

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08498

研究課題名(和文) ナチュラルキラー細胞による肝炎ウイルス感染認識機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of natural killer cell-mediated recognition against hepatitis virus infection.

研究代表者

團迫 浩方 (Dansako, Hiromichi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80379841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、全てのHCV蛋白質を発現するヒト不死化肝PH5CH8細胞やHCV感染ヒト肝がんRSc細胞において、NKG2DリガンドであるULBP1の細胞表面発現が有為に亢進していることを明らかにした。NK細胞株NK-92細胞とHCV感染RSc細胞の共培養は細胞障害活性とインターフェロン(IFN)- $\gamma$ の産生を誘導し、HCV複製を抑制した。NK-92細胞はHCV感染RSc細胞から放出されたウイルス由来dsRNAの刺激により、IFN- $\gamma$ を産生誘導しているものと考えられる。これらの結果から、ULBP1はHCV感染肝細胞において、NK細胞が誘導する自然免疫応答の標的分子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： In the present study, we demonstrated that hepatitis C virus (HCV) induced the cell surface expression of ULBP1 in human immortalized hepatocyte PH5CH8 cells and human hepatoma HuH-7 cell-derived RSc cells. Interestingly, NK cell line NK-92 induced cytotoxicity and interferon (IFN)- $\gamma$  mRNA expression and subsequently reduced the levels of HCV RNA replication during the co-culture with HCV-infected RSc cells. We also suggested that NK-92 cells were stimulated by viral dsRNA released from HCV-infected RSc cells and subsequently induced IFN- $\gamma$ . From these results, we conclude that ULBP1 is a target of the NK cell-mediated innate immune response in HCV-infected human hepatocytes.

研究分野：ウイルス学

キーワード：肝炎ウイルス ナチュラルキラー細胞 自然免疫応答 細胞障害性 NKG2Dリガンド NKG2D受容体 ULBP1 ヒト不死化肝細胞

## 1. 研究開始当初の背景

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、その約75%がC型肝炎ウイルス(HCV)、約20%がB型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染に起因している。現在、我が国のHCV感染者は150~200万人と推定され、そのうち約70%が慢性肝炎とされる。また、100~130万人がHBVに持続感染しているものと推定される。これら肝炎ウイルスの肝臓内での持続感染により、慢性的に炎症を起こしている状態が慢性肝炎であり、慢性肝炎や、それから発症した肝硬変において、高確率に肝がんを発症する。また、HCVやHBVが重複感染している症例もあり、それぞれの単独感染時に比べ、肝硬変や肝がんの発症が早いと言われている。しかし、肝炎ウイルスが肝臓内に存在しているだけでは炎症は起きず、宿主が肝炎ウイルスを『非自己』として認識し、宿主内のナチュラルキラー(NK)細胞などのリンパ球が肝炎ウイルスを排除しようとして過剰に自然免疫応答や細胞障害を示すために炎症が起きると考えられている。肝がんを予防するためには、これらの肝炎ウイルスを肝臓内から排除し、持続的な細胞障害すなわち慢性肝炎から脱することが重要である。HCV感染患者に対する治療において、従来のPEG-インターフェロン(IFN)とリバピリンに、テラプレビル(HCVのNS3/4Aプロテアーゼを標的とする阻害剤)を追加した三剤併用療法が2011年に開始され、著効率が70%程度まで改善された。最近、シメプレビル(テラプレビルと同様にNS3/4Aプロテアーゼを標的とする阻害剤)などが新たに認可され、著効率はさらに改善されたが、薬剤耐性変異を持つHCVが出現する問題が生じている。一方、HBV感染患者に対する治療において、IFNあるいは核酸アナログ製剤が用いられているが、HBVゲノムの一部が宿主ゲノムに組込まれるため、完全排除は期待できない。NK細胞が肝炎ウイルス感染肝細胞を

認識し、自然免疫応答や細胞障害を示す機構を明らかにすることは、慢性肝炎の発症を抑えるための方策を考える上でも非常に重要である。

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り、標的細胞(ウイルス感染細胞やがん細胞)を認識し、アポトーシスや細胞障害を誘導する。NK細胞は標的細胞を認識する受容体(NKG2D)を持ち、標的細胞上のMICやULBPなどの複数のNKG2Dリガンドの量的な変化を認識することにより、『自己』である正常細胞と『非自己』であるウイルス感染細胞などを識別する。また、ウイルス感染細胞から遊離したIFN- $\alpha/\beta$ がNK細胞の活性化に必須であり、活性化されたNK細胞がIFN- $\gamma$ などのサイトカインを産生し、標的細胞への細胞障害などの炎症反応に関与している。

HCVが肝細胞に感染すると、細胞表面あるいはエンドソーム上で発現しているTLR3により認識され、IFN- $\beta$ やIFN誘導遺伝子群(IFN-stimulated genes: ISGs)の発現が誘導される。以前、研究代表者はクラスAスカベンジャー受容体(MSR1)がHCVの複製中間体である二本鎖RNAを細胞表面からエンドソーム上のTLR3に運搬し、TLR3経路を活性化していることを見出した。また、HCV感染肝細胞から近傍の非感染肝細胞にTLR3経路を活性化するシグナルが伝わり、非感染肝細胞からIFN- $\beta$ やISGsの発現が誘導されていることも明らかにした。しかし、HCV感染時に非感染肝細胞から産生したIFN- $\beta$ がNK細胞を活性化する機構や活性化されたNK細胞がHCV感染肝細胞を認識する機構については明らかではない。一方、HBVは良い感染増殖系がないことから、これらの研究はあまり進んでいない。HCVやHBVは持続感染することから、これらの肝炎ウイルスは活性化されたNK細胞による標的細胞からの排除に対抗する手段を持っているものと推測され

るが、詳細な分子機構は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究は、(1)NK細胞による肝炎ウイルス感染肝細胞の認識機構、(2)NK細胞が肝炎ウイルスを排除する機構、及び(3)肝炎ウイルスが持続感染するためのNK細胞に対する抑制機構を明らかにし、肝炎ウイルス感染に対するNK細胞の自然免疫応答の全体像を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)NK細胞による肝炎ウイルス感染肝細胞の認識機構

NK細胞は、正常細胞と標的細胞(ウイルス感染細胞やがん細胞)の細胞表面の複数のNKG2Dリガンドの質的あるいは量的な違いを識別して、標的細胞を『非自己』として認識している。HCVやHBV感染による肝細胞のNKG2Dリガンドの発現変動をcDNAマイクロアレイ解析により比較し、共通して変動するNKG2Dリガンドを探索する。このNKG2Dリガンドは、慢性肝炎の発症を抑制するための標的宿主因子となると期待される。

### (2)NK細胞が肝炎ウイルスを排除する機構

(1)で見出したNKG2Dリガンドを介して、NK細胞がHCVやHBVが感染した肝細胞を認識し、IFN- $\gamma$ などの産生や細胞障害性を示すかどうか検討する。また、NK細胞由来のエクソソームが、HCVやHBVの持続感染の阻止に関わる分子(miRNAや抗ウイルス蛋白質)を標的細胞に運搬するかどうかも検討する。

### (3)肝炎ウイルスが持続感染するためのNK細胞に対する抑制機構

HCVやHBVが持続感染するためには、NK細胞が肝炎ウイルス感染肝細胞を『非自己』として認識するのをウイルスが阻止してい

るものと推測される。(1)で同定されたNKG2DリガンドがNK細胞により認識されるのを阻止するためのHCVやHBVの役割を検討する。また、HCVやHBV感染肝細胞由来のエクソソームがNK細胞の活性化を抑制するかどうかも検討する。

## 4. 研究成果

最初に、NK細胞による肝炎ウイルス感染肝細胞の認識機構の解明を試みた。ヒト不活化肝PH5CH8細胞にHCVを感染させたところ、HCV感染レベルが低く、本研究での使用は難しいと考えられた。そこで、全てのHCV蛋白質を安定的に発現するPH5CH8細胞(PH5CH8 C-NS2&NS3-5B細胞)を作成した。PH5CH8 C-NS2&NS3-5B細胞をcDNAマイクロアレイ解析に供したところ、NK細胞の認識に関わるNKG2Dリガンドのうち、ULBP1 mRNAの発現が有為に亢進していることがわかった。同様に、細胞内及び細胞表面のULBP1のタンパク質発現レベルも有為に亢進していた。

次に、NK細胞株NK-92細胞がPH5CH8 C-NS2&NS3-5B細胞に対して細胞障害活性を示すか検討した。NK-92細胞はコントロール細胞(PH5CH8 Cont細胞)に比べて、PH5CH8 C-NS2&NS3-5B細胞に対する細胞障害活性を亢進していた。さらに、PH5CH8 C-NS2&NS3-5B細胞は組換えNKG2D受容体との結合能も亢進していた。これらの結果から、PH5CH8細胞でのHCVタンパク質の発現はULBP1の細胞表面発現を亢進し、細胞表面のULBP1とNKG2D受容体との結合を介して、NK細胞はHCVタンパク質が発現する肝細胞を認識しているものと考えられた。

次に、HCVに感染受容性を示すヒト肝がんRSc細胞でも同様の実験を試みた。興味深いことに、HCV感染RSc細胞においても、ULBP1 mRNAはもちろんのこと、ULBP1の細胞表面発現が亢進していた。また、NK-92

細胞による、HCV 感染 RSc 細胞に対する細胞障害活性は亢進しており、この亢進は抗 ULBP1 抗体により抑制されることが分かった。これらの結果により、HCV 感染 RSc 細胞の細胞表面の ULBP1 を NK 細胞が認識後、HCV 感染 RSc 細胞に細胞障害を与えていることが示唆された。

また、NK-92 細胞と HCV 感染 RSc 細胞の共培養は IFN- $\gamma$  の産生を誘導することが分かった。NK-92 細胞は、細胞傷害を受けた HCV 感染 RSc 細胞から放出されたウイルス複製中間体である二本鎖 RNA の刺激により IFN- $\gamma$  の産生誘導を起こしている可能性が示唆された。IFN- $\gamma$  の産生は最終的に、RSc 細胞での HCV 複製を抑制していた。

本研究により、HCV 感染が NKG2D リガンドの一つである ULBP1 の細胞表面発現を誘導し、NK 細胞は細胞表面の ULBP1 を介して HCV 感染細胞を認識していることが明らかにされた。NK 細胞は細胞傷害を受けた HCV 感染細胞由来のウイルス二本鎖 RNA により活性化され、IFN- $\gamma$  の産生誘導を起こし、HCV 複製をも抑制しているものと推測される。今後、NK 細胞由来のエクソソームによる HCV の持続感染の阻止に関わる分子の標的細胞への運搬、あるいは HCV 感染肝細胞由来のエクソソームによる NK 細胞の活性化の抑制について検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

H. Dansako, H. Imai, Y. Ueda, S. Satoh, T. Wakita, N. Kato: ULBP1 is induced by hepatitis C virus infection and is the target of the NK cell-mediated innate immune response in human hepatocytes. **FEBS Open Bio**, 査読有, 8,361-371,2018, DOI: 10.1002/2211-5463.12373.

〔学会発表〕(計2件)

團迫浩方、ヒト不死化肝細胞を用いたナチュラルキラー細胞による C 型肝炎ウイルス認識機構の解析、**第 31 回中国四国ウイルス研究会**、2016 年 7 月 9 日、鳥取大学 (鳥取県鳥取市)

H. Dansako、The mechanism of natural killer cell-mediated recognition against hepatitis C virus in human immortalized hepatocyte cells.、**第 64 回日本ウイルス学会学術集会**、2016 年 10 月 24 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/dmb/research-HCV.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

團迫 浩方 (DANSAKO, Hiromichi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80379841

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )