

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590765
 研究課題名（和文）樹状細胞を介した統合的免疫制御による C 型肝炎・肝癌治療法の開発
 研究課題名（英文）Developmental research on dendritic cell-based immunotherapy against chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma.
 研究代表者
 考藤 達哉（KANTO TATSUYA）
 大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授
 研究者番号：80372613

研究成果の概要（和文）：C型肝炎の病態には、樹状細胞（DC）の機能低下が関与している。本研究では、C型慢性肝炎患者のミエロイド DC（MDC）では TLR 刺激によるインターフェロン（IFN）の産生能が低下していること、それには TRIF、TRAF6 の発現低下が関与することを明らかにした。HCV NS3/4A 阻害剤によって、MDC の IFN 産生能や T 細胞刺激能も回復することから、MDC が抗 HCV の治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In hepatitis C virus (HCV) infection, it is well known that the impaired function of dendritic cells (DC) is critically involved in the development of liver disease as well as resistance to anti-viral therapy, such as a combination of peg-interferon- α and ribavirin. We demonstrated in this research project that myeloid DC (MDC) are functionally impaired in the production of type-I IFN and IL-12 in response to Toll-like receptor (TLR) signaling, of which is partly due to reduced expression of TRIF and TRAF6 adaptor molecules. In addition, the treatment of MDC with HCV NS3/4A protease inhibitor restored MDC of stimulatory capacity for CD4⁺ T cells. Therefore, we demonstrate that MDC could be served as a therapeutic target in order to enhance anti-HCV immune reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：樹状細胞、C型肝炎、Toll様受容体、インターフェロン α 、リバビリン、HCVプロテアーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

原発性肝癌の約8割はC型肝炎を基礎に発症する。C型肝炎ウイルス（HCV）は初感染時には無症候性に経過することが多く、約80%の症例では排除されずに持続感染が成立する。慢性肝炎へと移行すると、HCVが自然に排除される可能性は極めて低く、慢性肝炎、肝硬変、肝癌へ進展する。HCVによる肝発癌を抑制する新たな治療を開発するためには、HCVの持続感染阻止、慢性肝炎から肝硬変、肝癌への進展抑制、肝癌治療後の再発抑制、といった包括的な対策が必要となる。

HCV感染症は種々の免疫細胞の機能異常を来し、持続感染や肝細胞障害機序に関与する。また、生体は正常肝細胞から癌化した異型細胞を排除する免疫監視機構を保持している。C型肝炎患者における免疫細胞の機能低下は、免疫監視機構の破綻と発癌の増加に関与している可能性がある。従って初感染から肝癌へ至る経過を阻止するためには、HCVによる免疫抑制作用の分子機序を解明し、その制御方法を開発する必要がある。

2. 研究の目的

HCV感染症における免疫細胞、特に樹状細胞（DC）のウイルス感知系の機能異常の分子機序を明らかにし、DC機能制御のための分子標的を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

HCVによるToll様受容体（TLR）経路への干渉作用の解明

HCV感染において免疫系が発動するためには、ウイルスセンサー分子であるTLRがHCVを認識し、DCを活性化する必要がある。HCV感染者DCにおけるこれらのウイルス感知系の発現動態と機能的意義を明らかにする。またTLRシグナル関連分子群の遺伝子発現を網羅的に非感染者と比較し、HCVによるシグナル阻害の標的分子を同定する。

C型肝炎に対するペグIFN α /リバビリン（Rib）治療における免疫反応性の分子機序の解明

HCV持続感染やIFN治療抵抗性の機序として、DC機能低下以外にも、T細胞の分化・成熟障害や、制御性T細胞などの関与が想定されている。PegIFN α /Rib治療において、治療前後、経過

中の免疫細胞の頻度・機能と治療効果との関連性から、免疫反応性を評価できる細胞マーカーを同定する。更に抗ウイルス薬投与による免疫細胞での遺伝子発現変化を網羅的に解析し、患者個々の免疫反応性に寄与する標的分子を明らかにする。

4. 研究成果

C型肝炎患者のMDCでは、非感染者と比較してTLR2、TLR4、RIG-Iの発現は増加しているが、TLR3、MDA-5の発現には差を認めなかった。C型肝炎患者MDCでは、各TLRやRIG-Iに対するアゴニスト刺激によるIFN- β 、TNF- α 、IL-12などの産生は非感染者に比べ低下していた。TLR/RIG-I下流シグナルやアダプター分子の遺伝子発現を網羅的に解析すると、C型肝炎患者MDCではMAPK系とNF- κ B系の発現が低下しており、TRIF、TRAF6の発現が低下していた。C型肝炎患者MDCはHCV NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤の処理によって、TLR3刺激後のTRIF、TRAF6の発現が部分的に回復し、IFN- β 、TNF- α 産生能が亢進し、CD4+T細胞増殖刺激能が回復した。以上の結果より、HCV NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤は、そのHCV複製抑制作用のみならず、MDCにおけるTLR/RIG-I系の機能回復による免疫賦活作用も期待できることが明らかとなった。

難治性C型肝炎（HCVセロタイプ1型・高ウイルス量）患者に対するペグIFN α /Rib療法において、HCV排除（著効）に関する因子は、治療前MDC数、開始12週後のPDC頻度、治療終了時のDC機能（T細胞刺激能）であった。以上の結果は、抗HCV治療によるHCV排除にも、DC頻度・機能が関与していることを示している。

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17件）

① Inoue, Y., Hiramatsu, N, Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Hagiwara, H., Oshita, M., Mita, E., Fukui, H., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Hyashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Miyagi, T.,

Hohsui, A., Ishida, M., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T., and Hayashi, N. Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *Journal of Viral Hepatitis* 2009 (in press) 有

②Itose, I., Kanto, T. Kakita, N., Takebe, S., Inoue, M., Higashitani, K., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *Journal of Viral Hepatitis* 16: 846–852, 2009 有

③Kohga, K., Takehara, T. Tatsumi, T., Miyagi, T., Ishida, H., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N. Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 69: 8050–8057, 2009 有

④Hikita H, Takehara T., Shimizu, S., Kodama, T., Li, W., Miyagi, T., Hosui, A., Ishida, H., Ohkawa, K., Kanto, T., Hiramatsu, N., Yin, X. M., Hennighausen, L., Tatsumi, T. and Hayashi, N. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 16: 1217–1226, 2009 有

⑤Hiramatsu, N., Oze, T Yakushijin, T., Inoue, Y., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Kaneko, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Nagase, T., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N. Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin. *Journal of Viral Hepatitis* 16: 586–594, 2009 有

⑥Kurashige N., Ohkawa, K Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Hosui, A., Miyagi, T., Ishida, H., Tatsumi, T., Kanto, T., Takehara, T. and Hayashi, N., Two types of drug-resistant hepatitis B viral strains emerging alternately and

their susceptibility to combination therapy with entecavir and adefovir *Antiviral Therapy* 14: 873–877, 2009 有
⑦ Kanto T. Virus associated innate immunity in liver. *Frontiers in Bioscience* 13: 6183–6192, 2008 有

⑧Miyazaki M., Kanto T., Inoue, M., Itose, I., Miyatake, H., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Kakita, N., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virusinfection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I *Journal of Medical Virology* 80: 980–988, 2008 有

⑨Kohga K., Takehara T., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Miyagi, T., Hiramatsu, N., Kanto, T., Kasugai, T., Katayama, K., Kato, M. and Hayashi, N. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Science* 99: 1643–1649, 2008 有

⑩Toyama T., Hiramatsu N. Yakushijin, T., Oze, T., Nakanishi, F., Yasumaru, M., Mochizuki, K., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma including recurrent cases: a study of 861 patients in a single institution. *Journal of Clinical Gastroenterology* 42: 317–322, 2008 有

⑪Kurashige N., Hiramatsu N. Ohkawa, K., Oze, T., Inoue, Y., Kurokawa, M., Yakushijin, T., Igura, T., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Tamura, S., Kasahara, A., Oshita, M., Hijioka, T., Katayama, K., Yoshihara, H., Hayashi, E., Imai, Y., Kato, M. and Hayashi, N. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatology Research* 38: 450–456, 2008 有

⑫Miyatake H., Kanto T., Inoue, M., Sakakibara, M., Kaimori, A., Yakushijin, T., Itose, I., Miyazaki, M., Kuzushita, N., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T cell response in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 14: 404–412, 2007 有

⑬Itose I., Kanto T., Inoue, M., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Oze, T., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon- α 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *Journal of Medical Virology* 79: 511–521, 2007 有

⑭Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., Hayashi, N., Akira, S. and Matsuura, Y. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *Journal of Virology* 81: 8953–8966, 2007 有

⑮Kanto, T. and Hayashi, N. Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatology Research* 37 Suppl: 3S319–326, 2007 有

⑯Tani, H., Komoda, Y., Matsuo, E., Suzuki, K., Hamamoto, I., Yamashita, T., Moriishi, K., Fujiyama, K., Kanto, T., Hayashi, N., Owsianka, A., Patel, A. H., Whitt, M. A. and Matsuura, Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins *Journal of Virology* 81: 8601–8612, 2007 有

⑰Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Yamaguchi, S., Sakamori, R., Hiramatsu, N., Kanto, T., Ohkawa, K. and Hayashi, N. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities *Immunology* 120: 73–82, 2007 有

[学会発表] (計 13 件)

①Kanto T., et al. Dynamics of plasmacytoid dendritic cells as a predictor of relapse regardless of virological response in pegylated interferon- α and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course* 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

②Kakita N, Kanto T., et al. Feasibility of IL-10-producing regulatory Type 1 cells for the monitoring of viable

hepatocellular carcinoma through local ablation therapy. *The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course* 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

③Miyazaki M, Kanto T., et al. Myeloid dendritic cells as a therapeutic target for immune restoration by HCV NS3 protease inhibitor in chronic hepatitis C patients *The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course* 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

④ Higashitani K, Kanto T., et al. Therapeutic virological response restores impaired capacity of myeloid dendritic cells in chronic hepatitis B patients *The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course* 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

⑤Son C, Hiramatsu N., et al. Reduced drug doses in genotype 1 patients with chronic hepatitis C during treatment with pegylated interferon alfa-2B plus ribavirin delays the timing of HCV RNA negativity or prevents its attainment; A propensity score-matched study. *The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course* 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

⑥Inoue Y, Hiramatsu N., et al. Prediction of early response to pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C based on amino acid substitutions in the viral core region. *The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course* 10.30–11.3, 2009, Boston, MA, USA

⑦Itose I., Kanto T., et al. Dynamic changes of regulatory T cell subsets in patients with chronic HCV infection in relation to the degree of liver inflammation *The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)* Nov 2, 2008, San Francisco, CA, USA

⑧Takebe S., Kanto T., et al. IL-7 as a booster of Th2-differentiation by modulating myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection *The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)* Nov 2, 2008, San Francisco, CA, USA

⑨Kakita N., Kanto T., et al. Natural regulatory T cells as biomarker for the assessment of hepatocellular carcinoma in local ablation therapy *The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)* Nov 2, 2008, San Francisco, CA, USA

⑩Kanto T. Dendritic cell as a versatile

なし

controller of innate and adaptive immune response against hepatitis C virus **The 10th International Symposium on Dendritic Cells** Oct 1-5, 2008 Kobe, Japan

⑪ **Miyazaki M. Kanto T, et al.** Impaired TLR/RIG-I-mediated innate immunity in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C patients **The 10th International Symposium on Dendritic Cells** Oct 1-5, 2008, Kobe, Japan

⑫ **Sakakibara M., Kanto T, et al.** Novel mature dendritic cells inducible from monocytes with OK432, PGE1 and IFN- α serve as potent vaccine vehicles for gastrointestinal cancers **The 10th International Symposium on Dendritic Cells** Oct 1-5, 2008, Kobe, Japan

⑬ **Kanto T.** NK and NKT-dendritic cell interactions in HCV infection **Hepatic Inflammation and Immunity 2008** Jan 27, 2008, Galveston, Texas USA

[図書] (計1件)

Nalesnik MA, Kanto T Elsevier London **Natural killer cells and hepatitis C virus infection.** Lotze MT and Thompson AW eds **Natural killer cells: Basic science and clinical application.** 2010:571-587

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科

消化器内科学ホームページ:

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

考藤 達哉 (KANTO TATSUYA)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号: 80372613

(2) 研究分担者

竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 70335355

平松 直樹 (HIRAMATSU NAOKI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号: 30362700

(3) 連携研究者