

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790761

研究課題名（和文）多元的解析モデルを用いたウイルス関連肝癌免疫逃避機構の解明と制御

研究課題名（英文） The multifactorial analysis and regulation of the immune evasion in viral-related hepatocellular carcinoma

研究代表者

近藤 泰輝 (KONDO YASUTERU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：70455822

研究成果の概要（和文）：

HCV-HBV のウイルス相互作用は免疫細胞を介していることが明らかとなった。HCV-Core 抗原は直接免疫抑制に働くことが分かった。各種 HBV ジェノタイプにより肝癌細胞におけるケモカインの発現パターンが異なっていることが明らかとなった。その中で CX3CL1 の発現は、ジェノタイプ間で有意に異なり、NK 細胞浸潤能が変化することが分かった。また、この浸潤 NK 細胞の NKG2D 発現は抑制されていることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

HBV-HCV viral interaction was occurred with immune cells. HCV-Core antigen could directly suppress the immune response. The expression patterns of chemokine were different among the various HBV genotypes. Among them, the expression level of CX3CL1 and the migration activity of NK cells were significantly different among HBV-genotypes. Moreover, the expression of NKG2D on the migrated NK cells was suppressed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：HBV、HCC、ケモカイン、NK Cell、T Cell

## 1. 研究開始当初の背景

癌に対する免疫反応は細胞傷害性 T 細胞 (CTL)、ナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) キラー T 細胞 (NK-T 細胞) などがエフェクターとして機能し、肝癌へ遊走浸潤することにより成立する。実際、エフェクター細胞が十分に浸潤している症例の予後は良いとされる。最近では、これらエフェクター細胞の効率的な活性化を促す目的でナノテクノロジーなどを用いた新規免疫療法の開発がされている。しかしながら、ウイルス関連肝癌においては様々な免疫逃避機構が存在しており、未だ十分な治療効果は得られていない。申請者らは、各種肝疾患における免疫逃避機構について

検討を重ねてきた。

## 2. 研究の目的

ウイルス関連肝癌における免疫逃避機構は巧妙であり肝癌とウイルス因子を同時に考慮しなければならない。当研究ではウイルス因子と肝癌細胞より産生される種々の可溶性（液性）因子に着目し、これが免疫細胞遊走浸潤と分化に如何に関与するのか共培養系を用いて多元的に解析する。

## 3. 研究の方法

(1) HBV-HCV のウイルス相互作用解析  
肝癌細胞株 Huh-7 に JFH-1 を感染させ、その後 HBV-genotype B 2 種類、HBV-genotype C

2種類のプラスミドを導入してウイルス定量をリアルタイムPCRにて行った。HBVの導入ありなしの条件下でインターフェロンのHCV抑制効果についても解析した。

(2) HCV-Core 抗原による直接の免疫反応抑制機序解析

- ① Double filtration plasmapheresis (DFPP) 治療におけるHC-Core 抗原除去能力を評価した。
- ② HCV-Core 抗原結合CD4陽性T細胞の解析をフローサイトメトリーにて施行した。
- ③ DFPP 併用群におけるCD4陽性T細胞のSTAT-1, T-bet シグナルを評価した。

(3) 各種HBV ジェノタイプによる肝癌細胞の免疫誘導能解析

- ① 各種HBV ジェノタイプ発現プラスミドを肝癌細胞株Huh7に導入してケモカイン関連リアルタイムPCRアレイを施行する。発現量が多く、また各種HBV ジェノタイプで発現量に有意差があるケモカインの同定を施行する。
- ② CX3CL1の発現量が高くジェノタイプ間でも異なっていることからウイルス関連肝癌病態に影響を及ぼしている可能性があり他の肝癌細胞株HepG2細胞においても検討を加えた。
- ③ 次に培養上清中のCX3CL1定量と各種免疫細胞の遊走実験を施行した。
- ④ C型肝炎関連肝細胞癌、B型肝炎関連肝細胞癌、非B非C型肝炎関連肝細胞癌切除標本を用いてCX3CL1発現、CD3T細胞浸潤、CD56陽性NK細胞浸潤を免疫染色にて評価した。
- ⑤ NK細胞表面のCX3CR1発現、NKG2D発現を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 免疫細胞の存在しない *in vitro* 系においてC型肝炎ウイルス量はHBVウイルスの存在により直接的な影響を受けないことが明らかとなった。またIFN- $\alpha$ 投与によるHCVの抑制効果はHBV存在によっても影響を与えないことが明らかとなった。一方 *ex vivo* 解析ではHBV特異的な免疫抑制機序がHCV特異的な免疫反応を抑制するため、HBV関連肝細胞癌ではHBV特異的な免疫抑制機序が肝細胞癌に対する免疫反応にも影響を与えることが想定された。

(2)

- ① 血中HCV-Core抗原量はDFPP施行により速やかに低下することが明らかとなった。この傾向はEVR症例において顕著であった。
- ② 血中のみならず、CD4陽性T細胞に結合しているHCV-Core抗原量もDFPP処置により

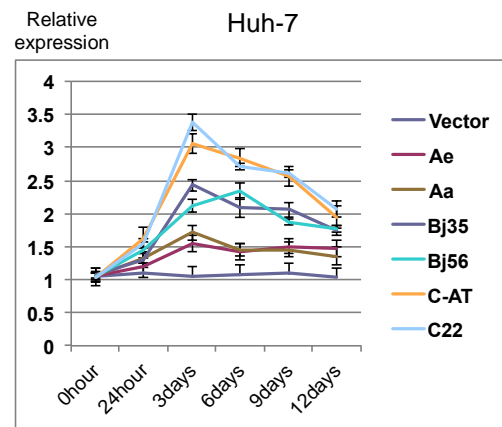
速やかに低下することが明らかとなった。

③ DFPP処置によりCD4陽性T細胞のHCV-Core抗原結合量が低下した症例においてコントロール症例と比較してSTAT-1, T-betシグナルが増強することが明らかとなった。これらの事象からHCV-Core抗原の存在により腫瘍免疫にも重要である細胞性免疫反応が抑制されることが想定された。

(3)

- ① HBV ジェノタイプA, B, Cプラスミド導入にて発現が増強しかつジェノタイプ間で発現量に差が生じるケモカインにCX3CL1が同定された。(図1)
- ② 他の肝がん細胞株であるHepG2においてCX3CL1の発現を検討したが、①と同様の結果であった。

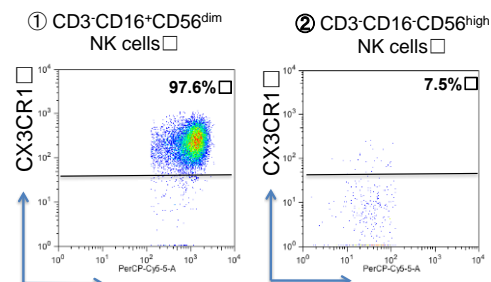
図1 CX3CL1mRNAの経時的発現(Huh7)



③ 上清中のCX3CL1濃度は上記mRNA発現と同じ傾向であった。また遊走試験の結果、T細胞、NK細胞遊走はCX3CL1濃度依存がみられた。またCX3CL1中和抗体にてこの遊走能は阻害された。

④ B型肝炎関連肝細胞癌においてCX3CL1発現が強い患者が多かった。また、T細胞浸潤も顕著である症例が多かった。

図2 NK細胞のCX3CR1発現



⑤ B型肝炎関連肝細胞癌患者においてCX3CR1陽性NK細胞(図2)のNKG2D発現は

他の肝細胞癌患者、慢性肝炎患者と比較して有意に低下していた。

これらの結果からB型肝炎肝細胞癌患者においてCX3CL1発現が誘導され、CX3CR1陽性免疫細胞を誘導するが、誘導された免疫細胞の細胞障害性は阻害されているため、肝癌細胞増殖にとって有利な環境を構築していることが想定された。

#### 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 21 件)

1. Kondo Y, Iwata T, Haga T, Kimura O, Ninomiya M, Kakazu E, Kogure T, Morosawa T, Aiba S, Shimosegawa T. Eradication of hepatitis C virus (HCV) could improve the immunological status and pyoderma gangrenosum-like lesion Hepatology Research 2013 Mar 4. doi: 10.1111/hepr.12102. [査読有り]
2. Kondo Y, Uno K, Machida K and Terajima M PPARs and Liver Diseases PPAR Research 2013;2013:896412. doi:10.1155/2013/89641 [査読有り]
3. Kondo Y, Ninomiya M, Kakazu E, Kimura O, Shimosegawa T. Hepatitis B surface antigen could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis B virus infection in submission. ISRN Gastroenterology 2013;2013:935295. doi: 10.1155/2013/935295. [査読有り]
4. Kimura O, Kondo Y, Shimosegawa T PPAR could contribute to the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. PPAR Research 2012;2012:574180. doi: 10.1155/2012/574180. [査読有り]
5. Kakazu E, Kondo Y, Shimosegawa T Relationship between renal dysfunction and abnormalities of the immune system in patients with decompensated cirrhosis ISRN Gastroenterology 2012;2012:123826. doi: 10.5402/2012/123826. [査読有り]
6. Ninomiya M, Kondo Y, Shimosegawa T Murine models of non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis ISRN Hepatology Volume (2013) <http://dx.doi.org/10.1155/2013/237870> [査読有り]
7. Kondo Y, Ueno Y, Shimosegawa T. Double filtration plasmapheresis could induce a favorable immune response for chronic hepatitis C therapy. Therapeutic Apheresis and Dialysis 2012 Oct;16(5):478-9. doi: 10.1111/j.1744-9987.2012.01113.x. [査読

有り]

8. Inoue J, Ueno Y, Kawamura K, Yamamoto T, Mano Y, Miura M, Kobayashi T, Niitsuma H, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Kimura O, Obara N, Kawagishi N, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Association between S21 substitution in the core protein of hepatitis B virus and fulminant hepatitis. Journal of Clinical Virology 2012 Oct;55(2):147-52. doi: 10.1016/j.jcv.2012.06.011. [査読有り]
9. Kakazu E, Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Nagasaki F, Ueno Y, Shimosegawa T. The influence of pioglitazone on the plasma amino acids profile in patients with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) Hepatology International 2012 doi:10.1007/s12072-012-9395-y [査読有り]
10. Kondo Y, Ueno Y, Ninomiya M, Tamai K, Tanaka Y, Inoue J, Kakazu E, Kobayashi K, Shimosegawa T. Sequential Immunological Analysis of HBV/HCV Co-Infected Patients During Peg-IFN/RBV therapy J Gastroenterol. 2012 Dec;47(12):1323-35. doi: 10.1007/s00535-012-0596-x. [査読有り]
11. Kondo Y, Ueno Y, Shimosegawa T. Biological Significance of HCV in various kinds of lymphoid cells. International Journal of Microbiology 2012 doi:10.1155/2012/647581 [査読有り]
12. Ninomiya M, Ueno Y, Funayama R, Nagashima T, Nishida Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Kimura O, Nakayama K, Shimosegawa T. Use of Illumina deep sequencing technology to differentiate hepatitis C virus variants. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):857-66. doi: 10.1128/JCM.05715-11. [査読有り]
13. Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway Virology. 2012 Jan 20;422(2):377-85. [査読有り]
14. Kondo Y, Ueno Y, Wakui Y, Ninomiya M, Kakazu E, Inoue J, Kobayashi K, Obara N, Shimosegawa T. Rapid Reduction of HCV-Core protein in the peripheral blood improve the immunological response in Chronic Hepatitis C patients Hepatol Res. 2011 Dec;41(12):1153-68. [査読有り]
15. Kondo Y, Ueno Y, Shimosegawa T. Toll Like Receptors (TLRs) Signaling Contribute to Immunopathogenesis of HBV Infection. Gastroenterol Res Pract.

- 2011;2011:810939. doi:  
10.1155/2011/810939. [査読あり]
16. Kondo Y, Ueno Y, Shimosegawa T. Dysfunction of Immune Systems and Host Genetic Factors in Hepatitis C Virus Infection with Persistent Normal ALT. Hepatitis Research and Treatment 2011 doi:10.1155/2011/713216 [査読有り]
17. Kakazu E, Ueno Y, Kondo Y, Inoue J, Ninomiya M, Kimura O, Wakui Y, Fukushima K, Tamai K, Shimosegawa T. Plasma L-cystine/L-glutamate imbalance increases tumor necrosis factor-alpha from CD14+ circulating monocytes in patients with advanced cirrhosis. PLoS One. 2011;6(8):e23402. doi:  
10.1371/journal.pone.0023402. [査読有り]
18. Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced Replication of Hepatitis B Virus with Frameshift in the Precore Region Found in Fulminant Hepatitis Patients J Infect Dis. 2011 Oct 1;204(7):1017-25. [査読有り]
19. Fukushima K, Ueno Y, Kawagishi N, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Ninomiya M, Wakui Y, Saito N, Satomi S, Shimosegawa T. The Nutritional Index 'CONUT' Is Useful for Predicting Long-Term Prognosis of Patients with End-Stage Liver Diseases. Tohoku J Exp Med. 2011;224(3):215-9. [査読有り]
20. B型肝炎ウイルス制御のための病態解析 近藤泰輝、上野義之、下瀬川徹 消化器と免疫(48) 2011: 62-65 [査読無し]
21. C型肝炎のすべて 2012: 症例に応じたDAA治療時期の選択 近藤泰輝、上野義之、下瀬川徹 肝胆膵 63(6):1255-1260, 2011 [査読無し]

[学会発表] (計 19 件)

1. 近藤泰輝 他 シンポジウム HBV 持続感染患者における免疫抑制のメカニズムと ETV-IFN Sequential 療法中における経時的免疫解析 日本肝臓学会東部会 2012 年 12 月 7 日 東京
2. Kondo Y et al. Vitamin D3 supplementation could improve the sensitivity of immune-response during Peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C patients 10th STC-JSH 2012 Young Investigator Award (Distinguished Oral Presentation) 2012 年 11 月 22 日 東京
3. Kondo Y, et al. HBV-related hepatocellular carcinoma could express CX3CL1 and affect the migration of NKG2D<sup>low</sup>CX3CR1<sup>+</sup>NK cells AASLD 2012 Annual

- Meeting 2012 年 11 月 10 日 ボストン、アメリカ
4. Kondo Y, et al. Detection of a new genotype 1b lymphotropic HCV strain and analysis of Th17 commitment AASLD 2012 Annual Meeting 2012 年 11 月 10 日 ボストン、アメリカ
5. 近藤泰輝 他 パネルディスカッション Th17 分化誘導による HCV 関連自己免疫疾患発症の可能性 日本肝臓学会大会 JDDW 2012 年 10 月 11 日 神戸
6. 近藤泰輝 他 IL28B, ITPA polymorphism と Vitamin D 濃度からみた肝移植後 C 型肝炎治療今後の可能性 第 48 回日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 7 日 金沢
7. 近藤泰輝 他 HBV 関連肝細胞癌より放出される液性因子は免疫細胞浸潤能、活性化に影響を与える ワークショップ 第 48 回日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 7 日 金沢
8. 近藤泰輝 他 Vitamin D3 製剤併用 Peg-IFN/RBV 治療の成績(多施設共同研究) オープンワークショップ 48 回日本肝臓学会総会 2012 年 6 月 7 日 金沢
9. Kondo Y, et al. Rapid Reduction of HCV-core Protein in the peripheral Blood induces Favorable Effect in Treatment of Chronic Hepatitis C Patients IF-Best Poster Award Presentation in the 3rd International Forum JSGE 2012 年 4 月 20 日 東京
10. Kondo Y, et al. The CX3CL1 produced from HBV-replicated human hepatoma cells could affect the migration activity of lymphoid cells. APASL 2012 Annual Meeting 2012 年 2 月 17 日 台北 台湾
11. Kondo Y, et al. IMMUNOLOGICAL AND VIROLOGICAL ANALYSIS OF HBV/HCV DUAL INFECTION AASLD Annual Meeting 2011 年 11 月 1 日 サンフランシスコ アメリカ
12. Kondo Y, et al. HCV-CORE PROTEIN COULD INDUCE TH17 COMMITMENT BY ENHANCING THE STAT-3 SIGNALING AASLD Annual Meeting 2011 年 11 月 1 日 サンフランシスコ アメリカ
13. 近藤泰輝、上野義之、下瀬川徹 シンポジウム: 消化器疾患と免疫 慢性 C 型肝炎患者における自己免疫性疾患発生の新規メカニズム JDDW 2011 年 10 月 21 日 福岡
14. 近藤泰輝 他 Vitamin D または DDFPP 併用 Peg-IFN/RBV 治療は免疫細胞活性化を介して抗ウイルス効果を増強する JDDW 2011 年 10 月 21 日 福岡
15. 近藤泰輝 他 C 型肝炎治療におけるアフェレーシスの役割 DFPP 併用 Peg-IFN/RBV 治療は免疫細胞活性化を介して抗ウイルス効果を増強する 日本アフェレーシス学会 2011 年 9 月 30 日 東京
16. 近藤泰輝、上野義之、下瀬川徹 シンポ

ジウム：免疫療法によるB型肝炎ウイルス制御のための病態解析 日本消化器免疫学会  
2011年7月21日 金沢

17. 近藤泰輝 他 HBV/HCV 共感染患者における免疫病態解析 日本肝臓学会総会  
2011年6月2日 東京

18. 近藤泰輝 他 HBV 複製肝癌細胞から産生されるケモカインの解析 日本肝臓学会総会  
2011年6月2日 東京

19. 近藤泰輝 他 HBV/HCV 共感染の免疫病態解析 日本内科学会総会 2011年4月15日 東京

[その他]

ホームページ等

Read & Researchmap

<http://researchmap.jp/read0139938/>

東北大学 消化器内科ホームページ

<http://www.gastroente.med.tohoku.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

近藤 泰輝 (KONDO YASUTERU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：70455822