

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 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 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 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 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 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 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 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 との相互作用が抑制的に作用している可能性が

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 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 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 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 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 の発現についても同様の解析を試みた。さらに、SIRP 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 の相互作用の阻害が、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 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 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 と F4/80 の免疫染色像に高い類似性を認められたが、SIRP 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 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 の高発現を認められたが、CD31、CD107a 陽性の類洞内皮細胞での SIRP 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 結合を解除する抗 SIRP 抗体が促進するかについて評価した。その結果、CD47-SIRP 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 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 分子の表出も認められた。SIRP 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 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 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 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 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て 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 の発現量に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 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 の相互作用を阻害する抗 SIRP 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 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- 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 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 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 の結合を阻害する抗 SIRP 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 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 を発現しており、CD47-SIRP 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 α 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 α 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 SIRPA 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 α) 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 α 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 α 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