

# 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。今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<sup>+</sup>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  $1 \times 10^6$  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 TNF $\alpha$  とシクロヘキシミドを添加し、5日後に回収した。Allo の増殖反応には PBMC、CD4<sup>+</sup>細胞 CD8<sup>+</sup>細胞を使用し、<sup>3</sup>H 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、IFN $\gamma$ 産生性能を評価した。

## 結果・成果

JFH1株を单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 IFN $\beta$ 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单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, IFN $\beta$ , 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、Allo の末梢血単核球、CD4<sup>+</sup>細胞、CD8<sup>+</sup>細胞の増殖反応を増強し、CD4<sup>+</sup>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IFN $\gamma$ 産生性能はほとんど変わらなかつた。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 NKG 2D 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 ウィルスであり、その増幅過程で dsRNA が產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 FASC により、樹状細胞は dsRNA を内在するアポトーシス小胞中を取り込んでおり、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 の產生が低下した。さらに HCV 感染アポトーシス細胞の貪食をメチル β シクロデクストリン(カベオリン経路阻害剤)やクロルプロマジン(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 シクロデク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 優位の丁細胞応答や 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。