

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590526

研究課題名（和文） 新規霊長類モデルを用いた急性慢性C型肝炎における自然免疫の意義に関する研究

研究課題名（英文） Study of the roles of innate immunity on acute and chronic hepatitis C by a novel non-human primate model

研究代表者

明里 宏文（AKARI HIROFUMI）

京都大学・霊長類研究所・教授

研究者番号：20294671

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、新規霊長類モデルを用いた急性慢性C型肝炎における自然免疫の意義に関して、我々が新規に開発した霊長類サロゲートモデルを用いて明らかにすることである。本研究の成果は以下の通りである。まず新世界ザルであるタマリンにおいてNK細胞の活性定量系を確立した。次にタマリンにおいて抗CD16（3G8）抗体によりNK細胞のin vivo depletionが可能かどうかについて検討した。その結果、50 mg/kgの容量で抗CD16（3G8）抗体を経静脈にて投与することにより、NK細胞の顕著な減少が明らかになった。また生体内におけるNK細胞数の減少に伴って、NK活性の低下が確認できた。興味深いことに、CD16陽性NK細胞がほぼ検出されない状態でも、血中NK活性は低いながらもある程度検出されることから、NK細胞はCD16陰性亜集団も存在することが示された。現在、CD16陽性NK細胞を一過性に除去したタマリンにC型肝炎ウイルスと同じヘパシウイルスに属するGBV-Bを接種し、血中ウイルス量の動態および抗ウイルス抗体誘導能を評価することにより感染急性期におけるNK細胞の役割を検討している。これらの結果を踏まえ、今後はNK細胞による肝炎ウイルスの持続感染制御への関与についてより詳細に解析を進めていきたい。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clarify the role of innate immunity during acute and chronic hepatitis C by a novel non-human primate model. First of all, we established a quantification system of NK cell activity of tamarins. We then found that the intravenous administration of an anti-CD16 monoclonal antibody 3G8 at a dose of 50mg/kg to tamarins successfully depleted CD16+ NK cells, which was consistent with the reduction of NK cell-mediated cytotoxicity. It is notable that lowered but detectable levels of NK activity were observed in the blood obtained from the CD16+ NK cell-depleted tamarins, indicating the presence of a minor CD16- NK subpopulation. By using these assay systems we established, analyses of the roles of the CD16+ NK cells on dynamics of the replication of GBV-B, which is closely related to hepatitis C virus and is classified in genus hepacivirus, and antiviral acquired immune responses in the virus-infected tamarins are now ongoing. On the basis of the results obtained, we would like to examine in detail regarding the roles of NK cells on the control of persistency of the hepatitis virus in near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：基礎医学・ウイルス学

キーワード：個体、C型肝炎、動物モデル、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (Hepatitis C Virus: HCV) とは C型肝炎を主徴とする慢性感染症の原因ウイルスである。現在国内における感染者は 200 万人とされている。C型肝炎患者においては、自然免疫担当細胞である DC 細胞や NK 細胞の機能的障害が認められ、このことが HCV 持続感染や慢性肝炎に寄与していることが示唆されている (Kanto K, Frontier in Bioscience 2008)。一方、HCV 感染者の 30%程度は慢性化には至らず寛解する。この慢性化移行を規定する要因として、細胞障害性 T 細胞や中和抗体といった獲得免疫応答の重要性が挙げられているが、自然免疫担当細胞の意義についてはほとんど不明である。

一般的に HCV 感染急性期では顕著な病態が認められず、慢性経過後の病態発現に伴う愁訴によりその感染が明らかとなる。さらに自然免疫応答は感染急性期における非常に早い時点で現われる。これらのことから、HCV 感染初期における自然免疫応答の解析は非常に困難である。こうした研究においては、実験感染が可能な動物モデルは非常に有用なツールである。HCV に感受性を示し、生理的な免疫応答を解析可能な実験動物としてこれまでチンパンジーが用いられてきた。しかし絶滅危惧種であることや動物倫理上の問題から、現在では日本を含む多くの世界各国においてその侵襲的研究への使用が禁止されている。

2. 研究の目的

我々は、HCV/チンパンジーに代わる新たなサロゲート動物モデル構築を目指し、これまで本邦で先駆けて研究を進めてきた。GBV-B は、フラビウイルス科ヘパシウイルス属に分

類される最も HCV に近縁のウイルスであり、新世界ザルであるタマリン・マーモセットへの攻撃接種によりウイルス血症に伴う急性肝炎を呈する。また HCV 同様にリンパ系等の肝外組織にも感染性を呈する。特筆すべきことに、マーモセットへの GBV-B 感染により 3 年以上の長期に渡り間歇的なウイルス血症及び ALT 値の上昇を伴う慢性 C 型様肝炎を呈することを世界で初めて見出した。従って、本モデルにより HCV の急性期にのみでなく慢性期における病態や免疫応答の解析において非常に有用である。そこで本研究では、我々が新規に開発した霊長類サロゲートモデルを用いて、ウイルス感染過程における自然免疫応答の役割について、特に NK 細胞に焦点を当て検討する。NK 細胞は肝臓に大量に存在しており、HCV 感染をコントロールする自然免疫応答の直接的な mediator として重要である。NK 細胞は活性化した後、抗原提示細胞である樹状細胞の maturation に寄与していることから、NK 細胞の機能障害は後に続く慢性化への発端であると推測される。一方 HCV の E2 が NK 細胞に発現している CD81 に結合することで NK 細胞自体の機能を直接的に阻害している。しかしこうした *in vitro* における研究が、果たして生体内における複合系としての自然免疫応答を反映しているのか明らかではない。またヒト HCV 感染急性期における経時的解析は技術的に困難である。そこで本研究では、我々が新規に開発した新世界ザル C 型肝炎サロゲートモデルにおいて、NK 細胞特異抗体を投与し NK 細胞を人工的に除去すること (*in vivo* depletion) により、急性感染時および慢性期における抗ウイルス応答における NK 細胞の意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

CD16 は NK 細胞の表面マーカーとして知られている。アカゲザルにおいて抗 CD16 抗体(3G8)を用いてNK細胞を *in vivo* depletion に成功している。我々は同抗体がタマリンに交差反応性を示すことを確認済みである。そこで上記報告のプロトコルに基づき、タマリンにおけるNK細胞 *in vivo* depletion のための至適条件を検討する。NK細胞の cytotoxic assay を行うため、Carboxy-fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) で染色した K562 細胞とタマリン PBMC と K562 細胞の共培養を行う。その後に Annexin V 染色を用い、タマリン PBMC における K562 細胞に対する傷害活性を測定する。この系が確立された後、コントロール抗体投与群と CD16 抗体を用いたNK細胞 depletion 条件群におけるNK細胞の傷害活性を測定する。NK細胞を CFSE で染色した K562 細胞とタマリン PBMC と K562 細胞の共培養を行う。その後に Annexin V 染色を用い、タマリン PBMC における K562 細胞に対する傷害活性を測定する。この系が確立された後、コントロール抗体投与群と CD16 抗体を用いたNK細胞 depletion 条件群におけるNK細胞の傷害活性を測定する。これらの結果を踏まえ、NK細胞の depletion によりウイルス感染時における血中ウイルス量を含む生体内ウイルス動態、肝炎病態及び獲得免疫応答に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

まず新世界ザルであるタマリンにおいてCFSEを用いた簡便かつ定量的なNK細胞の活性評価系を確立した。次にタマリンにおいて抗CD16(3G8)抗体によりNK細胞の *in vivo* depletion が可能かどうかについて検討した。その結果、50 mg/kg の容量で抗CD16(3G8)抗体を経静脈にて投与することにより、NK細胞の顕著な減少が明らかになった。また生体内におけるNK細胞数の減少に伴って、NK活性の低下が確認できた。興味深いことに、CD16陽性NK細胞がほぼ検出されない状態でも、血中NK活性は低いながらもある程度検出されることから、NK細胞はCD16陽性及び陰性亜集団に分類されることが示された。現在、これらの方法を用いて、HCVのサロゲートモデルであるGBV-B感染タマリンモデルにて、感染急性期におけるNK細胞の役割を検討している。すなわちCD16陽性NK細胞を一過性に除去したタマリンにC型肝炎ウイルスと同じヘパシウイルスに属するGBV-Bを接種し、血中ウイルス量の動態および抗ウイルス抗

体誘導能をコントロール群と比較している。これらの結果を踏まえ、今後はNK細胞による肝炎ウイルスなどの持続感染制御への関与についてより詳細に解析を進めていきたい。

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 3 件)

1. Yoshida T, Omatsu T, Saito A, Katakai Y, Iwasaki Y, Kurosawa T, Hamano M, Nakamura S, Takasaki T, Yasutomi Y, Kurane I, Akari H: CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins. Archives of Virology 157, 363-368, 2012. doi:10.1007/s00705-011-1178-6

2. Iwasaki Y, Mori K, Ishii K, Maki N, Iijima S, Yoshida T, Okabayashi S, Katakai Y, Lee Y-J, Saito A, Fukai H, Kimura N, Ageyama N, Yoshizaki S, Suzuki T, Yasutomi Y, Miyamura T, Kannagi M, Akari H: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. Frontiers in Microbiology 2, 240, 2011. doi:10.3389/fmicb.2011.00240

3. Yoshida T, Saito A, Iwasaki Y, Iijima S, Kurosawa T, Katakai Y, Yasutomi Y, Reimann KA, Hayakawa T, Akari H: Characterization of natural killer cells in tamarins: a technical basis for studies of innate immunity. Frontiers in Microbiology 1, 128, 2010. doi:10.3389/fmicb.2010.00128

[学会発表] (計 4 件)

1. Hirofumi Akari, Yuki Iwasaki, Ken-ichi Mori, Koji Ishii, Noboru Maki, Sayuki Iijima, Tomoyuki Yoshida, Sachi Okabayashi, Yuko Katakai, Young-Jung Lee, Akatsuki Saito: Long-term persistent GBV-B infection and development of a progressive chronic hepatitis C-like disease in marmosets. International Union of Microbiological Society 2011 Congress. 11-16 September, 2011, Sapporo.

2. 明里宏文：霊長類モデル動物を用いたウイルス感染症研究. 東京医科歯科大学・難治疾患共同研究拠点研究集会（東京）平成23年10月7日

3. 明里宏文：C型肝炎とHIV感染症（AIDS）第57回日本実験動物学会学術集会シンポジウム（京都）平成22年5月12-14日

4. Yoshida T, Iwasaki Y, Mori K, Maki N, Ishii K, Iijima S, Yoshizaki S, Katakai Y, Suzuki T, Miyamura T, Akari H: Selective and frequent non-synonymous mutations of the viral genome in chronically GBV-B-infected marmosets.

16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (France, Nice)
Oct 3-7, 2009

〔図書〕（計 1 件）

1. 明里宏文：新しい C 型肝炎の霊長類モデル. 生命のつづれ織り 3, 155-160, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明里 宏文 (AKARI HIROFUMI)
京都大学・霊長類研究所・教授
研究者番号：20294671

(2) 研究分担者

吉田友教 (YOSHIDA TOMOYUKI)
京都大学・霊長類研究所・特定助教
研究者番号：00451948