

想定される。しかしながら、HCV 感染細胞とマクロファージ間での CD47-SIRP $\alpha$  系の役割については、ほとんど明らかとはなっていない。

また肝臓は免疫学的に寛容な臓器として認識されているが、そのメカニズムの一つに類洞内皮細胞による免疫抑制機構が指摘されている。研究分担者は、マウス肝類洞内皮細胞によって抗原提示された T 細胞は Fas-FasL および PD1-PDL1 経路を介してアポトーシスに陥り、抗原特異的に免疫寛容が誘導されることを見出してきている。この現象は、類洞内皮細胞が HCV 由来のペプチド抗原を提示する可能性と、それによって応答した T 細胞が抑制され免疫回避される可能性を示唆する。しかしながら HCV 感染時の肝臓内での免疫反応抑制における類洞内皮細胞の役割は明らかになっていない。

そこで、本研究では、肝臓内の HCV に関する免疫機構、すなわちマクロファージの HCV 抗原提示機能および抗原提示を介した T 細胞機能制御における CD47-SIRP $\alpha$  系の役割、および肝類洞内皮細胞の HCV 抗原提示機能および HCV 抗原反応性 T 細胞機能抑制を介した免疫逃避機構を解明し、CD47-SIRP $\alpha$  系を利用した HCV 感染細胞の排除に向けた新たな治療法開発のための基礎的検討を行う。

## B. 研究方法

(1) SIRP $\alpha$  の肝組織での主要なマクロファージであるクッパー細胞における発現を検討する目的で、マウス由来肝組

織を用い、組織免疫染色および FACS による解析を行った。また、マクロファージと同様に肝組織での感染免疫応答に関わると考えられる抗原提示細胞である肝類洞内皮細胞での SIRP $\alpha$  の発現についても同様の解析を試みた。さらに、SIRP $\alpha$  の生理的なりガンド分子である CD47 の発現を明らかにする目的で、マウス由来肝組織を用い免疫染色を行うことにより検討した。

(2) CD47-SIRP $\alpha$  の相互作用の障害が、HCV などのウイルス感染細胞の貪食排除の促進に寄与するかについて検討する目的で、予備的検討として、抗 SIRP $\alpha$  抗体によりオプソニン化された CD47 発現細胞の貪食について *in vitro* での貪食実験を行った。

(3) 類洞内皮細胞の分離法を検討し、単離した類洞内皮細胞の抗原提示能に関わる分子表出を FACS を用いて検討した。

(4) *in vivo* での類洞内皮細胞の抗原特異的な免疫抑制能を検証する予備的検討として、同種抗原を用いた T 細胞増殖抑制実験および同種心移植実験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物個体および動物培養細胞を用いた実験を行っており、ヒト検体を用いた実験を行ってはいない。また、動物実験においては、学内の動物実験委員会の承認を得た上で、諸規則に則り動物愛護の精神を持って行った。

## C. 研究結果

(1) 抗 SIRP $\alpha$  抗体、およびマクロファージマーカーである F4/80 抗体、類洞内

皮細胞のマーカーである CD107a 抗体による肝組織の免疫染色の結果、SIRP  $\alpha$  と F4/80 の免疫染色像に高い類似性を認めたが、SIRP  $\alpha$  と CD107a との染色像では高い類似性は認められなかった。さらに、クッパー細胞および類洞内皮細胞における SIRP  $\alpha$  の発現の程度を FACS により評価したところ、F4/80、CD11b 陽性のクッパー細胞では SIRP  $\alpha$  の高発現を認めたが、CD31、CD107a 陽性の類洞内皮細胞での SIRP  $\alpha$  の発現の程度は非常に低いものであった。また、抗 CD47 抗体を用いたマウス肝組織の免疫染色の解析から、肝組織全体において CD47 の発現が認められ、正常肝細胞に CD47 が発現していることが確認された。

(2) 予備的実験として、抗体によりオプソニン化された CD47 発現細胞に対するマクロファージの貪食能を CD47-SIRP  $\alpha$  結合を解除する抗 SIRP  $\alpha$  抗体が促進するかについて評価した。その結果、CD47-SIRP  $\alpha$  結合を阻害する抗体では、マクロファージによる CD47 発現細胞の貪食の促進が認められたが、CD47-SIRP  $\alpha$  結合を解除しない抗体では貪食の促進は認められなかった。また、抗体によりオプソニン化されていない CD47 発現細胞のマクロファージによる貪食については、両抗体ともに貪食の促進は認められなかった。

(3) マウス肝臓から類洞内皮細胞を単離する目的で、コラゲナーゼ digestion 法と内皮細胞マーカーである CD105 分子に対する抗体を用いた magnetic sorting 法を用いた分離法を検討し、条件を最適化した結果、

高純度の類洞内皮細胞を単離することが可能であった。単離した類洞内皮細胞の FACS 解析では、CD105 陽性類洞内皮細胞では、抗原提示に必要なクラス II、CD40、CD86 を発現していた。さらにアポトーシス誘導分子である B7-H1 分子の表出も認めた。SIRP  $\alpha$  の発現検討では、発現は認めるものの CD31、CD107a 陽性細胞と同様、発現の程度は低いものであった。

(4) 予備的実験として単離した類洞内皮細胞を用いて、同種マウス脾細胞を抗原として T 細胞増殖抑制能の検討を行った。類洞内皮細胞と共培養した T 細胞は、同じ MHC をもつ同種マウス脾細胞による 2 次刺激に対して明らかな増殖抑制が認められた。さらに経門脈的に同種類洞内皮細胞を投与し肝臓内に生着させた免疫不全マウスを免疫再構築したマウスでは、*in vitro* 抗原特異的免疫抑制を認め、さらに類洞内皮と同ドナーからの心移植では生着延長が得られた。

#### D. 考察

肝組織における SIRP  $\alpha$  の発現様式や肝臓の主要なマクロファージであるクッパー細胞での発現について、これまで詳細な解析は十分になされていなかった。今回、マウス個体を用い、肝組織の免疫染色および FACS による解析から、F4/80、CD11b 陽性のクッパー細胞において SIRP  $\alpha$  が高度に発現していることが明らかとなった。また、CD47 は一般的に様々な細胞に発現すると考えられているが、本研究において CD47 が肝細胞に発現している

ことが免疫組織により確認された。すなわち、ウイルス感染などにより外来抗原を表出した肝細胞が、クッパー細胞などのマクロファージにより貪食される際には、CD47-SIRP $\alpha$ 系がその貪食制御に関与している可能性があると考えられた。また、興味深いことに、最近、がん細胞上に発現する CD47 がマクロファージ上の SIRP $\alpha$  と会合することでがん細胞の貪食を抑制すること、さらに、がん細胞では正常細胞に比べに CD47 を高発現しており、この高発現がマクロファージからの貪食回避に重要であることが報告されている。このことから、今後、HCV 感染により、肝細胞において CD47 の発現量が変動するかについて詳細に解析することも重要であると考えられる。一方、CD47-SIRP $\alpha$ 系の相互作用の阻害がマクロファージによるウイルス感染細胞の貪食の促進につながるかについて予備的検討を試みたところ、CD47-SIRP $\alpha$ の相互作用を阻害する抗 SIRP $\alpha$ 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。このことから、今後、マクロファージによるウイルス感染前もしくは後の肝細胞の貪食が CD47-SIRP $\alpha$ 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本研究によって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の細胞表面プロファイルを検討した結果、クラス II、CD40、CD86 の表出を認め、抗原提示細胞として

の機能を備えていると考えられた。同時に B7-H1 表出も認め、抑制性細胞であることが示唆された。このことは、続いて行った *in vitro* および *in vivo* での実験にて確認され、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- $\alpha$  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の検討する必要がある。

## E. 結論

本研究により、膜型分子である SIRP $\alpha$  が肝組織の主要なマクロファージであるクッパー細胞に高度に発現すること、また、CD47 が肝細胞に発現することから、CD47-SIRP $\alpha$ 系がクッパー細胞による肝細胞の貪食制御に関与する可能性が示された。また、CD47 と SIRP $\alpha$  の結合を阻害する抗 SIRP $\alpha$ 抗体が、マクロファージの貪食能を促進する活性を持つことから、今後、HCV 感染細胞のマクロファージによる貪食排除の促進への抗 SIRP $\alpha$ 抗体の応用の可能性が期待された。また類洞内皮細胞に関しては高純度な類洞内皮細胞の分離方法を確立した。分離した類洞内皮細胞を用いた解析より、抗原提示に必要な分子を発現し抗原提示細胞であることが示されると同時に、抗原特異的に免疫抑制能を持つことが確認された。さらに貪食機能を制御する膜型分子である SIRP $\alpha$  を発現しており、CD47-SIRP $\alpha$ 系を介した HCV 感染細胞の貪食機構への関与を今後検討していく予定である。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP $\alpha$  signaling system: its physiological roles and therapeutic application. J Biochem, 2014; in press.
2. Murata Y, Saito Y, Kaneko T, Kotani T, Kaneko Y, Ohnishi H, Matozaki T. Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRP $\alpha$  signaling pathway. Methods, 2014; 65(2):254-9.
3. Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K. The BALB/c-specific polymorphic SIRP $\alpha$  enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. Exp Hematol, 2014; 42: 163-171
4. Koskinen C, Persson E, Baldock P, Stenberg A, Bostrom I, Matozaki T, Oldenborg PA, Lundberg P. Lack of CD47 impairs bone cell differentiation and results in an osteopenic phenotype in vivo

due to impaired signal regulatory protein alpha (SIRP $\alpha$ ) signaling. J Biol Chem, 2013; 288(41):29333-44.

5. Zen K, Guo Y, Bian Z, Lv Z, Zhu D, Matozaki T, Liu Y. Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP $\alpha$  cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state. Nat Commun, 2013; 4:2436.

6. Takahashi S, Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Hamatani H, Watanabe M, Ikeuchi H, Kaneko Y, Maeshima A, Aoki T, Ohnishi H, Matozaki T, Nojima Y. SIRP $\alpha$  signaling regulates podocyte structure and function. Am J Physiol Renal Physiol, 2013; 305(6):F861-70.

7. Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic *Sirpa* is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. Blood, 2013; 121(8):1316-25.

8. Banshodani M, Onoe T, Shishida M, Tahara H, Hashimoto S, Igarashi Y, Tanaka Y, Ohdan H. Adoptive transfer of allogeneic liver sinusoidal endothelial cells specifically inhibits T-cell responses to cognate stimuli. Cell Transplant. 2013;22(9):1695-708.

9. 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 Jun 27;95(12):1521-7.

10. Yanai H, Matsuda A, An J, Koshihara R, Nishio J, Negishi H, Ikushima H, Onoe T, Ohdan H, Yoshida N, Taniguchi T. Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Dec 17;110(51):20699-704.

2. 学会発表  
なし

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

## 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

研究分担者 加藤 宣之 岡山大学 教授  
研究協力者 團迫 浩方 岡山大学 助教

**研究要旨：**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、この目的を達成するために、HCV タンパク質を発現するヒト不死化肝細胞を作成し、以下に示すような成果を得た。（1）マイクロアレイによる網羅的解析により、HCV タンパク質の発現が NK 細胞により認識されるリガンドのシグナル強度の低下に関与していることが分かった。（2）定量的 RT-PCR 法により、（1）のリガンドの遺伝子発現量の低下が確認された。

### A. 研究目的

我が国の肝がんによる犠牲者は毎年 3 万人を超えており、その 8 割以上が C 型肝炎ウイルス（HCV）に感染している。長期にわたる HCV 感染は慢性肝炎を引き起こし、この慢性肝炎が将来的に肝硬変や肝がんに行進する可能性が高く、社会的な問題となっている。我が国では、HCV 感染患者に対して、体内の HCV 量を減らすため、ペグ-インターフェロンとリバビリンの併用療法といった内科的療法が行われていたが、その著効率は 50% 程度であった。最近、プロテアーゼ阻害剤であるテラプレビルを加えた三剤併用療法が開始され、著効率は 70% 程度に改善されたが、貧血や皮膚症状などの副作用や、耐性株の出現等の問題点も指摘されている。一方、肝がんの治療において、腫瘍の切除等の外科的療法が確実な治療法であるが、再発が多いことが知られている。その原因の一つとして、体内に残る HCV により慢性肝炎が継続していることが考

えられている。これらのことから、HCV を体内から完全に排除し、持続感染さらには慢性肝炎を阻止することが肝がんの発症や再発を予防する意味で最も重要である。そのためには、HCV の持続感染により誘導される自然免疫応答機構を解明することが必要とされる。

ナチュラルキラー（NK）細胞は生体の自然免疫応答を司る細胞障害性リンパ球の一つである。NK 細胞はウイルス感染細胞やがん細胞を認識し、これらの異常細胞を殺傷する能力を持っている。最近、肝がんに対する肝移植後において、肝がんの再発予防のために、ウイルス感染に対する抵抗力を保持したまま、抗腫瘍効果が得られる細胞免疫療法として、NK 細胞療法が行われている。NK 細胞はウイルス感染細胞表面上に表出している表面抗原の違いを認識することで、正常細胞と異常細胞を区別していることが知られているが、HCV 存在下での表面抗原の表出についてはあまり情報が無い。現在までに、HCV の生活環を完全

に再現できる細胞株として、二種類の肝がん細胞株 (HuH-7とLi23) が報告されている。国内外のグループにより、HuH-7細胞を用いて、NK細胞により認識される表面抗原やリガンドのHCV感染による影響が解析されている。しかしながら、NK細胞はウイルス感染細胞だけでなく、がん細胞も認識することが報告されている。また、正常細胞とがん細胞を比較した場合、表面抗原に違いがあることが報告されている。そのため、これらの研究に肝がん細胞株を用いた場合、HCVによる影響のみを解析することが難しい可能性がある。そこで、本研究では、非腫瘍性の表現型を持つヒト不死化肝PH5CH8細胞において、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て明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞の作成。

約9600塩基からなるHCVのゲノムRNA上には、3000アミノ酸で構成された1つの前駆体ポリペプチドがコードされている。翻訳されたポリペプチドは宿主あるいはウイルス由来のプロテアーゼにより切断され、ウイルス粒子を構成する構造領域であるコア (core)、エンベロープ (E) 1、E2及びp7と、非構造領域 (NS: non-structural) であるNS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A及びNS5Bの全10種類のウイルスタンパク質が産生される。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するヒト不死化肝PH5CH8細胞を作成した。

最初に、O株 (遺伝子型1b) 由来のHCVの全遺伝子構造物を含むベクターを鋳型として、

前半領域、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領域をPCR法にて増幅した。増幅したPCR断片はレトロウイルスベクター (pCX4bsr) に導入した。このレトロウイルスベクターはブラストサイジン耐性遺伝子をコードしており、HCVタンパク質を発現する細胞のみを選択することが可能である。

次に、作成した発現ベクターをパッケージング細胞 (BOSC23細胞) にトランスフェクション後、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回収した。また、ベクターのみも同様の処理を行い、コントロールとした。回収したレトロウイルスはヒト不死化肝PH5CH8細胞に感染後、ブラストサイジンにより選択培養し、コントロール細胞 (PH5CH8/Control細胞)、前半領域のHCVタンパク質を発現する細胞 (PH5CH8/C-NS2細胞)、及び後半領域のHCVタンパク質を発現する細胞 (PH5CH8/NS3-5B細胞) を作成した。

(2) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞でのマイクロアレイ解析。

(1) で作成した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) とコントロール細胞 (PH5CH8/Control細胞) から、全RNAを抽出した。抽出した全RNAを用いたマイクロアレイ解析はタカラバイオ社の受託サービス (45,000プローブからなるAffymetrix GeneChipを使用) を利用した。得られたデータから、自然免疫応答に関わる宿主因子のシグナル強度を抽出した。

(3) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞での表面抗原の遺伝子発現量の定量。

(2) で得られたマイクロアレイのデータが実際の遺伝子発現量を反映しているかどうか

かを確認するために、定量的RT-PCR法により、自然免疫応答に関わる宿主因子の遺伝子発現量を定量した。

#### (倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞及び核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

### C. 研究結果

#### (1) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞の作成。

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。これらの細胞内のcore、NS3あるいはNS5Bタンパク質の発現はWestern blot法により確認することができた。

#### (2) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞でのマイクロアレイ解析。

(1) で作成したPH5CH8/C-NS2細胞、PH5CH8/NS3-5B細胞とPH5CH8/Control細胞のマイクロアレイ解析はタカラバイオ社の受託サービスを利用した。マイクロアレイ解析により得られたデータを用いて、自然免疫応答に関わる宿主因子のシグナル強度をこれらの細胞間で比較した。その結果、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞では、細胞死受容体 (DR4、DR5、DcR1及びDcR2) のシグナル強度には変化がないことがわかった。一方、

NK細胞により認識される主要組織適合抗原 (MHC) の古典的クラス1分子に属するヒト白血球抗原 (HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F及びHLA-G) や非古典的クラス1分子に属するMICAやMICBのシグナル強度にも同様に変化がなかった。しかしながら、同じく非古典的クラス1分子に属するULBP1はPH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞において、そのシグナル強度は顕著に低下していた。ULBP2とULBP4はPH5CH8/C-NS2細胞において、そのシグナル強度は低下していたが、PH5CH8/NS3-5B細胞においては変化がなかった。また、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞では、ULBP3のシグナル強度には変化がなかった。

#### (3) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞での表面抗原の遺伝子発現量の定量。

(2) でシグナル強度の低下が確認されたりリガンドの遺伝子発現量を、定量的RT-PCR法により定量した。その結果、マイクロアレイ解析の結果と同様に、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞において、ULBP1の遺伝子発現量は有為に低下していた。また、PH5CH8/C-NS2細胞において、ULBP2の遺伝子発現量は有為に低下していたが、PH5CH8/NS3-5B細胞においては変化がなかった。これらの結果は、HCVタンパク質の発現がULBP1などのリガンドの遺伝子発現量に影響を与えていることを示唆している。HCVはこれらのリガンド量に影響を与えることにより、NK細胞による認識から逸脱している可能性が考えられる。

### D. 考察

#### (1) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞の作成。

今年度、前半領域のHCVタンパク質を発現する細胞 (PH5CH8/C-NS2細胞) 及び後半領域のHCVタンパク質を発現する細胞 (PH5CH8/NS3-5B細胞) を作成することができた。次年



度以降、HCVの全タンパク質を発現する細胞の作成を試みる。また、本研究で見出した現象に關与するHCVタンパク質を特定するために、個々のHCVタンパク質を発現する細胞の作成も同様に試みる。

(2) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞でのマイクロアレイ解析。

今年度、前半領域あるいは後半領域のHCVタンパク質を発現する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。次年度以降、その他の自然免疫応答関連遺伝子のシグナル強度の解析やパスウェイ解析を行い、遺伝子変動の起こったパスウェイの推定も試みる。

(3) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞での表面抗原の遺伝子発現量の定量。

マイクロアレイによる網羅的解析により、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。次年度以降、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞におけるULBP1のタンパク質レベルをWestern blot法により検討する。また、フローサイトメーターにより、これらの細胞の細胞表面に表出しているULBP1量を測定する予定である。NK細胞は細胞表面に表出しているULBP1を認識することにより、インターフェロン- $\gamma$  (抗ウイルス効果に關与)、アラキドン酸 (炎症効果に關与) や細胞障害効果を示すことが報告されている。そこで、HCVタンパク質を恒常的に発現するPH5CH8細胞とNK細胞との共培養下で、これらの効果が確認

されるかどうかは次年度以降の検討課題である。また、今年度、見出した現象に關与するHCVタンパク質を特定することも今後、必要であると考えられる。

## E. 結論

今年度の成果は以下のとおりである。

(1) 前半あるいは後半領域のHCVタンパク質を発現するヒト不死化肝細胞を作成した

(2) マイクロアレイによる網羅的解析により、前半あるいは後半領域のHCVタンパク質を発現するヒト不死化肝細胞において、NK細胞により認識されるリガンド (ULBP1等) のシグナル強度が低下していることを見出した

(3) これらのリガンドの遺伝子発現量の低下を定量的RT-PCR法により確認した。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, Kato N, Lemon SM. Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. *PLoS Pathogens*, 9: e1003345 (2013).
- 2) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosin kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology*, 58: 1236-1244 (2013).
- 3) Ueda Y, Takeda M, Mori K, Dansako H, Wakita T, Kim HS, Sato A, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. New preclinical antimalarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLoS ONE*, 8: e72519 (2013).
- 4) Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems.

PLoS ONE, in press (2014).

## 2. 学会発表

- 1) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for hepatitis C virus through the association with core protein around lipid droplet. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October, 2013.
- 2) Ueda Y, Mori K, Sato S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of *Cordyceps militaris* used as a Chinese herbal medicine. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October, 2013.
- 3) 團迫 浩方、平本 洸貴、池田 正徳、脇田 隆宇、加藤 宣之. Rab18 は C 型肝炎ウイルスの感染性粒子形成に重要な宿主因子である. 第 6 1 回 日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 1 1 月

## 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

## 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

研究分担者 田原栄俊 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

**研究要旨** 生体肝移植患者に移植後 NK 細胞を導入することにより、ドナー肝組織の C 型肝炎ウイルスによる感染の防御が可能であり、患者に負担を強いることなく NK 細胞を大量に得るためには、患者自身の iPS 細胞を NK 細胞に分化誘導する方法が有効である。本研究では iPS 細胞から NK 細胞の分化誘導を試みた。iPS 細胞から CD34<sup>+</sup>細胞の分化誘導効率は 3～10%と低く、CD34<sup>+</sup>細胞から CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>細胞（NK 細胞）への分化誘導効率は 10～20%であった。分化誘導効率が低い原因を明らかにするため、得られた CD34<sup>+</sup>細胞における寿命・老化関連遺伝子の発現を解析したところ、iPS 細胞から分化誘導した CD34<sup>+</sup>細胞では老化遺伝子 p21 及び p16 の発現の顕著な上昇は認められなかったが、寿命の延長に関連するテロメラーゼ及び Bmi-1 の発現が強く抑制されていた。

### A. 研究目的

ヒト iPS 細胞から CD45<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>細胞 (NK 細胞) を得るためには、iPS 細胞から CD34<sup>+</sup>細胞を、そして CD34<sup>+</sup>細胞から CD56<sup>+</sup>細胞を効率よく分化誘導する必要がある。Kaufman らのヒト ES 細胞からの NK 細胞の分化誘導法にしたがい、iPS 細胞から CD34<sup>+</sup>細胞、及び CD34<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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する目的で、寿命・老化関連遺伝子の発現解析を行った。

### B. 研究方法

iPS 細胞から CD34<sup>+</sup>細胞へ分化誘導開始 14, 21, 28 日後のサンプル及び末梢血 CD34<sup>+</sup>陽性細胞から RNA を抽出し、CD34, hTERT, Bmi-1, p21, p16 の発現を qRT-PCR で比較検討した。

（倫理面への配慮）

該当なし

### C. 研究結果

iPS 細胞から分化誘導した CD34<sup>+</sup>細胞における CD34 mRNA の発現を、末梢血由来 CD34<sup>+</sup>細胞と比較したところ、分化誘導 28 日の iPS 細胞由来 CD34<sup>+</sup>細胞における CD34 mRNA の発現レベルは、末梢血由来 CD34<sup>+</sup>細胞と同等であった。この結果から、CD34 mRNA の発現レベルからみた分化の程度は、iPS 細胞由来 CD34<sup>+</sup>細胞と末梢血由来 CD34<sup>+</sup>細胞は同等であることが示唆された。

次に、老化関連遺伝子 p16 遺伝子の発現レベルを比較したところ、末梢血由来 CD34<sup>+</sup>細胞と比較して、分化誘導 28 日の iPS 細胞由来 CD34<sup>+</sup>細胞において p16 mRNA の発現はやや上昇していた。一方、もう一つの老化関連遺伝子 p21 の発現レベルは、末梢血由来 CD34<sup>+</sup>細胞と比較して、iPS 細胞由来 CD34<sup>+</sup>細胞にでは 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<sup>+</sup>細胞において、テロメラゼ及びBmi-1の発現はどちらも1/5程度であった。

#### D. 考察

以上の結果から、末梢血由来CD34<sup>+</sup>細胞からNK細胞への分化誘導効率と比較して、iPS細胞由来CD34<sup>+</sup>細胞からのNK細胞への分化誘導効率が非常に低い原因として、細胞の分裂寿命の延長に働くテロメラゼ及びBmi-1の発現の低下が強く示唆された。

#### E. 結論

iPS細胞由来CD34<sup>+</sup>細胞からのNK細胞への分化誘導をより効率的に行うためには、分裂能の低下を抑制する分化誘導法や、積極的に分裂能を高めるような遺伝子操作を行った細胞株の樹立が必要である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamasaki, S., Taguchi, Y., Shimamoto, A., Mukasa, H., Tahara, H., Okamoto, T.  
Generation of Human Induced Pluripotent Stem (Ips) Cells in Serum- and Feeder-Free Defined Culture and TGF- $\beta$ 1 Regulation of Pluripotency. PLoS One  
9. e87151. 2014

Shiotani, B., Nguyen, H.D., Håkansson, P., Maréchal, A., Tse, A., Tahara, H., Zou, L.  
Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1  
Cell Rep. 3. 1651–1662. 2013

Tahara, H., Kay, M.A., Yasui, W., Tahara,

#### E.

MicroRNAs in Cancer: the 22nd Hiroshima Cancer Seminar/the 4th Japanese Association for RNA Interference Joint International Symposium, 30 August 2012, Grand Prince Hotel Hiroshima.  
Jpn J Clin Oncol. 46. 579-582. 2013

##### 2. 学会発表 なし。

#### 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。

## 『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

研究分担者 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  
病態解析領域 特任准教授

### 研究要旨

我々は『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効果のメカニズムを解明する目的で、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リズム解析／HLA-Flow法で検討した。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ために何らかの標識を施すことが必要と思われる。

### A. 研究目的

我々の研究目的は、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、抗肝癌・HCV効果のメカニズムを解明することである。そのため平成25年度は、肝移植後に投与されたNK細胞の生体内動態を知る目的で、NK細胞移入療法後に経時的に採取された末梢血検体をキメリズム解析／HLA-Flow法で解析した。

### B. 研究方法

#### 【患者と検体】

解析対象患者は、広島大学医学部消化器・移植外科学で生体肝移植を受けたミラノ基準外肝癌の患者である。NK細胞移入療法は、生体肝移植後3日目に行なわれた。患者の末梢血の採取は、通常は移植後1、3、6、13、20、27日目に行った。移植後1および3日目の検体は、NK細胞移入療法が行なわれる前に採血された。採血後、末梢血からファイコール比重遠心法で単核細胞を分離し、凍害保護液を添加して凍結保存した。

#### 【染色とフローサイトメトリー解析】

東大医科研で解凍後に蛍光標識抗体で染色し、BD FACS Aria II SORP（Becton Dickinson社）で測定した。得られたFCSデータをFlowJoソフトウェアで解析し、白血球サブセットごとのキメリズム、およびNK細胞分画におけるTRAIL分子の発現レベルを解析した。典型例として、症例1のキメリズム解析に用いた蛍光標識抗体の組合せを表1に示す。

広島大学から提供された凍結保存検体は、NK療法症例が9例、NK療法非施行症例が3例であった。NK療法を行なった9症例中の2例では、ドナーとレシピエントのHLAの組合せからHLA-Flow法によるキメリズム解析が困難と判断され、残り7例を解析した。NK療法を行なわなかった3症例のうち、1例では抗HLA-A1抗体がレシピエントHLA-A\*01:02を染色できず、キメリズムを解析できなかった（表2）。

（倫理面への配慮）

広島大学医学部消化器・移植外科学で研究

表1 症例1のキメリズム解析に使用した染色組合せ

CDナンバーの下に会社名とクローン名を記す。

Stain 1: Lineage-specific chimerism						SA-APC				
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	Pacific Blue	Pacific Orange
A2(R)	CD253	CD235a/ PI	CD8	CD56	CD3	Biotin-A9(D)	CD16	CD19	CD4	CD14
AbD	BL	BL /-	BL	BDP	inv	OL	BL	BL	BL	CAL
BB7.2	RIK-2	HIR2	RPA-T8	B159	S4.1	IH0964	3G8	HIB19	RPA-T4	Tuk4

Stain 2: Isotype control for Stain 1						SA-APC				
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	Pacific Blue	Pacific Orange
A2(R)	IgG1	CD235a/ PI	CD8	CD56	CD3	Biotin-A9(D)	CD16	CD19	CD4	CD14
AbD	BL	BL /-	BL	BDP	inv	OL	BL	BL	BL	CAL
BB7.2	MOPC-21	HIR2	RPA-T8	B159	S4.1	IH0964	3G8	HIB19	RPA-T4	Tuk4

AbD, AbD-serotec; BL, BioLegend; BDP, BD Pharmingen; inv, invitrogen; OL, One Lambda; CAL, CALTAG invitrogen

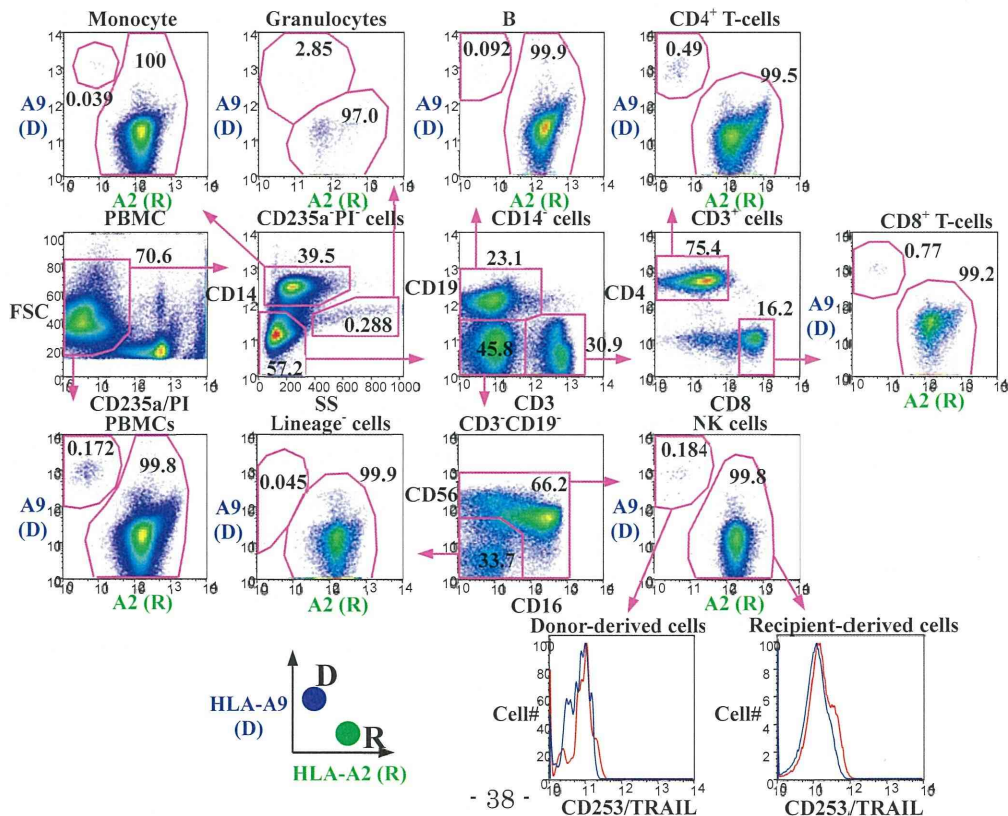
表2 症例解析の結果

赤文字の採血日は、有意な頻度（全単核細胞中0.1%以上）のドナー由来細胞が検出された日を表す。紫文字の採血日は、解析細胞数が少なかったり、抗体の染色性が不良であったりしたため解析ができなかった日を表す。

Date of Analysis	UPN	Sampling Date	Donor		Recipient	
			HLA-A	HLA-B	HLA-A	HLA-B
<b>NK therapy (+)</b>						
120412	Case 1	Day 20	24:03/33:03	03:02/07:02	02:07/33:03	46:01/58:01
120511	Case 2	Day 3, 16	24:02/24:02	15:07/40:02	24:02/02:01	15:07/35:01
120522	Case 3	Day 6, 13, 20, 24; Donor	11:01/31:01	40:01/48:01	31:01/33:03	40:01/44:03
120522	Case 4	Day 6, 13, 20; Donor	31:01/31:01	07:02/35:01	24:02/31:01	07:02/54:01
120525	Case 5	Day 1, 13, 20, 27; Donor	02:07/24:02	46:01/54:01	24:02/33:03	44:03/54:01
120525	Case 6	Day 10, 13, 20, 27; Donor	11:01/31:01	15:01/55:02	24:02/26:03	15:01/46:01
120525	Case 7	Day 3, 6, 27; Donor	02:01/26:01	15:11/56:01	02:01/26:01	15:11/52:01
<b>NK therapy (-)/Negative controls</b>						
120525	Case 8	Day 3, 6, 13, 21, 27; Donor	02:06 02:01	13:01/48:01	02:06 24:02	40:06/48:01
131113	Case 9	Day 3, 6, 13, 16, 27; Donor	31:01/33:03	44:03 51:01	24:02/31:01	51:01/52:01
131114	Case 10	Day 3, 6, 13, 20, 27; Donor	11:01/24:02	07:02/40:01	11:01/01:02	07:02/40:01

Anti-HLA-A1 antibody (clone: H0331) does not stain HLA-A\*01:02-positive cells

図1 症例1のフローサイトメトリーによるキメリズム解析



計画書を作成し、同大学の倫理審査委員会に提出し、承認された。患者への研究計画の説明および同意の取得は広島大学で行なわれており、医科研では行なわなかった。検体の取り違いを避ける目的で、患者検体には患者名が記入されており、医科研でもそれらの情報を報告書等で使用した。個人情報に記載されたデータは、研究室内のパスワードを設定したコンピュータと施錠したロッカーで厳密に保管し、個人情報の保護に留意した。

### C. 研究結果

解析を行なったNK療法症例7例のうち、有意な頻度（全単核細胞中で0.1%以上）のドナー由来細胞を検出できたのは5例であった（表2）。ドナー由来細胞の頻度は、最も高いものでも全単核細胞中で0.67%であった。検出されたドナー由来細胞のフェノタイプは様々で、NK細胞がとくに高頻度検出されることはなかった。図1に典型的な解析結果（症例1、移植後20日目）を示す。ドナー由来のNK細胞が検出された症例では、細胞表面のTRAIL分子の発現レベルを解析したが、アイソタイプコントロールと比べて発現レベルが高い症例はなかった（図1）。

一方、解析を行なった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（表2）。

### D. 考察

広島大学では肝臓移植に際し、肝グラフト内の血液を体外で灌流し、その排液から大量の未成熟NK細胞が分離して、抗癌分子（TRAIL）を誘導することに成功している。さらに、これらの活性化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。したがって、NK細胞移入療法が抗肝癌作用を発揮していることは間違いない。

NK細胞移入療法の抗肝癌作用のメカニズムとして、移入された肝由来活性化NK細胞が

患者の体内で抗腫瘍効果を発揮してい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。そこで本年度の研究では、移入した肝由来活性化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検討した。

本細胞療法では、 $2 - 5 \times 10^8$ 個の肝臓由来細胞（NK細胞の頻度は平均46.4%）を3日間の活性化培養後に輸注している（Ohira M, et al. J. Clin. Invest. 119: 3226-3235, 2009）。したがって、NK細胞数が培養中に変化しなかったと仮定すると、輸注されるNK細胞は $2 \times 10^8$ 個程度と推定される。それらがレシピエントに輸注され、全血液中に均等に分散したとすれば、 $2 \times 10^8 \text{ cells}/5,000 \text{ ml} = 40 \text{ cells}/\mu\text{l}$ の頻度となる。末梢血におけるNK細胞の頻度は個人差が大きいが、 $300 \text{ cells}/\mu\text{l}$ とすると、約10%がドナー由来のNK細胞で占められる。NK細胞の一部は培養中や輸注後に破壊されたり、血管外の臓器・組織に分布すると考えられるが、末梢血のキメリズム解析／HLA-Flow法の検出感度は0.1%以下であるから、輸注されたNK細胞を検出することは理論上不可能ではない。

解析の結果、NK療法を施行した7症例において、有意な頻度のドナー由来細胞が検出されたのは5例のみであった。また、それら5例においても、ドナー由来細胞のうちNK細胞がとくに高頻度である症例はなかった。また、ドナー由来NK細胞表面には、TRAIL分子の発現は認められなかった。一方、NK療法非施行症例の2例においても、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された。これは、移植されたドナー肝臓の血管系に付着していた血液細胞が遊離して、レシピエントの流血中に流れ込んだものと思われる。

### E. 結論

NK細胞移入療法を受けた症例において、移植肝臓から流血中に流入したと思われるNK細胞を明らかに上回る頻度のドナー由来のTRAIL陽性NK細胞は、いずれの症例でも検出されなかった。また、NK細胞移入療法前（移

植後1日目と3日目)の末梢血や、NK細胞移入療法自体を受けていない患者においても、肝移植後にドナー由来細胞が検出された。それらは移植されたドナー肝臓の血管から遊離したドナー由来の血液細胞と思われた。

したがって、輸注したNK細胞を末梢血で検出しようと試みる場合、移植されたドナー肝臓から遊離した細胞と区別する必要がある、我々が使用した方法論で証明することは困難と思われた。

NK細胞移入療法で輸注された細胞を特異的に検出するためには、細胞療法に使用する培養細胞に何らかの標識を施す必要がある。今後、移入した細胞の末梢血での動態を把握するための標識方法を考えたい。また、移植後にドナー肝臓から遊離して末梢血に存在するドナー由来細胞については、移植された臓器に対する免疫寛容の誘導など、その生理的な意義が注目される。今後の検討課題として注目したい。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

なし。

#### 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。



### iPS 細胞および CD34<sup>+</sup> 細胞からの NK 細胞誘導と効率化の検討

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  
研究分担者 田中友加 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 助教

**研究要旨** 本研究では、iPS 細胞および CD34<sup>+</sup>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 で評価した。さらに、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。その結果、抗 HCV 効果には誘導 NK 細胞の NKG2D,CD226 発現、IFN- $\gamma$  産生能が重要であることがわかった。その一方で、CD11b/CD11c 陽性の骨髄系細胞の混入は感染を助長する可能性が高いことが示唆された。

#### 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(特開2007-332103)。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細胞の誘導に成功した。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、NK細胞への分化誘導効率とウイルス抑制にかかわる機能分子の探索を実施した。

#### B. 研究方法

##### 1. CD34<sup>+</sup>血液幹細胞由来リモデリングNK細胞のHCV感染抑制能の*in vivo*評価

CD34<sup>+</sup>血液幹細胞をRONZA社のX-VIVO mediumにStem Cell Factor(SCF)、Flt-3、Interleukin(IL)-15、IL-7、Human AB血清を加え28日間培養後、NK細胞活性化を目的としてIL-12およびIL-18をDay25とDay28に添加した。これまでの研究において、培養28日におけるNK細胞の誘導効率は、20~95%とロット間で差を認めているため、誘導細胞を磁気ソーティング法によってNK細胞群と非NK細胞群に分離し、各々のHCV感染抑制能についてHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルを用いて評価した。

## 2. リモデリング NK 細胞の *in vitro* 感染抑制能の評価

NK 細胞の HCV ウイルス増幅抑制効果について、HCV レプリコン保持肝細胞株 (Huh-7) を Target cell として *in vitro* replicon assay system で評価した。E:T ratio=10:1 で、CD34<sup>+</sup> 血液幹細胞から誘導した NK 細胞あるいは非 NK 細胞と HCV レプリコン保持肝細胞株を共培養し、48 時間後の HCV レプリコン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。

NK 細胞は IFN- $\gamma$  介在性に抗 HCV 効果を発揮することがわかっているため、anti-IFN- $\gamma$  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。また、最近 TNF- $\alpha$  が HCV の感染を助長するとの報告があるため、anti-TNF- $\alpha$  ブロッキング抗体による HCV 複製能の変化についても検討した。

## 3. HCV 感染防御に関わる NK 細胞機能分子の探索

分化誘導 NK 細胞の表面抗原をフローサイトメトリーで解析し、活性化および抑制性機能分子とサイトカイン産生能と HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスでの *in vivo* 感染抑制能との関連性について解析した。さらに、NK 細胞以外で誘導されている細胞群の同定を試みた。

## 4. iPS 誘導性 NK 細胞の誘導効率の検討

ヒト線維芽細胞由来の iPS 細胞株 (01 株) を用いて、M210-B4 (マウス骨髄線維芽細胞) とともに 24 日間培養し、造血幹細胞 (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) に分化させ、その後磁気ソーティング法で CD34<sup>+</sup>細胞を分離後、AFT-024 (マウス胎児肝線維芽細胞)、サイトカイン (IL-15, IL-7, SCF, Flt3-L, IL-3) とともに 30 日間培養し、NK 細胞に分化させている。細胞増殖率と形態学的評価とともにフローサイトメトリーによる NK 細胞分化効率を解析した。

## 5. 末梢血 CD34<sup>+</sup>細胞からの NK 細胞誘導

骨髄からではなく末梢血から CD34<sup>+</sup>細胞を効率良く採取し NK 細胞をリモデリングする手法は、今後臨床応用するうえで有用である。そこで、同意を得られた健常人ボランティアの末梢血から採取した CD34<sup>+</sup>細胞からの NK 細胞リモデリングを行い、リモデリング NK フェノタイプの結果が骨髄由来 CD34<sup>+</sup>細胞と同等か否かを検討した。

### C. 研究結果

#### 1. CD34<sup>+</sup>血液幹細胞由来リモデリング NK 細胞の HCV 感染抑制能の *in vivo* 評価

ヒト肝細胞キメラマウスに、ジェノタイプ 1b 型の HCV 感染血清を接種すると、高率に HCV 持続感染が成立する。このモデルを用い、血清接種 24 時間以内に誘導細胞を移入し、感染防御し得るか否かをマウス血清中の HCV-RNA 値を測定して評価した。その結果、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 (図 1)。

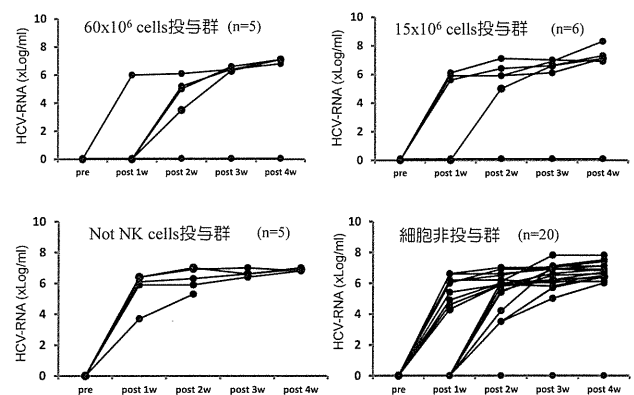


図 1 . リモデリング NK 細胞の HCV 感染抑制能評価 (ヒト肝キメラマウスモデル)

#### 2. リモデリング NK 細胞の *in vitro* 感染抑制能の評価

CD34<sup>+</sup>細胞から分化誘導した細胞の HCV ウイルス増幅抑制効果を確認するため、*in vitro*

replicon assay systemによるHCVウイルス増幅抑制能を評価した。また、抗ヒトIFN- $\gamma$ あるいはTNF- $\alpha$ モノクローナル抗体を添加したブロッキングアッセイを行った。その結果、誘導NK細胞は強い抗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(図2)。さらに、抗ヒトIFN- $\gamma$ において有意な抑制の解除を示した一方で、TNF- $\alpha$ 抗体は影響を及ぼさなかった(図3)。

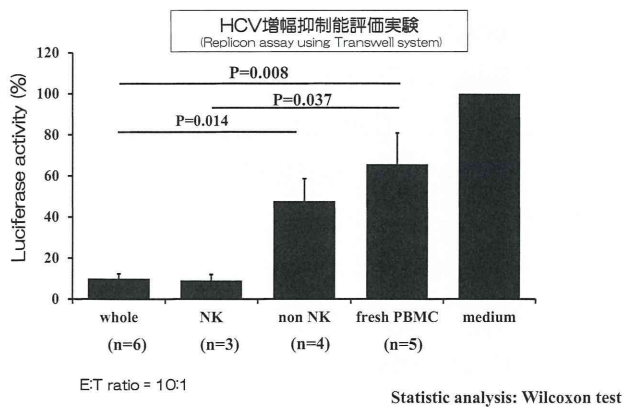


図2. リモデリング細胞のHCV増幅抑制能評価実験

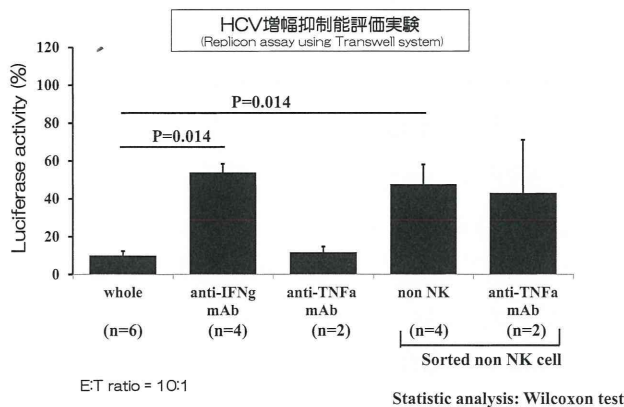


図3. リモデリング細胞のHCV増幅抑制能評価実験 (Blocking抗体添加実験)

### 3. HCV 感染防御に関わる NK 細胞機能分子の探索

分化誘導細胞のNK細胞フェノタイプマーカーおよび機能分子マーカーの表出についてフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、NK細胞活性化分子であるNKp30、NKp44、NKp46や抗腫瘍活性に関与するNKG2D、TRAIL、CD226の表出を認めた。とくにNKp46、NKG2D、CD226の高発現はHCVレプリコンアッセイにおける抑制率も高く(図4) HCV抑制に寄与する

因子であることが示唆された。一方で、CD56の表出を伴わない非NK細胞群は、図1、2に示す通り、抗HCV抑制能を有せず、むしろ感染を助長する可能性のある細胞群であった。これらは、FCM解析の結果、CD11b、CD11c陽性の骨髄系樹状細胞やマクロファージに分化した細胞群であった。

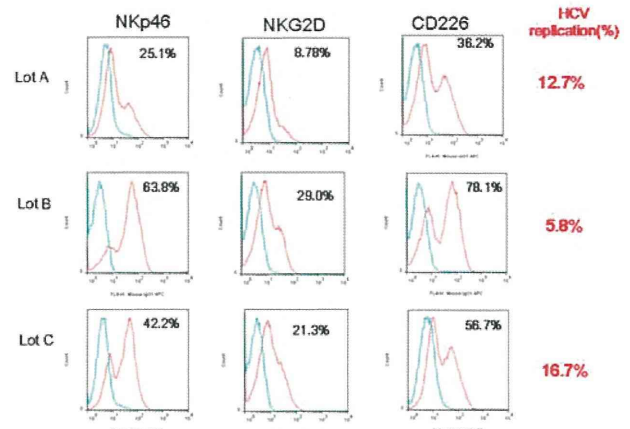


図4. NK活性化分子はHCV replication抑制に関与する

### 4. iPS 誘導性 NK 細胞の誘導効率の検討

24日の培養期間で、iPS細胞からCD34<sup>+</sup>細胞への誘導効率は約40倍であった。その後は、磁気ソーティングでCD34<sup>+</sup>細胞を純化し、CD34<sup>+</sup>細胞からNK細胞への誘導法でさらに28日間分化を行った。現在CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>のNK細胞への分化誘導は成功したが、回収細胞数に乏しく、培養日数も長期にわたるためさらなる改善の余地が必要と思われた。

### 5. 末梢血 CD34<sup>+</sup>細胞からの NK 細胞誘導

同意を得られた健常人ボランティアの末梢血から単核球を採取し、磁気ソーティング法でCD34<sup>+</sup>細胞を分離し、NK細胞リモデリングを行った。培養28日後のNK細胞のフェノタイプにおいてHCV効果に関与すると思われるNKp46、NKG2D、CD226の表出が骨髄由来CD34<sup>+</sup>細胞に比べ高い傾向にあった。

### D. 考察

活性化NK細胞はIFN- $\gamma$ 産生能が強く、高い抗HCV効果を発揮する。リモデリングNK細胞

においても IFN- $\gamma$  は HCV 複製能を抑制する重要なサイトカインであることが分かった。一方で、TNF- $\alpha$  は HCV 複製能に与える影響は認めなかった。最近、TNF- $\alpha$  は HCV のエントリーを促す働きがあるとの報告がある。さらに、TNF- $\alpha$  はマクロファージや樹状細胞が産生することは知られている。我々の CD34<sup>+</sup>血液幹細胞由来の誘導細胞において非 NK 細胞分画は、CD11b、CD11c 陽性の骨髄系樹状細胞やマクロファージに分化した細胞群であり、これらの細胞はヒト肝キメラマウスを用いた HCV ウイルス感染抑制実験において感染を助長する結果を認め、*in vitro*での HCV レプリコン解析で HCV 増幅能の抑制効果を認めなかった。我々が今回使用した *in vitro* 解析は HCV レプリコン含有肝細胞を用いた評価システムであり、そのために抗 TNF- $\alpha$  抗体の効果を確かめできなかった可能性がある。今後は HCV のエントリーを模倣した *in vitro* 解析系による TNF- $\alpha$  の関与と、リモデリング NK 細胞との併用による HCV 制御の相乗効果について検討する予定である。

また、末梢血 CD34<sup>+</sup>細胞の存在比率は非常に乏しい(約0.05~0.2%程度)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、アフエレーシス法による末梢血中 CD34<sup>+</sup>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。

## E. 結論

iPS 細胞および CD34<sup>+</sup>細胞から抗 HCV 効果を有する活性化NK細胞の分化誘導法の改良を検討した。抗 HCV 効果を効率よく発揮するためには、NK細胞の高純度を維持すること、NKp46、NKG2D、CD226の高表出および高い IFN- $\gamma$  産生能の誘導が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kobayashi T, Ishiyama K, Ohdan H. Prevention of recurrence after curative treatment for hepatocellular carcinoma. *Surg Today*. 43:1347-1354. 2013.
2. Ohdan H. Is living donor liver transplantation really equivalent to deceased donor liver transplantation? *Transpl Int*. 26:778-779. 2013.
3. 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.
4. 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.
5. Teraoka Y, Ide K, Morimoto H, Tahara H, Ohdan H. Expression of Recipient CD47 on Rat Insulinoma Cell Xenografts Prevents Macrophage-Mediated Rejection through SIRPalpha Inhibitory Signaling in Mice. *PLoS One*. 8:e58359. 2013.
6. 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