した。その結果、分化誘導28日のiPS細胞由来CD34⁺細胞におけるCD34 mRNAの発現レベルは、末梢血由来

CD34⁺細胞と同等であった。老化関連遺伝子p16の発現レベルは、末梢血由来CD34⁺細胞と比較してやや上昇している一方、もう一つの老化関連遺伝子のp21発現レベルは、1/10程度と低レベルであった。さらに、細胞の分裂寿命の延長に働くテロメラーゼ及びBmi-1の発現を調べたところ、分化誘導28日のiPS細胞由来CD34⁺細胞において、テロメラーゼ及びBmi-1の発現はどちらも1/5程度であった。これらの結果は、iPS細胞由来CD34⁺細胞からのNK細胞分化誘導効率を促進するためには、分裂能の低下を抑制するか、あるいは積極的に分裂能を高めることが必要であることを示唆する。

6. 『ミラノ基準外肝癌に対する肝移植の肝由来活性化NK細胞移入療法』における末梢血NK細胞キメラ解析 (担当 渡辺)

広島大学病院で生体肝移植を受け、ドナー肝由来活性化NK療法症例7例のうち、有意な頻度のドナー由来細胞を検出できたのは5例であったが、検出されたドナー由来細胞のフェノタイプは様々であった。一方、NK療法非施行の2例でも、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された。移植後のドナー肝臓からはドナー由来の血液細胞が末梢血に流入するので、輸注したNK由来細胞をこれらと区別して検出するためには、輸注する細胞を検出するマーカーとして何らかの標識を施すことが必要と思われる。

7. iPS細胞およびCD34⁺細胞からのNK細胞誘導と効率化の検討 (担当 大段、田中友)

ヒト肝細胞キメラマウスへのHCV感染成立に誘導NK細胞を移入することで、投与したNK細胞数に依存して1週目および2週目の感染抑制を認めたが、一旦感染が成立した場合は、感染を抑制することはできなかった。また、非NK細胞群を投与したマウスは全例感染を認め、これらの細胞群は感染を助長する可

能性が示唆された。In vitro replicon assay systemによるHCVウイルス増幅抑制能においても、誘導NK細胞は強いHCV増幅抑制能を呈したが、非NK細胞群は抑制能が弱いことが分かった。HCVの感染抑制および増幅抑制効果に関与するNK細胞機能分子は、NKp46、NKG2D、CD226であった。また、IFN- γ 産生はHCV増幅抑制において主要なサイトカインであった。さらに、NK細胞の純度はHCV感染抑制に重要であり、培養の課程でNK細胞に分化せず非NK細胞に誘導された細胞群はCD11b/CD11c陽性の骨髄系の樹状細胞やマクロファージであり、これらの細胞群は抗HCV効果が乏しく、むしろ感染を促進することが、マウスin vivo感染実験でわかった。また、末梢血のCD34⁺細胞は血中存在率が非常に乏しいが、今回のリモデリング誘導実験において、誘導NK細胞の機能分子の誘導効率が高いことが示唆された。今後は機能解析とより詳細なフェノタイプ解析を行い、アフレーシス法による末梢血中CD34⁺細胞からのNK細胞リモデリングの臨床応用の可能性について検討する。

D. 考察

本邦の肝癌死亡数は年間3万人を超え、その殆どがウイルス性肝炎などの基礎疾患を有する。ウイルス性肝炎高罹患地域にある広島大学では、先端的研究活動の一環として「肝臓プロジェクト研究センター」を設置し、我々も肝炎/肝癌対策研究を展開してきた。その中で、肝由来の未成熟NK細胞を賦活化し、CD81を介した抑制機構に抵抗性を示す強いHCV複製抑制効果を誘導する方法を開発した。さらに、多機能造血幹細胞やiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞を誘導することに成功した（平成22-24年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 22101001: 自然免疫細胞リモデリングによるウイルス性肝炎の新規治療法の開発）。本研究では、これらの自然免疫再構築

技術を応用したHCV根治療法を確立することを目的とし、新たな抗HCV自然免疫制御機構の解明とそれを基盤とした臨床試験を開始する。

本研究の独創性は、関連研究のうち既に臨床導入した研究成果から検証できる。肝癌合併肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の一つであるが、移植後生体防御能の抑制により癌再発の危険性が助長される。肝臓移植では、肝グラフト内の血液を体外で灌流するが、その排液から大量の未成熟NK細胞が分離でき、TRAILを誘導することに成功した。そしてNK細胞を用いた制癌免疫療法を、ミラノ基準外肝癌に対する肝移植患者へ臨床導入し無再発生存率の改善を確認した。このNK細胞を用いた制癌免疫療法は、アメリカFDAの承認を得て、米国マイアミ大学と共同で脳死肝移植症例を対象に第I相臨床試験を現在施行中である。この研究を発展させ、IFN- γ 産生未成熟NK細胞の誘導法を開発し、HCV性肝硬変患者に対する肝移植後に移入したところ、術後のHCV RNA量は有意に減少し、HCVが完全に排除され完治したケースも経験した。最近、CD34⁺造血幹細胞やiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞を誘導することに成功し、臨床応用に向けた基礎研究を進行中である。

NK細胞受容体であるKIR2DL2/3はHLA-Cw3と結合してNK細胞の活性化を抑制している。KIR2DL1はHLA-Cw4と結合してNK細胞の活性化を抑制する。自己HLA-C エピトープと結合しないKIR2DLを発現するNK細胞（unlicensed NK細胞）は抗HCVあるいは抗腫瘍機構の中心を担う可能性が報告された。我々が造血幹細胞から誘導したNK細胞は、KIR2DLを欠落しておりunlicensed NK細胞様のフェノタイプを示すが、治療目的で移入する場合に想定される抗HCV効果の有意性と安全性を解析する必要がある。

本年度は、HCCに対する初回肝切除症例を対象とし、遺伝的に有効なKIR-HLAペアが多い患者群(≥3個: Highly licensed NK群)とペアが少ない群(≤2個: Poorly licensed NK群)で再発率を解析した。Highly licensed NK群の術後再発予後はPoorly licensed NK群に比べ有意に良好であった。しかし、HCV感染患者群のサブ解析では、統計学的有意差に至らず、HCV感染患者での肝臓に対するLicense効果が減弱している可能性が示唆された。今後、in vitroでNK細胞のlicensing誘導技術を確立し、抗HCV療法におけるLicense効果を検討する予定である。

E. 結論

CD34⁺造血幹細胞あるいはiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞を誘導した。臨床応用に向けた課題に対して、計画に従って順調に研究を進めている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

分担研究報告書に記載したため、ここでは省略する。

H. 知的財産権の出願・登録状況

分担研究報告書に記載したため、ここでは省略する。

II. 分担研究報告

Licensed /Unlicensed NK 細胞の肝細胞癌切除後再発予後に対する影響

研究分担者 田中 純子 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授
研究協力者 谷峰 直樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 院生
研究代表者 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

Natural killer (NK) 細胞は自己の HLA を認識する抑制性 Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) を表出することで潜在的活性強化がおこることが近年報告されており、この機構は「License」と呼ばれている。In vitro で報告されている Licensed NK 細胞の抗腫瘍活性強化が、生体内で固形がんの長期成績に与える影響について十分な知見はない。我々は遺伝子解析により個人の潜在的 License 経路の判定と肝細胞癌(HCC)術後再発予後に対する影響を検討した。

A. 研究目的

NK細胞活性は細胞表面に存在する抑制性受容体と活性化受容体により制御されていることが知られており、その中で自己のヒト白血球抗原(Human leukocyte antigen 以下 HLA)を認識し、自己の細胞に対する寛容を誘導する Killer immunoglobulin-like receptor(以下KIR)は、遺伝的な多様性が報告されている。また、近年自己のHLAを認識する抑制性KIRを表出することで、NK細胞の潜在的な活性強化が生じることがIn vitroの研究で報告され「License」機構として知られるようになった。一方、KIRによって自己HLAを認識せずLicenseをうけないNK細胞も存在し、これらは「Unlicensed NK細胞」と呼ばれ、自己細胞からの抑制がかからないことからサイトカインによる活性環境下ではLicensed NK細胞と変わらないかもしくはそれを凌ぐ活性を有するという報告もなされている。Licenseに関わる抑制性KIRは5種類(KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1, 3DL2)存在し、それぞれ特定のHLA配列を認識すること、

抑制性KIRの保有、HLA遺伝子型は個体において遺伝的多様性を認めるため、潜在的に機能しうるKIR-HLAペアには個体差が存在することが知られている。

In vitro で報告されている Licensed/Unlicensed NK 細胞の抗腫瘍活性が、生体内で固形がんの長期成績に与える影響について十分な知見はない。

我々は遺伝子解析により個人の潜在的 License 経路の判定と肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma 以下 HCC)の術後再発予後に対する影響を検討した。

B. 研究方法

1997年～2010年に施行したHCCに対する初回肝切除症例170例を対象とした。術前肝予備能不良症例(Child-Pugh grade BまたはC)および非治癒切除症例は対象より除外した。患者血球より精製したDNAをrSSO-PCR法を用いてKIR, HLA 遺伝子タイピングを行った。Propensity score matching法による調整後、再発予後解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて承認を得て実施している。

C. 研究結果

遺伝子タイピングの結果、個体内で機能する KIR-HLA ペアである KIR2DL1-C2, KIR2DL2-C1, KIR2DL3-C1, KIR3DL1-Bw4, KIR3DL2-A3/11 の保有はそれぞれ 14.1%, 10.0%, 98.2%, 80.0%, 15.9%であった。

これら遺伝子型は過去の健常日本人での報告と大きな差異は認めず、HCC患者に特徴的な遺伝子型の偏りは認めなかった。これらの遺伝的License経路の保有が単独でHCC術後再発予後に影響するかを検討するため、年齢、性別、背景肝、腫瘍個数、最大腫瘍径、組織学的分化度、脈管侵襲、肝内転移、切除断端陽性の有無、計9項目を用いてPropensity score matching法による調整後、再発予後解析を行った。Propensity matching解析の結果、単独のKIR-HLAペアの保有は再発予後に有意な影響を認めなかった(図1)。

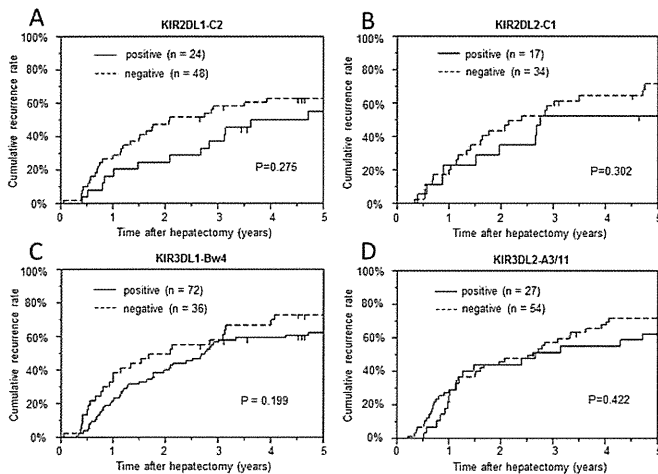


図1

しかし、個体における遺伝的なKIR-HLAペアの保有数により累積再発率曲線が階層化された(図2)。

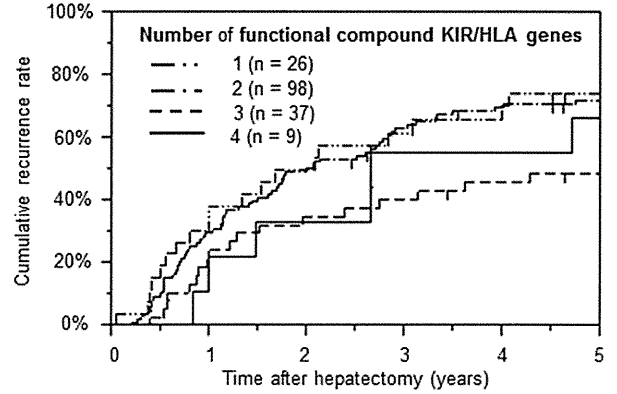


図2

そこで遺伝的に有効な KIR-HLA ペアが多い患者群(≥ 3 個 以下 Highly licensed NK 群)とペアが少ない群 (≤ 2 個 以下 Poorly licensed NK 群)を同じく Propensity score matching 法を用いて解析すると、Highly licensed NK 群の術後再発予後は Poorly licensed NK 群に比べ有意に良好であった ($P = 0.0183$, 調整 Hazard ratio 0.57, 95%信頼区間 0.35-0.90) (図3)。

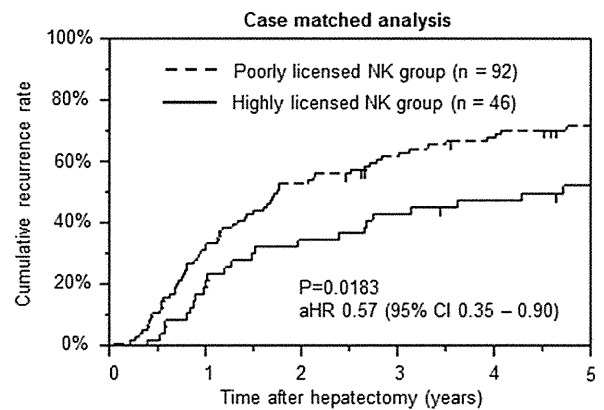


図3

この再発に対する有意性は HCV 感染の有無によるサブ解析では、非 HCV 感染患者群の解析では統計学的有意差を示したが、HCV 感染患者群の解析において統計学的有意差に至らなかった(図4)。

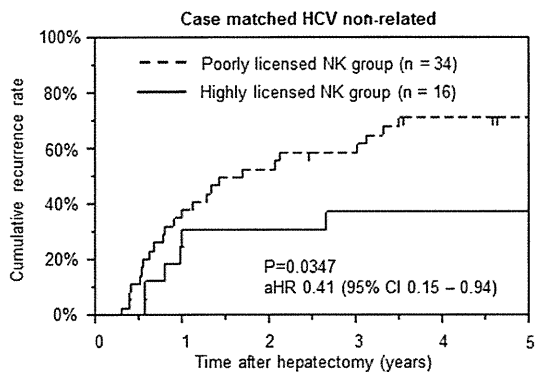
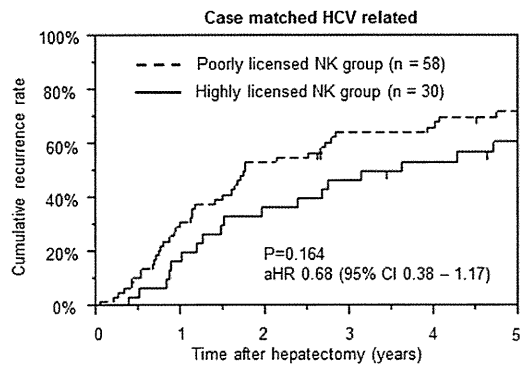


図4

D. 考察

治癒切除後の HCC 再発は依然多く、残存腫瘍細胞からの再発、もしくは障害肝を背景とした De novo 発癌に分けられるが、いずれも宿主の抗腫瘍免疫による制御の影響を受けていると考えられる。NK 細胞の License 機構は、細胞レベルで複数の License 経路の存在により、NK 細胞の潜在活性強化がより増強されることが報告されている。

本研究により遺伝レベルの KIR-HLA ペアの累積により、HCC 術後再発予後が良好な患者群が存在し、NK 細胞の License 効果が HCC 術後予後に強く関わることを示唆された。

また、HCV に関してはこれまで License に関わる KIR-HLA ペアのうち KIR2DL3-C1 の保有による自然寛解率の増加が報告されているが、今回の研究結果における HCV 感染患者での License 効果の減弱は、報告されている HCV ウイルス表面分子を介した NK 細胞活性抑制と矛盾しない結果であったと考える。

E. 結論

KIR-HLAによってもたらされるLicense効果を意図的に操作することができれば、HCCに対するNK細胞を用いた養子免疫療法を行う上で非常に強力なツールとなると考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

【総説】

1. 田中純子、片山恵子, HCV 感染の疫学の変化, 肝胆膵, 2013;67(6):811-818.
2. 田中純子、片山恵子, B 型肝炎の疫学 - キャリア率, キャリア数について-, 最新医学, 2013;68(3):14-21.
3. 田中純子, C 型肝炎はどのように日本で蔓延し肝癌をもたらしたのか -肝癌抑制の実地診療のすすめかた-, Medical Practice, 2013;30(2):194-202.

【原著】

1. Akita T, Ohisa M, Kimura Y, Fujimoto M, Miyakawa Y, Tanaka J, Validation and limitation of age-period-cohort model in simulating mortality due to hepatocellular carcinoma from 1940 to 2010 in Japan, Hepatology Research, 2013, in press.
2. Sato T, Do H S, Asao T, Akita T, Katayama K, Tatara K, Miyakawa Y, Tanaka J, Estimating numbers of persons with persistent hepatitis B virus infection transmitted vertically and horizontally in the birth cohort during 1950–1985 in Japan., Hepatology Research, 2013, in press.
3. Chen D-S, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN,

- Sung J, Tanaka J, Wakita T, Ward J, Wallace J, Report from a Viral Hepatitis Policy Forum on implementing the WHO framework for global action on viral hepatitis in North Asia, *Journal of Hepatology*, 2013;59(5):1073-1080.
4. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tanaka J, Kagebayashi C, Satomura S, High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma, *Journal of Gastroenterology*, 2013, in press.
 5. Kumada T, Toyoda H, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Tanaka J, Characteristics of elderly hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma patients, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013;28(2):357-364.
 6. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Niinomi T, Yasuda S, Ando Y, Yamamoto K, Tanaka J, Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients: a propensity score analysis, *Journal of Hepatology*, 2013;58(3):427-433.
 7. 仁科惣治、栗原淳子、則安俊昭、糸島達也、山本和秀、田中純子、日野啓輔、岡山県における肝炎ウイルス検診陽性者の医療機関受診等に関する追跡調査, *肝臓*, 2013;54(1):84-86.
 8. 松尾順子、片山恵子、中島歩、頼岡徳在、田中純子、広島透析患者肝炎 Study Group, 血液透析患者における肝炎ウイルス感染率と生命予後, *日本透析医会雑誌*, 2013;28(1):161-166.
 9. Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T, Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver disease with or without type 2 diabetes mellitus, *Journal of Gastroenterology*, 2013;48(4):515-525.
- 【著書】
1. 田中純子、片山恵子, 新しい診断と治療の ABC 肝硬変, 最新医学, 最新医学社, 2013:20-30.
 2. 田中純子, B 型肝炎に関する疫学調査の最新情報, B 型肝炎 最新治療コンセンサス (別冊・医学のあゆみ), 医歯薬出版株式会社, 2013:5-12.
 3. 片山恵子、田中純子, ウイルス肝炎 最新の疫学, 診断と治療, 診断と治療社, 2013;101(9):1287-1292.
 4. 田中純子、片山恵子、松尾順子, わが国における HBV 感染の疫学, de novo B 型肝炎, 医薬ジャーナル社, 2013:14-29.
 5. 片山恵子、田中純子, 肝炎・肝癌の疫学, Annual Review 消化器, 中外医学社, 2013:88-93.
 6. 田中純子, HBV 感染症のインパクト, HEPATOLOGY PRACTICE, 文光堂, 2013;1:27-35.
2. 学会発表
 1. 田中純子, ウイルス肝炎・肝がんの疫学と対策, 第 16 回長崎肝癌研究会学術総会 (長崎), 2014.02.19.

2. 田中純子, 肝炎ウイルス健診、新しいHCV 検査手順と今後の展望, 第 46 回日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会 ランチョンセミナー(広島), 2013.11.10.
3. 田中純子, ウイルス肝炎の疫学と対策最前線, 第 46 回日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会(広島), 2013.11.09.
4. 田中純子, 肝臓死亡率の予測に関する APC モデルを用いた解析の試み, 第 72 回日本癌学会学術総会(横浜), 2013.10.05.
5. 田中純子, B 型・C 型肝炎の疫学, 第 7 回 SMART-C (Specific Molecule Antiviral tReatment Tokyo - Hepatitis C)(東京), 2013.06.22.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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）

「多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による肝炎治療法の開発と臨床応用」
生体肝移植後の C 型肝炎ウイルス再感染に対する IFN 治療効果の検討および予防法の開発

研究分担者 今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 助教

1. 研究要旨:これまで C 型慢性肝炎患者における肝移植後 HCV 再感染に対する PEG-IFN/ribavirin (RBV) 療法の治療効果に IL28B 遺伝子型が関与していることを報告したが本年度はさらに症例数を増やし検討した. 生体肝移植後, genotype 1 型の HCV 再感染に対する PEG-IFN/RBV 療法の SVR 率は全体で 59% (16/27 例) であった. SVR 率をレシピエントの IL28B 遺伝子型 (rs8099917 SNP) 別に検討すると, TT で 68% (13/19 例) と TG/GG の 37% (3/8 例) に比べ高値であり, ドナーの IL28B 遺伝子多型別に検討すると TT で 68% (15/22 例) と TG/GG の 20% (1/5 例) に比べ有意に高値であった ($p=0.048$). 肝移植後の HCV 再感染に対する PEG-IFN/RBV 療法においてドナーおよびレシピエントの IL28B 遺伝子型がその治療効果に関与していることを表すものであった. またヒト肝細胞キメラマウスを用いてトロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤であるオザグレールおよびプロスタグランジン I の受容体 (IP) に対するアゴニストを投与し, その感染増殖に対する効果を検討したところいずれの薬剤も HCV の増殖を抑制した.

A. 研究目的

これまで C 型慢性肝炎患者における肝移植後の HCV 再感染に対する PEG-IFN/ribavirin (RBV) 併用療法の治療効果に IL28B 遺伝子 (rs8099917) 多型が関与していることを報告した. 本年度はさらに症例数を増やし検討した. また JFH1 感染性粒子産生系において HCV 感染性粒子産生阻害効果を示したトロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤であるオザグレールおよびプロスタグランジン I の受容体 (IP) の *in vivo* における抗 HCV 効果をヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討した.

B. 研究方法

Genotype 1 型の C 型慢性肝炎患者に対する肝移植後に HCV 再感染を生じた 27 例において PEG-IFN/RBV のウイルス排除 (sustained virological response, SVR) 率と IL28B 遺伝子型 (rs8099917 SNP) の関連を検討した. またヒト肝細胞キメラマウスに genotype 1b 型患者血清を投与し, その 1 週間後より 300 $\mu\text{g}/\text{日}$ のオザグレール (経口) あるいは 200 $\mu\text{g}/\text{日}$ の IP アゴニスト (皮下注) を 4 週間連日投与し, 1 週おきにマウス血液を採取し, 血中 HCV RNA 量を real-time PCR にて測定した.

C. 研究結果

Genotype 1 の C 型慢性肝疾患患者における肝移植後 HCV 再感染に対する PEG-IFN/RBV の

SVR率は全体で59% (16/27例)であった。SVR率をレシピエントのIL28B遺伝子型別に検討すると、TTで68% (13/19例)とTG/GGの37% (3/8例)に比べ高値であった。ドナーのIL28B遺伝子多型別に検討すると、SVR率はTTで68% (15/22例)とTG/GGの20% (1/5例)に比べ有意に高値であった(p=0.048)。これらの結果は、生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBVの治療効果においても、ドナーおよびレシピエントのいずれのIL28B遺伝子多型も関与していることを表すものであった。

ヒト肝細胞キメラマウスにおいて、オザグレルおよびIPアゴニスト投与群は非投与群に比べ血中HCV RNAが低値であり、これら薬剤のin vivoにおける抗HCV効果が示された。

D. 考察

生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV療法にはドナーおよびレシピエントの両者のIL28B遺伝子多型も関与していることが示された。ヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討結果から、オザグレルあるいはIPアゴニストがC型肝炎患者における生体肝移植後のHCV再感染の予防に有効である可能性を示すものである。

E. 結論

IL28B遺伝子多型は生体肝移植後のPEG-IFN/RBV療法の効果に関与している。ヒト肝細胞キメラマウスを用いてHCV再感染予防の検討が可能であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice with Humanized Livers. Gastroenterology. 2013;145:658-667

2.学会発表

なし

H.知的所有権の出願・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

肝臓内抗原提示細胞（マクロファージ及び類洞内皮細胞）による HCV 抗原提示機能の解明

研究分担者 的崎 尚 神戸大学大学院医学研究科 教授

尾上 隆司 国立病院機構呉医療センター臨床研究部 室長

研究要旨

C型ウイルス（HCV）持続感染には、HCV感染に伴う肝臓内抗原提示細胞の機能抑制が関与することが示唆されているが、その詳細は明らかではない。本研究では、マクロファージなどの抗原提示細胞に高発現する膜型分子 SIRP α とそのリガンド分子である膜型分子 CD47 との相互作用が HCV 感染細胞の貪食を介したマクロファージの HCV 抗原提示機能の制御に関与するかについて解析する目的で、肝組織の主要な抗原提示細胞であるマクロファージ（クッパー細胞）および類洞内皮細胞での SIRP α および肝組織での CD47 の発現について検討した。さらに、CD47 と SIRP α の結合阻害抗体による、オプソニン化 CD47 発現細胞のマクロファージによる貪食について解析を進め、抗 SIRP α 抗体が外来抗原を表出する HCV 感染細胞のマクロファージによる貪食排除の促進につながる可能性について検討した。また、肝臓に特徴的な抗原提示細胞である類洞内皮細胞における *in vivo* での免疫抑制能に関して検討し、類洞内皮細胞が HCV 由来ペプチド抗原提示により応答した T 細胞を抑制し免疫回避される可能性を検討した。

A. 研究目的

C 型ウイルス（HCV）感染では、非常に高率に持続感染が生じ、HCV 感染を持続化させる様々な免疫抑制機構や免疫逃避機構の存在が明らかとなりつつあり、その解明が HCV 感染の新たな治療法の確立や克服において重要な課題であると考えられている。分担研究者は、これまでにマクロファージなどの抗原提示細胞に強く発現する膜型分子である SIRP α を発見し、様々な細胞に発現する他の膜型分子である CD47 と細胞間で相互作用することで、細胞間シグナル CD47-SIRP α 系を形成することを見出している。さらに、赤血球上に発現する CD47 とマクロファ-

ージ上に発現する SIRP α との相互作用が、赤血球のマクロファージによる貪食を抑制的に制御することを明らかにしている。マクロファージなどの貪食細胞は、外来抗原を表出する細胞の貪食排除に重要な役割を果たしていることが知られているが、興味深いことに、HCV 感染を受けた肝組織では CD47 の発現量の増加が報告されている。すなわち、HCV 感染細胞の免疫抑制機構や免疫逃避機構の一つとして、マクロファージによる感染細胞の貪食や HCV 抗原提示後に生じる活性化 T 細胞を介した感染細胞の排除に、感染細胞上の CD47 とマクロファージ上の SIRP α との相互作用が抑制的に作用している可能性が