

201423010A

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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 27 (2015) 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 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 27 (2015) 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	1
--	---

II. 分担研究報告

1. 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	9
2. HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた IFN 投与後の免疫応答の解析 今村 道雄	17
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	19
4. NK 細胞による HCV 蛋白質発現ヒト不死化肝細胞の認識機構の解析 加藤 宣之・團迫 浩方	23
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	29
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	32

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	45
-----------------	----

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 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開始する。

研究分担者

今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 診療講師
田原 栄俊 広島大学大学院 細胞分子生物学講座 教授
田中 友加 広島大学大学院 消化器・移植外科学講座 准教授
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 臨床 FACS コアラボラトリー 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

肝臓内 natural killer (NK) 細胞は、IL-2 存在下で賦活化することで、C型肝炎ウイルス(HCV)によるCD81介在性の免疫回避機構に抵抗性を示し、強い抗HCV効果を示すことを我々は報告した。また、TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) 誘導性の抗腫瘍効果も合わせ持つことを確認したが、これらの機能を有するNK細胞は肝内在の未分化なものに限られる。そこで、多機能造血幹細胞や iPS細胞から未分化NK細胞を分化し、抗HCV効果を誘導する方法を確立する。臨床では、肝移植後の肝癌再発・HCV再発抑制を目的とした肝由来NK細胞療法を広島大学と米国マイアミ大学で施行中であり、臨床成績を途中

解析した。

C型慢性肝炎患者に対するインターフェロン (IFN) 治療効果には、宿主の免疫応答が関与するが、その詳細は明らかでない。HCV感染ヒト肝細胞キメラモデルマウスを用いて、C型肝炎におけるInterferon(IFN)投与後の免疫応答を解析し、その治療効果を向上させる新規治療法を模索した。

HCV持続感染には、HCV感染に伴う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SIRPα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への関与を解析する目的で、マクロファージによる肝細胞の貪食の有無及び貪食制御にCD47-SIRP α 系が関与するかについて検討した。また、肝臓に特徴的な抗原提示細胞である類洞内皮細胞のHCV特異タンパク質取り込み機能に関して解析し、類洞内皮細胞がHCV抗原に対する宿主免疫を抑制している可能性を検討した。

B. 研究方法

1. CD34⁺血液幹細胞から誘導したNK細胞の培養段階における代謝産物の解析 (大段・田中)

CD34⁺血液幹細胞からNK細胞への誘導培養上清中の代謝産物をメタボローム解析で評価し、NK細胞の効率的な分化誘導に必要な物質の検討を行った。

2. CD34⁺血液幹細胞から誘導したNK細胞の抗HCV効果の解析 (大段・田中)

Huh7.5細胞とJFH-1を用いたHCV entry assayにより誘導NK細胞と非NK細胞のHCV感染に与える影響を解析した。

3. 誘導NK細胞の抗腫瘍効果の解析 (大段・田中)

誘導NK細胞の肝癌細胞株 (HepG2, Huh7) に対する抗腫瘍活性を、⁵¹Crリリースアッセイを用いて評価した。さらに、抗腫瘍活性と関連する機能分子を検索した。

4. iPS誘導性NK細胞の誘導効率の検討 (大段・田中)

ヒト線維芽細胞由来のiPS細胞株から分化誘導したNK細胞の機能分子およびサイトカイン産生能を解析した。

5. 日本および米国でのNK細胞移入療法による抗肝癌/HCV効果解析 (大段・田中)

広島大学および米国マイアミ大学で施行中の肝癌症例 (Stage II以上) に対する肝移植患者への肝由来NK細胞を用いた制癌免疫療法の第I相臨床試験の結果を解析した。

6. 感染症におけるFc γ Receptor 一塩基遺伝子多型 (SNP) の関与とNK細胞療法による自然免疫代償効果の解析 (大段・田中)

好中球やマクロファージに表出するFc γ receptor (Fc γ R) IIaとNK細胞に表出するFc γ RIIIaのSNPが、肝移植後の感染症の発症と関連するか否かを解析し、NK細胞療法が、感染症発症を予防しうるか否についても解析した。

7. ヒト肝細胞キメラマウスを用いたIFNによる免疫応答の解析 (今村)

HCVを感染させたヒト肝細胞移植マウスにヒト末梢血単核球を移入後、1000 IU/gのIFN- α を投与し、血中HCV RNA量、ヒトアルブミン値、およびマウス肝内のヒトリンパ球の表現型を解析した。

8. 肝臓内抗原提示細胞によるHCV抗原提示機能の解明 (的崎、尾上)

マクロファージによる肝細胞の貪食の有無及び貪食制御にCD47-SIRP α 系が関与するかについて検討した。さらにHCV抗原タンパクに対する特異的免疫反応マウスモデルを確立し、HCVタンパクを取り込んだ類洞内皮細胞のもつHCVタンパク抗原特異的反応抑制能を検討した。

9. NK細胞によるHCV蛋白質発現ヒト不死化肝細胞の認識機構の解析 (加藤)

NK細胞による新たな抗HCV機構を探索する目的で、ヒト不死化肝細胞においてHCVにより発現誘導する自然免疫応答関連遺伝子を解析した。

10. NK細胞を大量に分化誘導可能なiPS細胞株の樹立 (田原)

ドキシサイクリンによって発現誘導可能なレンチウイルスベクターを用いて山中4因子とSV40 large-T抗原をヒト正常線維芽細胞に導入し、新たなiPS細胞の樹立を試みた。

11. 肝臓移植後NK細胞療法におけるキメリズムの遷延と拒絶反応の関係 (渡辺)

生体肝移植患者10名の末梢血をHLA-Flow法を用いて、ドナー/レシピエントの末梢血キメリズムを解析し、肝移植後レシピエント末梢血中に存在するドナー由来細胞の頻度および拒絶反応との関係を調査した。

C. 研究結果

1. CD34⁺血液幹細胞由来の誘導NK細胞の培養段階における代謝産物の解析 (大段・田中)

CD34⁺細胞からCD56⁺NK細胞への分化誘導過程における培養上清中の代謝産物をメタボローム解析した結果、NK細胞への分化に伴う細胞増殖時に、グルコースと一部の必須アミノ酸 (Glu, Trp, Asp) が枯渇していることが判明した。NK細胞の分化誘導効率を高めるためには、これらの基質の補充が必要であることが明らかとなった。

2. CD34⁺血液幹細胞由来の誘導NK細胞の抗HCV効果解析 (大段・田中)

HCV entry assayでは、CD34⁺血液幹細胞由来の誘導細胞全体では感染抑制効果は認めなかったが、NK細胞と非NK細胞に分けて評価すると、NK細胞ではHuh7.5細胞のHCV-RNAが低下しておりHCV感染抑制能が確認された。

3. 誘導NK細胞の抗腫瘍効果の解析 (大段・田中)

CD34⁺血液幹細胞由来の誘導NK細胞には、肝癌腫瘍株 (HepG2, Huh7, Huh7.5, HCVレプリコン細胞) に対し、TRAILおよびパーフォリンを介した抗腫瘍効果が確認された。

4. iPS細胞由来の誘導性NK細胞の誘導効率の検討 (大段・田中)

iPS細胞からのCD34⁺細胞→CD56⁺細胞への2段階分化培養において、IFN- γ の産生能を有する誘導NK細胞にHCVの増幅抑制が確認できた。

5. 日本および米国でのNK細胞移入療法による抗肝癌/HCV効果解析 (大段・田中)

広島大学で実施した生体肝移植症例24例 (HCCミラノ基準内、Stage II以上) の肝移植患者に、術後3日目にドナー肝由来NK細胞をレシピエントに投与した。その結果、全例においてNK療法は、グレード3以上の投与関連有害事象を認めず安全に施行し得た。Case control studyでは、術後病理学的にミラノ基準外となる再発危険症例で、NK療法群の無再発生存率が有意に良好であった。さらに、NK細胞療法実施群では、IL-28B SNP TT群でTG/GG群に比べ有意に術後のHCV-RNA値が抑制されていることが確認され、レシピエントのIL-28B SNPの違いによってNK細胞療法の効果に違いがある可能性が示された。

米国マイアミ大学の症例は、Clinical Trials.gov #NCT01147380で、脳死肝移植18症例が登録された、脳死肝移植に対しても、NK細胞療法の安全性が確認された。

6. 感染症におけるFc γ Receptor SNPの関与とNK細胞療法による自然免疫代償効果の解析 (大段・田中)

Fc γ RIIa[131H/R]およびFc γ RIIIa[158F/V]のSNPをPCRで測定し、術後30日以内の血流感染および予後との関係を解析した結果、Fc γ RIIIa遺伝子 F-carrier群で高率であった(p=0.013)。Fc γ RIIaおよびIIIaのSNPを組み合わせ4群に分けると、短期予後の層別化が可能であった。F-carrier群において術後NK療法を施行した17症例は非施行群に比べ術後菌血症は低い傾向にあった。レシピエントのFc γ RのSNPは肝移植重症感染症予測因子となると考えられ、術前に遺伝子検索で予後不良群と判定した場合、NK療法を行うことで生体防御応答の遺伝的な脆弱性を補完し予後を改善する可能性が示唆された。

7. ヒト肝細胞キメラマウスを用いたIFNによる免疫応答の解析 (今村)

HCV感染マウスへIFN- α を投与することによりNKT細胞が活性化され、活性化したNKT細胞がIFN- γ を産生することにより抗ウイルス効果が増強されていることが示された。

8. 肝臓内抗原提示細胞によるHCV抗原提示機能の解明 (的崎・尾上)

in vitroでの貪食実験にて、肝細胞上CD81をオプソニン化した肝細胞のIFN- γ 刺激マクロファージによる貪食が確認された。さらに、この貪食は抗SIRP α 抗体によるCD47-SIRP α ブロックにより促進された。一方、オプソニン化がされていない肝細胞については、抗SIRP α 抗体による貪食の促進は認められなかった。また、SIRP α KOマウス由来マクロファージは、WTマウス由来マクロファージに比べてオプソニン化された肝細胞貪食において貪食促進が認められた。

NS5Aタンパクをアジュバントと共に免疫したマウスでは、NS5A抗原特異的T細胞反応増殖が惹起されることを認めた。さらにこのNS5A免疫マウスの抗原特異的T細胞反応増殖はNS5Aタンパクを門脈注入したマウスから分離した類洞内皮細胞との共培養により有意に抑制されることを見出した。また、類洞内皮細胞による免疫反応抑制下ではIFN- γ の分泌が有意に抑制され、IL-10の分泌が有意に促進されていることが明らかとなった。

9. NK細胞によるHCV蛋白質発現ヒト不死化肝細胞の認識機構の解析 (加藤)

NK細胞の活性化には、III型ではなくI型インターフェロンが重要であることが確認された。NK-92細胞はDNA損傷を受けたPH5CH8細胞に細胞障害性を示した。NK-92細胞はNS5Bタンパク質を発現するPH5CH8細胞に細胞障害性を示した。NS3-4Aタンパク質がNK細胞の活性化に対する抑制やDNA損傷に対して抑制する機能を持っている可能性が示唆される。

10. NK細胞を大量に分化誘導可能なiPS細胞株の樹立 (田原)

ドキシサイクリン添加でiPS細胞様コロニーの出現を認め、7クローンの樹立に成功した。

11. 肝臓移植後NK細胞療法におけるキメラリズムの遷延と拒絶反応の関係 (渡辺)

生体肝移植患者10名のうち、8名でキメラリズム解析が可能であった。NK細胞療法の有無に関わらず、全例で有意な頻度のドナー由来細胞が検出された。術後急性拒絶反応と診断された症例は、非拒絶例に比べキメラ率の低下を認めた。

D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスを用いたHCV感染実験では、非NK細胞由来のTNF α が感染を促進する可能性が示唆され、抗TNF α 中和抗体と細胞療法の併用による抗HCV療法の可能性を検討している。また、誘導NK細胞の分離純度を改善することで、抗HCV効果が改善可能であることも確認できた。

我々は、HCV関連肝癌の切除後再発とKIR/HLA遺伝子多型との関連を統計解析した結果、KIR/HLA適合条件で分化した潜在的機能活性が高いlicensed NK細胞の存在が肝癌再発率低下と有意に関連することを確認した。NK細胞療法対象群の選定を行う上で有益な情報であると考えられる。

国内および米国における肝癌再発予防を目的としたNK細胞療法の臨床試験においては、グレード3以上の関連有害事象を認めず、安全に施行可能であった。現在施行中の第I/II相試験の経過観察と解析を継続し、抗HCV効果の判定を行う予定である。また、HCV肝硬変患者に対する肝移植後の肝癌およびHCV再発予防を目的としたCD34⁺幹細胞から誘導したNK細胞移入療法の第I相試験を開始する。

抗HCV免疫応答のうち、自然免疫と獲得免疫の接点となる抗原提示機構において、オプソニン化されたマウス由来肝細胞がマウス骨髄由来マクロファージにより貪食されることが確認された。マクロファージによる肝細胞の貪食は、マクロファージ上のSIRP α の欠損及びCD47とSIRP α 結合を阻害する抗体によ

り促進されることが確認された。今後、クーパー細胞による正常肝細胞及びHCV感染細胞の貪食制御へのCD47-SIRP α 系の関与を解析すると共に、HCV感染肝細胞でのCD47の詳細な発現解析を行う予定である。

その他の抗原提示機構として、類洞内皮細胞がHCVタンパク抗原を取り込み、HCVタンパク反応性T細胞を特異的に抑制する能力を持つこと、さらにその抑制機構には、IL-10が関与していることが確認された。このことは、HCV感染状況下で類洞内皮細胞が免疫回避機構の一部を担い、HCV持続感染に寄与していることを示唆するものである。今後、類洞内皮細胞の免疫抑制能を減弱する可能性を探り、その分子機構を解析する必要がある。

E. 結論

造血幹細胞から誘導したNK細胞のHCV抑制能は、ウイルス増幅抑制能のみならず感染自体を抑制した。さらに、抗HCV効果のみならず、TRAIL、CD226、パーフォリン介在性の抗HCC効果を示した。また、NK細胞療法は、臨床肝移植後細胞移入療法として、安全に施行可能であり、癌再発抑制、HCV再感染抑制、感染症発症抑制とともに生存率の向上が認められた。

オプソニン化肝細胞のマクロファージによる貪食にCD47-SIRP α 系が関与する可能性が強く示唆され、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗SIRP α 抗体のHCV感染肝細胞排除への応用が期待された。

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

iPS 細胞および CD34⁺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 准教授

研究要旨 本研究では、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)細胞の分化誘導の効率を改善した。誘導 NK 細胞が抗 HCV 効果を発揮するために必要な添加因子の探索をメタボローム解析によって行った。また、誘導 NK 細胞の HCV 感染抑制機能を評価する解析系を確立した。臨床研究では、広島およびマイアミ大学で実施中の肝移植後の肝癌再発・HCV 再発抑制を目的としたドナー肝由来活性化 NK 細胞療法の効果を検査し、治療効果の期待できる適応基準を探索した。また、自然免疫に関わる Fc γ Receptor 遺伝子多型解析の結果、術後血流感染症の高危険となる遺伝因子を持つ症例において、NK 細胞療法は、感染制御および生存率の有意な向上を示し、免疫抑制下での自然免疫応答の強化による生体防御機構を代償する可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝臓内 Natural Killer(NK)細胞は、IL-2 存在下で賦活化することで、C型肝炎ウイルス(HCV)による CD81 介在性の免疫回避機構に抵抗性を示し、強い抗 HCV 効果を示すことを我々は報告した。また抗 HCV 効果に加え、TNF-related apoptosis inducing ligand(TRAIL)誘導性の抗腫瘍効果も合わせ持つことを確認した。しかし、これらの機能を有する NK 細胞は肝内在の未分化なものに限られ、末梢血由来の成熟 NK 細胞の抗 HCV・抗腫瘍効果誘導は弱い。そこで、多機能造血幹細胞や iPS 細胞から未分化 NK 細胞を分化し、抗 HCV 効果を誘導する方法を確立した。臨床では、肝移植後の肝癌再発・HCV 再発抑制を目的とした肝由来 NK 細胞療法を広島大学と米国マイアミ大学で施行中である。

本年度は、造血幹細胞由来の誘導 NK 細胞の臨床応用に向けた培養系の確立と、iPS 由来 NK 細胞の機能分子およびサイトカイン産生能の評価を実施した。また、臨床研究では、killer immunoglobulin-like receptor (KIR) 遺伝子多型と HCV 増幅抑制および制癌機構の関連についての解析を実施した。さらに、NK 細胞移入療法の安全性および抗肝癌・HCV 効果について解析を行った。

B. 研究方法

1. CD34⁺血液幹細胞から誘導した NK 細胞の培養段階における代謝産物の解析

CD34⁺血液幹細胞を X-VIVO medium (RONZA社) に Stem Cell Factor (SCF)、Flt-3、Interleukin (IL)-15、IL-7、ヒト AB 型血清を加え 28 日間培養後、NK 細胞の活性化を目的として IL-12 および IL-18 を培養第 25 日と 28 日に添加した。28 日間の培養期間における培養上清中の代謝産物をメタボローム解析 (HMT 社) で評価し、NK 細胞の効率的な分化誘導に必要な物質の検討を行った。

2. CD34⁺血液幹細胞から誘導した NK 細胞の抗 HCV 効果の解析

昨年度までの成果として、HCV の感染および増幅抑制効果に関与する NK 細胞の機能分子は、NKp46、NKG2D、CD226 であり、IFN- γ 産生が HCV 増幅抑制において主要なサイトカインであることを明らかにした。さらに、誘導した NK 細胞の純度は HCV 感染抑制に重要であり、培養の過程で NK 細胞以外に分化した細胞群は CD11b⁺/CD11c⁺ 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、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* の感染実験で明らかとなった。本年度は、その機構を解明するため HCV entry assay を実施した。従前の HCV レプリコン保有株を用いた解析系は、HCV 増幅抑制効果を評価するモデルであり、HCV entry assay は、標的肝細胞に HCV の感染を評価するものである。Huh7.5 細胞に JFH-1 を 6 時間共培養し、ウイルスが含まれた上清を除去し再度培養を継続すると、72 時間後に細胞内 HCV コアタンパク mRNA 発現を RT-PCR で評価することで感染の有無が評価可能である。この培養系にトランスウェル培養システムを用いて誘導 NK 細胞および非 NK 細胞が HCV 感染をいかに影響するか解析した。

3. 誘導NK細胞の抗腫瘍効果の解析

肝内在NK細胞は、末梢血などの他臓器由来のNK細胞に比べ、アポトーシス誘導分子の発現が高く、強い抗腫瘍活性が期待できる。造血幹細胞から誘導したNK細胞は、肝由来NK細胞と類似し、アポトーシス誘導分子の発現を確認できた。そこで、誘導NK細胞の肝癌細胞株 (HepG2, Huh 7) に対する抗腫瘍活性を、⁵¹Cr リリースアッセイを用いて評価した。さらに、抗腫瘍活性と関連する機能分子を検索した。

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⁺CD45⁺) に分化させた後、磁気ソーティング法で CD34⁺ 細胞を分離抽出し、さらに、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を用いてNK細胞の機能分子およびサイトカイン産生能を解析した。

5. 日本および米国でのNK細胞移入療法による抗肝癌/HCV効果解析

広島大学では、肝由来活性化NK細胞を用いた制癌免疫療法を、Stage II 以上の肝癌症例に対する肝移植患者へ臨床導入している。本NK細胞を用いた制癌免疫療法は、共同研究とし

て米国FDAの承認を得て、米国マイアミ大学で脳死肝移植症例を対象に第I相臨床試験を施行中である。さらに本研究を進展させ、IFN- γ 産生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移入療法も開始した。国内外におけるNK細胞療法の安全性と肝癌再発抑制効果およびHCV増幅抑制効果について検討した。

6. 感染症におけるFc γ Receptor 一塩基遺伝子多型 (SNP) の関与とNK細胞療法による自然免疫代償効果の解析

ヒトFc γ receptor (Fc γ R) のうちIIa分子は好中球やマクロファージといった貪食細胞上に表出し、細菌などをオプソニン化したCRPと結合する。このCRPとの結合力は、IIa遺伝子配列131番目にアルギニンのalleleを持つ個体がヒスチジンのhomoよりも強いことが報告されている。またFc γ RIIIa分子は、主にNK細胞上に表出し、抗体依存性細胞傷害に寄与している。Fc γ RIIIa は、遺伝子配列158番目にバリンのalleleを持つ方がフェニルアラニンを持つものよりもIgG1およびIgG3に対する結合力が高いことがわかっている。そこで、これらオプソニン化に関わるSNPが、肝移植後の感染症の発症と関連するか否かを解析した。また、NK細胞療法が、感染症発症を予防しうるか否についても解析を実施した。

(倫理面への配慮)

ヒト細胞の研究では、健常ボランティアおよび肝臓移植症例の末梢血リンパ球、肝灌流液中の細胞の提供を必要とした。採取にあたっては、いかなる過程においても人権及び利益の保護を尊重し十分配慮した。ヒトゲノム・遺伝子解析研究、臨床検体を用いた解析は、倫理指針に基づき必要な手続きを得た。

C. 研究結果

1. CD34⁺血液幹細胞由来の誘導NK細胞の培養段階における代謝産物の解析

CD34⁺細胞からCD56⁺NK細胞への分化誘導過程において、各培養日数における培養上清中の代謝産物を測定することで、分化誘導や細胞増殖に必要な培養条件を最適化することを目的とした。培養0, 7, 14, 22, 25, 28日における培養上清中の代謝産物をキャピラリー

電気泳動・飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) 法によるメタボローム解析 (HMT社) で評価した (図1)。その結果、解糖系 (TCA回路) およびアミノ酸代謝に経時的変化を認めた。とくに、TCA cycleは分化誘導に伴って増加しており、細胞代謝が著明に亢進する時期を同定できた。さらに、NK細胞への分化に伴う細胞増殖時に、グルコースが枯渇していることが明らかとなった。また、一部の必須アミノ酸 (Glu, Trp, Asp) も培養後期では、消費が亢進していた。以上からNK細胞の分化誘導効率を高めるためには、培養段階に応じたグルコース濃度調節、アミノ酸補充や灌流培養法の導入が必要であることが明らかとなった。

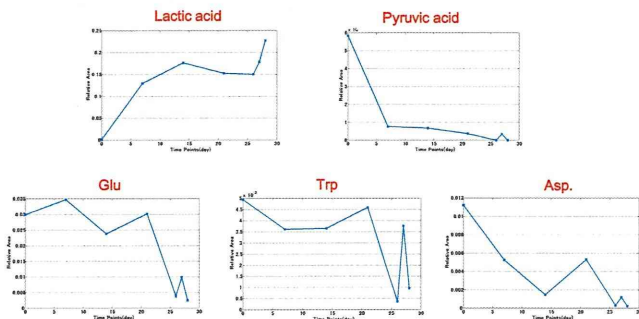


図1. メタボローム解析結果。骨髓由来CD34⁺造血幹細胞をサイトカイン存在下で28日間培養し未成熟NK細胞に分化誘導した。回収3日前と1日前にIFN- γ 産生能を目的にIL-12とIL-18を添加した。28日の培養で細胞数は約80-100倍に増え、50%程度のNK細胞を獲得することが可能である。培養上清の代謝産物を経時的に測定した。

2. CD34⁺血液幹細胞由来の誘導NK細胞の抗腫瘍効果および抗HCV効果解析

HCV entry assayは、肝細胞へのHCV感染率を、細胞内HCVコアタンパクmRNA発現で測定し、誘導NK細胞によるHCV感染抑制能を評価した (図2)。

トランスウェルの下層に非感染Huh7.5細胞株を上層に誘導NK細胞/非NK細胞を撒き、前培養したうえで、HCV (JFH-1)を培養系に添加し6時間培養した。その後、誘導細胞および培養液を除去し、virusを含まない培養液でさらに72時間培養後にHuh7.5細胞のmRNAを回収し、5'-UTRプライマーを用いて細胞内に存在するHCV-RNAをPCRで測定した。その結果、誘導細胞全体では感染抑制効果は認めなかったが、NK細胞と非NK細胞に分けて評価すると、NK細胞ではHuh7.5細胞のHCV-RNAが低下しておりHCV感染抑制能が

確認された。

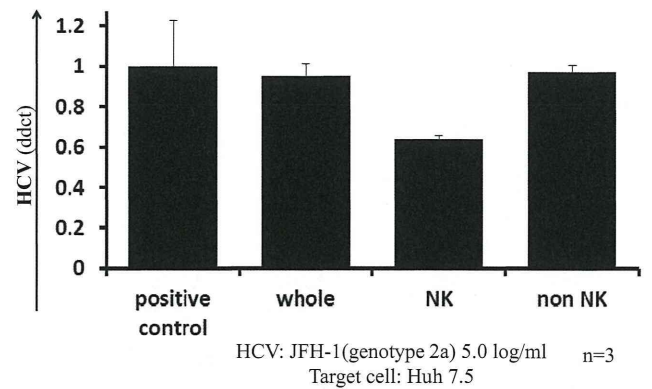


図2. HCV entry assayの結果。肝細胞へのHCV感染率を、細胞内HCVコアタンパクmRNA発現で測定し、誘導NK細胞によるHCV感染抑制能を評価した。

3. 誘導NK細胞の抗腫瘍効果の解析

CD34⁺血液幹細胞由来の誘導NK細胞は、肝活性化NK細胞と類似したフェノタイプを示した。そこで、肝癌腫瘍株 (HepG2, Huh7, Huh7.5, HCVレプリコン細胞) をtargetとし、誘導細胞 (effector) の細胞傷害性を⁵¹Crリリースアッセイで評価した (図3)。Effector : Targetを40:1、20:1、10:1、5:1、2.5:1の比率で4時間共培養した。その結果、いずれの細胞株に対しても濃度依存性に細胞傷害性を有した。次に、anti-human TRAIL抗体、コンカナマイシンA(CMA)を用いてTRAIL発現やパーフォリン活性をブロックすると、抗腫瘍効果の低下を認めた (図4)。

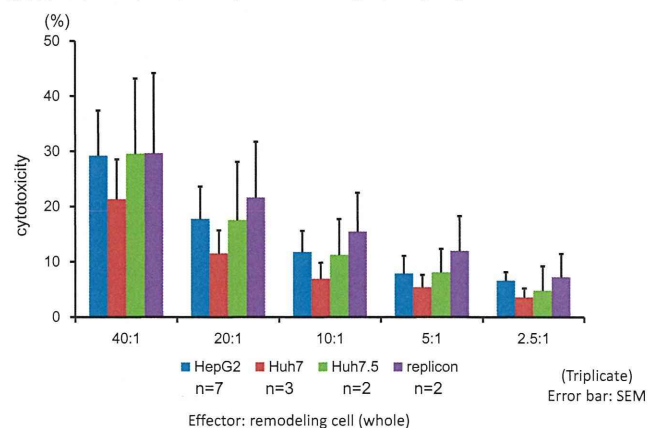


図3. CD34⁺血液幹細胞由来の誘導NK細胞の肝癌腫瘍株を標的とした細胞傷害活性、誘導NK細胞をeffector、肝癌腫瘍株 (HepG2、Huh7、Huh7.5、HCVレプリコン細胞) をtargetとし、細胞傷害性活性を測定した。

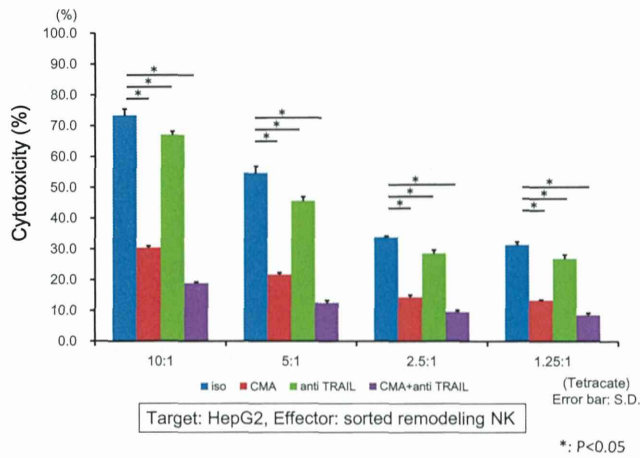


図4. CD34⁺血液幹細胞由来の誘導NK細胞の肝癌腫瘍株を標的とした細胞傷害活性の解析系に抗TRAIL抗体とCMAを添加し、TRAIL分子とパーフォリン/グランザイムの関与を検討した。

4. iPS細胞由来の誘導性NK細胞の誘導効率の検討

本年度は、iPS細胞からのCD34⁺細胞、さらにCD56⁺細胞への2段階分化培養において再現性の高い培養条件の確立を目指した。iPS細胞からCD34⁺細胞誘導後、磁気ソーティングで純度の高いCD34⁺細胞を回収し、さらにCD56⁺細胞への分化誘導を実施した。28日間培養による細胞の増殖率は平均30倍であり、CD45⁺CD56⁺CD3⁻細胞への分化誘導を示した。そこで、iPS由来の誘導細胞のNK細胞の機能分子の発現とサイトカイン産生能についてフローサイトメトリーで評価した(図5)。その結果、iPS細胞からの誘導NK細胞は、IFN- γ の産生能が高く、HCVの増幅抑制が確認できた。また、機能分子では、NKp46、CD16の表出が高く、NKG2D、TRAILの表出はCD34⁺細胞由来の誘導NK細胞に比べ弱い表出を示した。

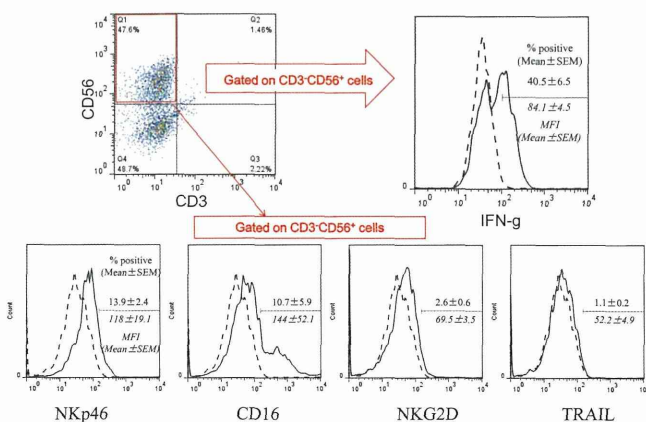


図5. iPS細胞由来の誘導性NK細胞のフェノタイプ。

5. 日本および米国でのNK細胞移入療法による抗肝癌/HCV効果解析

広島大学で実施した生体肝移植症例のうち、2006年1月から2013年12月までに24例のHCCミラノ基準内 (Stage II以上) の肝移植患者を本臨床試験に登録した。肝移植術後3日目にドナー肝由来NK細胞をレシピエントに投与した。Case control studyにおけるcontrolグループは、同時期のNK療法非施行ミラノ基準内HCC (Stage II以上) 肝移植患者 (25例) とした。本年度は、①投与後1カ月間の有害事象をCTCAE ver 4で評価、②肝移植後5年間の生存率・無再発生存率、③NK細胞療法の抗HCV効果を解析した。その結果、①全例においてNK療法は、グレード3以上の投与関連有害事象を認めず安全に施行し得た。また、270×10⁶個/個体以上の高用量投与群において良好な無再発生存率を示す傾向があり、複数回投与による相乗効果が期待された。②生存率では、2011年肝移植症例登録報告 (日本肝移植研究会) の5年生存率 69.6%に比べ、82.6%と良好な成績であった。また、Case control studyでは、術後病理学的にミラノ基準外となる再発危険症例で、NK療法群の無再発生存率が有意に良好であった (図6)。

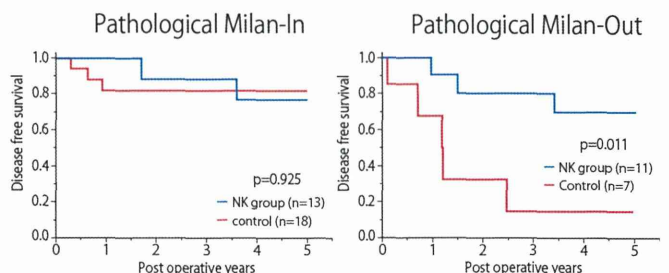
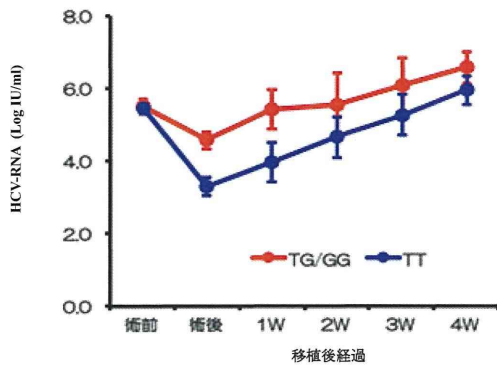


図6. ドナー肝活性化NK細胞療法の臨床研究の結果。生体肝移植の際、ドナーからグラフト肝臓を摘出した後、血液凝固を避けるため臓器灌流を行う。その排液中のリンパ球分画 (約50%がNK細胞) を回収しIL-2を添加して3日間培養する。この操作により、抗ウイルス活性に関連するNKp46とさらに抗腫瘍分子TRAILの発現が増強し、これを移植後3日目に点滴静注する。画像診断上ミラノ基準内のStage II以上HCC生体肝移植患者を対象にしたphase I/case control studyの結果を示す。無再発生存率を、病理診断によるミラノ基準内外にわけてNK療法の効果を比較すると、ミラノ基準外症例で、同条件の非投与コントロール群に比べ、無再発生存率が有意に改善した。

さらに、NK細胞療法の効果にIL-28B SNPが関与しているか否かを解析した。その結果、

非NK細胞療法群では、TT genotype群がTG/GG群にくらべ肝移植後の血清HCV-RNA値がやや低く推移するが有意差には至らなかったのに対し、NK細胞療法実施群では、TT群で有意に術後のHCV-RNA値が抑制されていることが確認された。とくに、TT genotype症例8例のうち、3例に術後ウイルスの継続した消失を認めたと、TG/GG群では消失症例は認めなかった。以上のことから、レシピエントのIL-28B SNPの違いによってNK細胞療法の効果に違いがある可能性が示唆された（図7）。

肝移植術後HCV-RNA値の経時推移(コントロール、TG/GG vs TT)



肝移植術後HCV-RNA値の経時推移(NK療法施行、TG/GG vs TT)

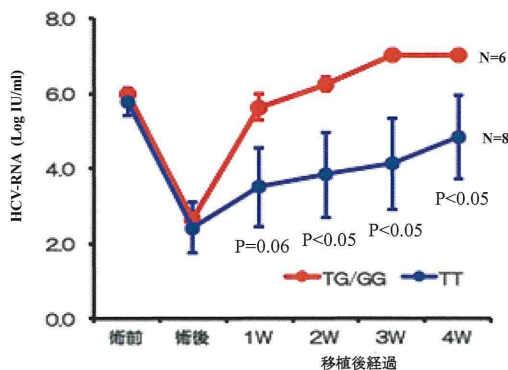


図7. NK細胞療法を受けたHCV感染感移植患者のうちIL-28 SNP/TT homozygotelはG carrierに比べ、HCV-RNA量が有意に抑制される事が確認され、genotypeによっては抗HCV効果も期待される事が確認できた。

米国マイアミ大学との共同研究では、Clinical Trials.gov #NCT01147380で、患者登録期間：2010/07-2013/04の脳死肝移植18症例が登録された。主要評価項目は安全性で、副次評価項目は生存率・無再発生存率である。その結果、脳死肝移植に対しても、NK細胞療法の安全性が確認された。ヒストリカルコントロールと比較して、生存率・累積再発率ともに良好であった。36か月観察において、癌無再発生存率は100%であった。

6. 感染症におけるFc γ Receptor SNPの関与とNK細胞療法による自然免疫代償効果の解析

生体防御機構に関わるFc γ receptor (Fc γ R)のSNPが術後菌血症の予測因子となるか検討した。また術後菌血症を来しやすい予後不良群において、NK療法が術後重症感染症である菌血症を抑制し、短期予後を改善するか検討した。解析は、肝臓移植術後1年以上経過した82症例の肝移植レシピエントを対象とした。Fc γ RIIa[131H/R] および Fc γ RIIIa[158F/V]のSNPをPCRで測定し、術後30日以内の感染症および予後との関係を解析した。また予後不良群であるFc γ RIIIa遺伝子F carrierの患者において、NK療法施行群と非施行群での短期生存の比較を行った。【結果】Fc γ RIIIa遺伝子に関しては、VV群(n=42)：F-carrier群(n=40)における菌血症の発症はそれぞれ9.8%：37.5%であり、F-carrier群で高率であった(p=0.013)。2年生存率もVV群83.2%に対してF-carrier群は70.0%と低い傾向にあった。Fc γ RIIaにおいても同様の傾向を認めた。さらにFc γ RIIaおよびIIIaのSNを組み合わせ、4群に分けると、短期予後の層別化が可能であった。F-carrier群において術後NK療法を施行した17症例は非施行群に比べ術後菌血症の発生率が低い傾向にあった。また同群における2年生存率は100%であり、非施行群の68.8%に比べ有意に生存率の向上をみとめた(p=0.014)。したがって、レシピエントのFc γ RのSNPは肝移植レシピエントの重症感染症（菌血症）予測因子となると考えられ、術前に遺伝子検索で予後不良群と判定した場合、NK療法を行うことで生体防御応答の遺伝的な脆弱性を補完し、肝移植術後の重症感染症を予防することで予後を改善する可能性が示唆された。

D. 考察

昨年の研究成果から、CD34⁺造血幹細胞から分化した非NK細胞は、HCVの細胞内侵入を助長する因子(TNF α)を産生することが判明した。本年度の研究では、ヒト肝細胞キメラマウスを用いたHCV感染実験でも非NK細胞由来のTNF α が感染を促進する可能性が示唆され、抗TNF α 中和抗体と細胞療法の併用

による抗HCV療法の可能性を検討している。また、誘導NK細胞の分離純度を改善することで、抗HCV効果が改善可能であることも確認できた。

我々は、HCV関連肝癌の切除後再発とKIR/HLA遺伝子多型との関連を統計解析した結果、KIR/HLA適合条件で分化した潜在的機能活性が高いlicensed NK細胞の存在が肝癌再発率低下と有意に関連することを確認した。NK細胞療法対象群の選定を行う上で有益な情報であると考え。今後は、HCV感染肝移植患者において、KIR/HLA遺伝子多型とHCV量の推移と肝炎進展との関連を解析し、licensed NK細胞の存在が肝炎再発といかに関わるかを解明する必要があると考える。

国内および米国における 肝癌再発予防を目的としたNK 細胞療法の臨床試験においては、グレード 3 以上の関連有害事象を認めず、安全に施行可能であった。また、NK 細胞の高用量投与群の無再発生存率が高く、複数回投与による相乗効果が示唆された。現在施行中の第I/II相試験の経過観察と解析を継続し、抗HCV効果の判定を行う予定である。また、本年度の研究成果を踏まえ、HCV肝硬変患者に対する肝移植後の肝癌およびHCV再発予防を目的としたCD34+幹細胞から誘導したNK細胞移入療法の第I相試験を開始する(第I相試験で10例)。

E. 結論

造血幹細胞から誘導したNK細胞のHCV抑制能は、ウイルス増幅抑制能のみならず感染自体を抑制し、IFN- γ が重要な抑制因子であることが確認された。さらに、抗HCV効果のみならず、TRAIL, CD226, パーフォリン介在性の抗HCC効果を示すことがわかった。また、NK細胞療法は、臨床肝移植後細胞移入療法として、安全に施行可能であり、癌再発抑制、HCV再感染抑制、感染症発症抑制とともに生存率の向上が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanimine N, Ohdan H. Impact of multiplicity of functional KIR-HLA compound genotypes on hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology*. 2015; 4(1):e983765.
2. Kuroda S, Tashiro H, Kimura Y, Hirata K, Tsutada M, Mikuriya Y, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. Rho-kinase inhibitor targeting liver prevents ischemic reperfusion injury in steatotic liver without major systemic adverse in rat. *Liver Transpl*. 2015; 21(1):123-131.
3. Mikuriya Y, Tashiro H, Kuroda S, Nambu J, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. Fatty liver creates a pro-metastatic microenvironment for hepatocellular carcinoma through activation of hepatic stellate cells. *Int J Cancer*. 2015; 136(4):E3-13.
4. Tanimine N, Tanaka Y, Kobayashi T, Tashiro H, Miki D, Imamura M, Aikata H, Tanaka J, Chayama K, Ohdan H. Quantitative effect of natural killer cell licensing on hepatocellular carcinoma recurrence after curative hepatectomy. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2(12):1142-1147.
5. Dang VT, Tanabe K, Tanaka Y, Tokumoto N, Misumi T, Saeki Y, Fujikuni N, Ohdan H. Fasting enhances TRAIL-mediated liver natural killer cell activity via HSP70 upregulation. *PLoS One*. 2014; 30;9(10):e110748.
6. Fudaba Y, Oshita A, Tashiro H, Ohdan H. Intrahepatic triglyceride measurement and estimation of viability in rat fatty livers by near-infrared spectroscopy. *Hepatol Res*. 2015; 45(4):470-479.
7. Shimizu S, Onoe T, Ishiyama K, Ide K, Ohira M, Tahara H, Saeki Y, Kobayashi T, Kuroda S, Tashiro H, Ohdan H. Multiple hepatic vein reconstruction using an all-in-one sleeve patch graft technique in living donor liver transplantation: a case report. *Transplant Proc*. 2014; 46(3):982-985.
8. Abe T, Onoe T, Tahara H, Tashiro H,

Ishiyama K, Ide K, Ohira M, Ohdan H. Risk factors for development of new-onset diabetes mellitus and progressive impairment of glucose metabolism after living-donor liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014; 46(3):865-869.

9. Morimoto H, Ide K, Tanaka Y, Ishiyama K, Ohira M, Tahara H, Teraoka Y, Yamashita M, Abe T, Hashimoto S, Hirata F, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Sakai H, Yano T, Tashiro H, Ohdan H. Bile CXC motif chemokine 10 levels correlate with anti-donor cytotoxic T cell responses after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014; 46(3):790-793.

10. Sakai H, Ishiyama K, Tanaka Y, Ide K, Ohira M, Tahara H, Abe T, Hirata F, Morimoto H, Hashimoto S, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Yano T, Kobayashi T, Tashiro H, Ohdan H. Potential benefit of mixed lymphocyte reaction assay-based immune monitoring after living donor liver transplantation for recipients with autoimmune hepatitis. *Transplant Proc.* 2014; 46(3):785-789.

11. Morimoto H, Ishiyama K, Ishifuro M, Ohira M, Ide K, Tanaka Y, Tahara H, Teraoka Y, Yamashita M, Abe T, Hashimoto S, Hirata F, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Sakai H, Yano T, Tashiro H, Ohdan H. Clinical efficacy of simultaneous splenectomy in liver transplant recipients with hepatitis C virus. *Transplant Proc.* 2014; 46(3):770-773.

2. 学会発表

1. 田中友加, 谷峰直樹, 大段秀樹. HLAミスマッチ肝移植後のT細胞応答とHCV複製抑制効果. 第23回日本組織適合性学会大会. 長崎. 2014.9.13-15.

2. 谷峰直樹, 田中友加, 小林剛, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 田代裕尊, 大段秀樹. KIR-HLA遺伝子型の肝細胞癌切除後再発予後に対する影響. 第23回日本組織適合性学会大会. 長崎. 2014.9.13-15.

3. Ohdan H. Impact of Fc-gamma receptor gene polymorphisms on susceptibility to infectious complication after liver transplantation. Japan Korea

Transplantation Forum 2014. Tokyo, Japan. 2014.9.12.

4. 谷峰直樹, 田中友加, 朴金連, 安部智之, 石山宏平, 井手健太郎, 小林剛, 大平真裕, 田原裕之, 清水誠一, 佐伯吉弘, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後HCV再感染における肝臓内NK細胞機能の解析. 第50回日本移植学会総会. 東京. 2014.9.10-12.

5. 田中友加, 清水誠一, 大段秀樹. リモデリングNK細胞によるHCV感染抑制および制癌効果. 第50回日本移植学会総会. 東京. 2014.9.10-12.

6. 大平真裕, 河岡友和, 矢野琢也, 谷峰直樹, 清水誠一, 石山宏平, 田中友加, 田代裕尊, 今村道夫, 茶山一彰, 大段秀樹. C型肝炎・肝細胞癌に対する肝移植症例の長期生存を目指した取り組み. 第50回日本移植学会総会. 東京. 2014.9.10-12.

7. Tanimine N, Tanaka Y, Ohdan H. Impact of natural killer cell licensing associated with KIR-HLA genotype on the recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy: Can the KIR-HLA genotype be a selection criterion for potential donors for liver transplantation with adoptive immunotherapy using NK cells extracted from liver allografts? World Transplant Congress 2014. San Francisco, USA. 2014.7.26-31.

8. Tanaka Y, Ohdan H. Influence of adoptive immunotherapy employing allograft liver-resident lymphocytes on alloimmune responses. World Transplant Congress 2014. 2014.7.26-31. San Francisco, USA.

9. Shimizu S, Tanaka Y, Tazawa H, Verma S, Ohdan H. Association of Fc-gamma receptor gene polymorphisms with susceptibility to bloodstream infections after liver transplantation. World Transplant Congress 2014. San Francisco, USA. 2014.7.26-31.

10. 大平真裕, 石山宏平, 田中友加, 堀田龍一, 清水誠一, 田代裕尊, 茶山一彰, Andreas Tzakis, 西田正剛, 大段秀樹. 肝臓移植後肝臓癌再発防止を目的とした肝臓由来ナチュラルキラー細胞療法の臨床成績. 第69回日本消化器外科学会総会. 郡山. 2014.7.16-18.

11. 田中友加, 石山宏平, 大平真裕, 清水誠一, 井手健太郎, 尾上隆司, 小林剛, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後活性化NK 細胞移入療法が T 細胞抗ドナー応答に与える影響解析. 第32回日本肝移植研究会. 東京. 2014.7.3-4.
12. 谷峰直樹, 田中友加, 小林剛, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 田代裕尊, 大段秀樹. NK 細胞License 機構の肝細胞癌切除後再発予後に対する影響. 第32回日本肝移植研究会. 東京. 2014.7.3-4.
13. 石山宏平, 大平真裕, 堀田龍一, 清水誠一, 谷峰直樹, 矢野琢也, 田中友加, 井手健太郎, 小林剛, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後肝癌再発に対する細胞免疫療法の臨床成績と今後の展開. 第50回日本肝癌研究会. 京都. 2014.6.6.
14. Tanimine N, Tanaka Y, Ishiyama K, Kobayashi T, Ide K, Ohira M, Tahara H, Tashiro H, Hideki Ohdan H. Risk factors of the hepatocellular carcinoma recurrence after living donor liver transplantation; a single center experience retrospective analysis. ILTS 2014. London, UK. 2014.6.4-7.
15. Shimizu S, Tanaka Y, Hotta R, Ohdan H. Generation of NK cells from hematopoietic stem cells in vitro for anti-HCV and anti-HCC immunotherapy: Evaluation using human hepatocyte chimeric mice. ILTS 2014. 2014.6.4-7. London, UK.
16. Ohira M, Ishiyama K, Nishida S, Tzakis AG, Ohdan H. Novel adjuvant immunotherapy using liver natural killer cells for preventing recurrence of hepatocellular carcinoma in liver transplantation. ILTS 2014. London, UK. 2014.6.4-7.
17. 大平真裕, 石山宏平, 堀田龍一, 田中友加, 清水誠一, 谷峰直樹, 矢野琢也, 井手健太郎, 田原裕之, 田代裕尊, 茶山一彰, Seigo Nishida, Andreas G Tzakis, 大段秀樹. 肝臓移植後肝臓癌再発防止を目的とした肝臓由来ナチュラルキラー細胞療法. 第50回日本肝臓学会総会. 東京. 2014.5.29-30.
18. 清水誠一, 田中友加, 田澤宏文, 石山宏平, 尾上隆司, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 小林剛, 田代裕尊, 大段秀樹. Fc γ receptor 遺伝子SNP による肝移植術後重症感染症の危険群階層化と新規予防法. 第114回日本外科学会総会. 京都. 2014.4.3-5.
19. 大平真裕, 石山宏平, 堀田龍一, 清水誠一, 井手健太郎, 小林剛, 田代裕尊, Tzakis Andreas, 西田正剛, 大段秀樹. 肝臓癌肝移植の適応拡大に向けて肝臓由来ナチュラルキラー細胞療法の臨床的意義. 第114回日本外科学会総会. 京都. 2014.4.3-5.
20. Ohdan H. Adjuvant immunotherapy using liver NK Cells enhances protective immunity against HCC recurrence and infectious complications in live rtransplantation. 第114回日本外科学会総会. 京都. 2014.4.3-5.
- 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

「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」
HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いたIFN投与後の免疫応答の解析

研究分担者 今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 診療講師

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）感染モデルマウスを用いて、C型慢性肝炎におけるインターフェロン（IFN）に対する宿主免疫反応について検討した。HCVを感染させたヒト肝細胞移植uPA-SCIDマウスにヒト末梢血単核球（PBMC）を腹腔内投与後、1000 IU/gのIFN- α を7日間連日筋注した。IFN- α 投与1週後の血中HCV RNAは、PBMCの投与を行わなかったIFN- α 単独群に比べ、PBMC+IFN- α 併用群において有意に低下した。IFN- α 投与後の血中IFN- γ 濃度を測定したところ、PBMC+IFN- α 併用群では、IFN- α 単独群に比べ、有意に高値であった。FACSによるマウス肝還流液中のヒトPBMCの解析により、NKT細胞がIFN- γ を産生していたことが判明した。抗IFN- γ 抗体処理によるIFN- γ の作用阻害により、PBMC+IFN- α 併用による抗HCV効果の増強は消失した。これらの結果から、IFN- α の投与により、NKT細胞が活性化され、IFN- γ を産生することにより抗ウイルス効果が増強されていることが示された。NKT細胞を活性化させる治療は、既存の抗ウイルス薬では治療困難な症例に対し、新規治療法となる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

C型慢性肝炎患者に対するインターフェロン（IFN）治療効果には、宿主の免疫応答が関与するが、その詳細は明らかでない。IFNに対する宿主免疫応答を解明することにより、その治療効果を向上する治療法の開発が期待される。一方、C型慢性肝炎に対しては、今後、直接阻害型抗ウイルス剤（DAA）が治療の中心となる。DAAは優れた抗ウイルス効果を有するが、耐性変異が問題となる。これら耐性株に対しては、IFNあるいはIFNを増強する治療が期待される。本研究は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染モデルマウスを用いて、C型肝炎におけるIFN投与後の免疫応答を解析し、その治療効果を向上させ

る新規治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

HCVを感染させたヒト肝細胞移植uPA-SCIDマウスに 2×10^7 個のヒト末梢血単核球（PBMC）を隔日で2回腹腔内投与後、1000 IU/gのIFN- α を7日間連日筋注した。PBMCを投与せずIFN- α を投与したIFN- α 単独投与群およびヒトPBMC+IFN- α 併用群において、IFN- α 投与1週後の血中HCV RNA減少量、ヒトアルブミン値、投与4日および7日後のIFN- γ 発現量を測定し、比較検討した。またマウス肝還流液中のヒトリンパ球の表現型をヒトCD45をマーカーとしたFACSにより解析した。

C. 研究結果

IFN- α の投与によりマウス血中HCV RNA量は低下した。IFN- α 投与1週後の血中HCV RNA低下量は、IFN- α 単独群 (n=6) では $1.3 \pm 0.5 \log \text{ copy/mL}$ であったが、ヒトPBMC+IFN- α 併用群 (n=6) では $3.1 \pm 1.2 \log \text{ copy/mL}$ と有意に高値であった (p<0.01)。いずれのマウスにおいても血中ヒトアルブミン値の変化は認められず、血中HCV RNA量の低下はマウス肝細胞障害によるものではなかった。血中IFN- γ 濃度は、IFN- α 単独投与群では4日後、7日後にそれぞれ感度以下、 $501 \pm 213 \text{ pg/mL}$ であったのに対し、ヒトPBMC+IFN- α 併用群ではそれぞれ $1,421 \pm 612$, $611 \pm 221 \text{ pg/mL}$ と有意に高値であった。マウス肝臓還流液中のヒトPBMCをFACSにて解析したところ、IFN- γ 産生細胞は、 $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ NKT細胞であった。抗IFN- γ 抗体をヒトPBMC投与前日に投与しIFN- γ の作用を阻害したところ、PBMC+IFN- α 併用による抗ウイルス効果の増強は消失した。これらの結果からNKT細胞が産生するIFN- γ が抗ウイルス効果に重要な役割を担っていると思われた。

D. 考察

HCV 感染マウスへ IFN- α を投与することによ

り、NKT 細胞が活性化され、活性化した NKT 細胞が IFN- γ を産生することにより抗ウイルス効果が増強されていることが示された。

E. 結論

NKT 細胞を活性化させる治療は、既存の抗ウイルス薬では治療困難な症例に対して新規の治療法となる得る可能性がある。

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