

C型肝炎ウイルスに対する新規自然免疫応答の解析

海老原 敬 [北海道大学大学院先端生命科学院瀬谷研究室／特任助教]

背景・目的

C型肝炎は高率に慢性化し、約4割が肝硬変へと進行し、最終的には肝細胞癌へと向かう進行性疾患である。臨床的知見からはC型肝炎が高率に慢性化する原因に不十分な免疫応答が示唆されている。今まではC型肝炎ウイルス(HCV:JFH1株)を*in vitro*で培養する技法が確立されていなかったため、HCVに対する自然免疫応答の詳細は明らかになっていなかった。本研究の目的は新しく培養が可能になったJFH1株を用いてHCVに対する自然免疫応答を解析することにある。

内容・方法

樹状細胞は、健康成人より採取した末梢血単核球(PBMC)よりCD14⁺細胞を分離し、GM-CSF/IL-4存在下で6日培養したものを未熟樹状細胞として使用した。HCVは肝細胞セルライン Huh7.5.1細胞にmoi=0.01で感染させ、9~10日後の培養上清を回収し、フィルター(0.45μM)にかけた後28000rpm、4時間遠心したものを使用した。ウイルスの力価は1×10⁶ ffu/ml程度であった。未熟樹状細胞へのHCV感染はmoi=1で感染させた。HCV感染アポトーシス細胞はHCVをHuh7.5.1細胞にmoi=1で感染させ、4日後にTNFαとシクロヘキシミドを添加し、5日後に回収した。Ailōの増殖反応にはPBMC、CD4⁺細胞CD8⁺細胞を使用し、³H uptake assayを行った。NK細胞の活性化はautoのNK細胞と刺激後の樹状細胞を共培養し、K562に対する細胞障害活性、IFNγ産性能を評価した。

結果・成果

JFH1株を単球由来樹状細胞に接種し、樹状細胞内で増幅するかどうか調べたところ、樹状細胞におけるHCVの増幅を検出することができず、IL-6やIFNβ等のサイトカイン応答や樹状細胞の成熟化もおさなかつた。そこで我々はHCVを感染させたHuh7.5.1にアポトーシスを誘導し、そのアポトーシス細胞を単球由来樹状細胞に貪食させたところ、HCV感染アポトーシス細胞依存的にサイトカイン応答(IL-6、IFNβ、IL-12p40)、樹状細胞の成熟化(CD86の上昇)が起こった。

HCV感染アポトーシス細胞により活性化した樹状細胞は、Ailōの末梢血単核球、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞の増殖反応を増強し、CD4⁺T細胞をTh1優位に傾けた。また、この樹状細胞とautoのNK細胞を共培養することによりNK細胞障害活性は増強されたが、NK細胞のIFNγ産性能はほとんど変わらなかった。樹状細胞とNK細胞

をtranswellで分離培養したところ、NK細胞障害活性はほとんど消失した。したがって、樹状細胞とNK細胞の直接結合がNK細胞活性化に必須であることが明らかになった。NK活性化リガンドであるNKG2Dリガンドが樹状細胞に発現していることが既に明らかになっている。そこで、樹状細胞とNK細胞の相互作用を抗NKG2D抗体で阻害をかけたところ、部分的にNK細胞障害活性が低下した。しかし、NK細胞活性を制御するための樹状細胞上の膜分子についてはNKG2Dの他にdominantな分子が存在することが想定された。

さらにHCV感染アポトーシス細胞により樹状細胞が活性化する機序を解析した。HCVは+鎖のRNAウイルスであり、その増幅過程でdsRNAが産生されることが予想された。実際に、抗dsRNA抗体を用いたFACSや免疫染色にてHCV感染Huh7.5.1アポトーシス細胞中にdsRNAを検出することができた。免疫染色やFACSにより、樹状細胞はdsRNAを内在するアポトーシス小胞中に取り込んでおり、そのdsRNAはTLR3と部分的に共局在することが明らかになった。また、樹状細胞のTLR3をsiRNAでノックダウンすることにより、HCV感染アポトーシス細胞刺激により樹状細胞から誘導されるIL-6の産生が低下した。さらにHCV感染アポトーシス細胞の貪食をメチルβシクロデキストリン(カベオリン経路阻害剤)やクロロプロマジン(クラスリン経路阻害剤)にて貪食を阻害したところ、樹状細胞の成熟化はメチルβシクロデキストリンでのみ阻害がかかった。

以上からdsRNAを内在するHCV感染アポトーシス細胞をカベオリン経路で取り込まれ、TLR3シグナルにより樹状細胞の成熟化誘導され、そのことによりTh1優位のT細胞応答やNK細胞の活性化が惹起されることがあきらかになった。

今後の展望

我々の*in vitro*のデータよれば、直接HCVが樹状細胞を活性化せず、HCV感染アポトーシス細胞を介して間接的に樹状細胞が活性化することが明らかになった。したがって、慢性HCV肝炎の患者に対して、1)感染細胞にアポトーシスを誘導させること 2)そのアポトーシス細胞を樹状細胞に貪食させることに成功すればHCV eradicationへと誘導できる可能性がある。したがって、HCV感染細胞のアポトーシスを誘導できるようなターゲット膜分子を探索することとともにHCV感染アポトーシス細胞上のeat meシグナルにより樹状細胞の貪食を促進させることが次の課題となる。