

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460993

研究課題名(和文) C型肝炎におけるNK細胞の関与：NK細胞レセプターとIFNシグナル伝達からの解析

研究課題名(英文) The role of NK cell in the patients with hepatitis C virus infection; analysis focusing on NK cell receptor and IFN signal transducer

研究代表者

笠原 彰紀 (Kasahara, Akinori)

大阪大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70214286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：NK細胞の活性化は活性化型・抑制型レセプターのシグナルにより制御されているが、C型肝炎ウイルス感染における意義には明らかでない。C型慢性肝炎患者(CHC)、健康人から末梢血単核球を分離し、NKp46(活性化型レセプター)/NKG2A(抑制型レセプター)の発現をFACSで解析した。

NK細胞にはNKp46/NKG2Aともに高発現となる亜分画が存在し、その頻度はCHCで有意に増加し、血中ALT値と正の相関を認めた。本亜分画はSTAT1/FasL/TRAIL/CD107aの発現が亢進していた。IFN-刺激による細胞内におけるSTAT1のリン酸化も本亜分画で著明に亢進した。

研究成果の概要(英文)：The activation of NK cells was controlled by various NK cell receptors, however, the relationship between NK cell receptors and HCV infection remains still unclear.

Peripheral blood lymphocytes were obtained from patients with HCV infection (CHC; n=50) and healthy subjects (HS; n=35). The expression of NKp46 (an activating receptor)/NKG2A (an inhibitory receptor) were analyzed by flow cytometry. A unique NK cell subset strongly expressed both NKp46 and NKG2A was identified (NKp46^{high}NKG2A^{high} subset). The frequencies of this subset were higher in CHC (10.3%) than in HS (5.9%), and positively correlated with serum ALT level (P < 0.01, r = 0.432). The expression of Fas-L, STAT1, TRAIL and CD107a were higher in this subset than in the other. The expression of IFN- were lower in this subset than in the other. Phosphorylation of STAT1 was higher in this subset than in the other. NKp46^{high}NKG2A^{high} NK cell subset exhibited high cytotoxicity and associated with liver injury in HCV infection.

研究分野：肝臓学

キーワード：C型慢性肝炎

1. 研究開始当初の背景

肝硬変および関連する肝細胞癌による死亡は本邦において男性では第3位、女性では第4位と、癌死亡の主要な原因の一つである。C型肝炎ウイルス(HCV)は本邦でも患者数が多く、肝硬変や肝細胞癌といった重篤な病態の約80%は本ウイルスの影響と考えられており、最も重要な感染症の一つである。このC型肝炎ウイルスと宿主免疫応答の関連性がこれまでに報告されている。ウイルス感染が成立した際に、ウイルスを排除する機構として宿主の自然免疫が存在するが、その中でもNK細胞は非常に重要な役割を果たす。NK細胞は直接的な感染細胞の傷害に加え、サイトカインの分泌による適応免疫の橋渡しを行うなど、ウイルスの排除に重要な役割を担っていることが報告されている。申請者らはこれまで宿主免疫応答とHCV感染の関連について報告を行ってきた(Miyagi T. et al, J Gastroenterol 2011)。HCV感染は宿主免疫における細胞傷害活性を亢進させ肝障害に関連するとともに、IFN- γ を中心とする抗ウイルス活性をもったサイトカインの放出が抑制される現象を報告してきた(Miyagi T. et al, J Hepatol, 2010)。この点はウイルス自身による宿主免疫の抑制が、ウイルスの持続感染が成立しやすい環境を整えているものと考えられ、ウイルスの排除に自然免疫が重要である点を示している。NK細胞の活性化はIFNやIL-2などのサイトカインを介する経路と、NK細胞レセプターを介する経路に分類することができる。当初はサイトカインとの関連性について多く報告を行われており、NK細胞レセプターの関連性の解析を行う必要があった。NK細胞レセプターは活性型・抑制型レセプターに分類され、これらのレセプターからのシグナルのバランスによってNK細胞の活性化は制御されている。近年多数のNK細胞レセプターが同定されている。NKp46は活性型レセプターで、肝内のNKp46の発現と血清HCV-RNA量が逆相関することが報告されており、活性型レセプターの発現がウイルスの排除・抑制に関連している可能性がある。また、NKG2Aは抑制型レセプターで、C型肝炎患者に対するペグインターフェロン/リバビリン治療において、治療前のNKG2Aが高頻度となる群にSVRが少なかったということも報告されており、抑制型レセプターの発現が治療抵抗性と関連しており、インターフェロンの治療効果予測のマーカーとなる可能性も考えられている。しかしながら、抑制型・活性型のシグナルのバランス、あるいはサイトカインの誘導といった観点からのHCV感染とNK細胞レセプターの関連性の解析は不十分であり、検証する必要性があった。

2. 研究の目的

HCV感染において、宿主免疫応答の変化が重要であるとされているが、NK細胞レセ

プターとの関連は不明な点が多い。HCV感染におけるNK細胞レセプターの意義を、活性型レセプターであるNKp46及び抑制型レセプターであるNKG2Aに着目して解析し、その病態の解明や新たな治療標的を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

[1] C型肝炎患者(CHC: 50例)、健康人(HS: 35例)の末梢血から末梢血単核球(PBMC)を比重遠心分離した。CD3/CD56/NKp46(NK細胞活性型レセプター)/NKG2A(NK細胞抑制型レセプター)の特異抗体で染色し、これらの発現をフローサイトメトリーで解析した。またこれらのレセプターの発現と臨床データとの関連についても解析を行った。

[2] NKp46及びNKG2Aの発現で分類したNK細胞亜分画をフローサイトメトリーで電気的に単離し、亜分画ごとにNK細胞活性関連因子の遺伝子発現をReal Time PCRで解析した。その際にインターフェロン刺激の有無ごとに解析を行い、サイトカイン応答性に関しても評価した。

[3] NK細胞感受性白血病細胞株であるK562との共培養、あるいはサイトカインによる刺激を行い、各NK細胞亜分画の細胞傷害活性を脱顆粒マーカーであるCD107aで、サイトカイン分泌能を細胞内染色でのIFN- γ の発現で評価した。また細胞内のシグナル伝達の評価のために、インターフェロンによる刺激による細胞内STAT1のリン酸化の程度についても解析した。

4. 研究成果

[1] リンパ球中のCD3-CD56+で定義されるNK細胞の頻度はHSに比べてCHCで有意に低下した(CHC: 8.3%, HS: 12.0%)。CD3+CD56+で定義するNKT細胞及びCD3+CD56-で定義するT細胞の頻度には有意差を認めなかった。NK細胞にはNKp46及びNKG2Aともに高発現となるNK細胞亜分画が存在し、NKp46highNKG2Ahigh亜分画と定義した。本分画はCD56強発現で定義されるCD56bright NK細胞が約40%を占めていた。またリンパ球の未熟マーカーであるCD127の発現が高く、より未熟な細胞集団である可能性が示唆された。NK細胞におけるNKp46highNKG2Ahigh亜分画の頻度はCHCで著明に増加していた(CHC: 10.3%, HS: 5.9%)。NKp46highNKG2Ahigh亜分画の頻度と血中ALT値は正の相関を認めた($r=0.432$, $P<0.01$)。

[2] NKp46highNKG2Ahigh亜分画はSTAT1, FasL, TRAILといった細胞傷害活性に関わる因子の発現が遺伝子レベルで亢進していた。また本分画のIFN- γ の遺伝子発現は、非刺激下ではその他の分画に比して低下していたが、IFN- α の刺激により他分画と同程度まで亢進した。

[3] K562 との共培養系において、NKp46highNKG2Ahigh 亜分画はその他の分画に比べて CD107a の発現が高く、蛋白レベルでも細胞傷害活性が亢進していることが示された。また単離した NK 細胞において、IL-2 での刺激の有無で IFN- γ の蛋白発現に関して評価すると、遺伝子レベルの発現と同様に、非刺激下では他分画に比べて NKp46highNKG2Ahigh 亜分画における IFN- γ の発現が低下していたが、刺激によりその発現は同等となり、サイトカイン応答性が異なる可能性が考えられた。さらに、IFN- α 刺激による細胞内における STAT1 のリン酸化もその他の分画と比べて、NKp46highNKG2Ahigh 亜分画で亢進していた。

以上より、NKp46highNKG2Ahigh 亜分画は遺伝子レベル・蛋白レベルとも高い細胞傷害活性を有していることが示された。臨床検体を用いた検討でも血清 ALT と相関があり、肝障害に関連する可能性が示唆された。また、本亜分画はサイトカイン刺激による応答性や STAT1 のリン酸化の程度も異なり、インターフェロン治療およびその効果との関連性が期待され、臨床的に意義の大きい成果である。

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 3 件)

[1] Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Yamada R, Harada N, Morishita N, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Suzuki K, Inui Y, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T. The prospective randomized study on telaprevir at 1500 or 2250 mg with pegylated interferon plus ribavirin in Japanese patients with HCV genotype 1. *J Gastroenterol.* 2015 Mar;50(3):313-22. doi: 10.1007/s00535-014-0965-8.

[2] Tatsumi T, Takehara T. Impact of NK cells on chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2015 Nov 17. doi: 10.1111/hepr.12619.

[3] Tawara S, Tatsumi T, Iio S, Kobayashi I, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hiramatsu N, Miyoshi E, Takehara T. Evaluation of Fucosylated Haptoglobin and Mac-2 Binding Protein as Serum Biomarkers to Estimate Liver Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. *PLoS One.* 2016 Mar 22;11(3): e0151828.

[学会発表] (計 11 件)

[1] 向井香織、宮城琢也、竹原徹郎。「C 型慢性肝炎における Interferon-stimulated

Genes 発現誘導の機序と測定に関する検討」2013 年 10 月 9 日 第 17 回日本肝臓学会大会 (グランドプリンスホテル新高輪・東京)

[2] 吉岡鉄平、宮城琢也、竹原徹郎。シンポジウム 2 「ウイルス排除と癌発症抑制を目指した B 型肝炎治療戦略」 「NK 細胞レセプター-NKp46 及び NKG2A の発現頻度による NK 細胞亜分画と HBV 感染に関する基礎的検討」5 月 29-30 日 第 50 回日本肝臓学会総会 (ホテルニューオータニ・東京)

[3] Teppei Yoshioka, Takuva Miyagi, Yoshinobu Yokoyama, Akira Nishio, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Takatoshi Nawa, Ryotaro Sakamori, Hayato Hikita, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 「Frequency and role of NKp46 and NKG2A expressing NK cells in patients with chronic hepatitis B.」 September, 7-11, 2014. The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease (Boston, USA).

[4] Teppei Yoshioka, Takuva Miyagi, Yoshinobu Yokoyama, Akira Nishio, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Takatoshi Nawa, Ryotaro Sakamori, Hayato Hikita, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 「Frequency and role of NKp46 and NKG2A expressing NK cells in patients with chronic hepatitis B」. September, 20-21, 2014. Single Topic Conference 'Hepatitis B' (Hiroshima, Japan).

[5] 吉岡鉄平、宮城琢也、向井香織、横山恵信、西尾啓、名和誉敏、疋田隼人、阪森亮太郎、平松直樹、巽智秀、竹原徹郎。「B 型慢性肝炎の病態と治療における NK 細胞レセプターの意義」。2015 年 5 月 21-22 日。第 51 回日本肝臓学会総会 (熊本・ホテル日航熊本)

[6] 依誠一、巽智秀、青野悟志、大西良輝、西尾啓、重川稔、疋田隼人、阪森亮太郎、飯尾禎元、小林一三、三善英知、竹原徹郎。「C 型慢性肝疾患における血清中フコシル化ハプトグロビンおよび Mac-2 binding protein の臨床的意義」2015 年 5 月 21-22 日。第 51 回日本肝臓学会総会 (熊本・ホテル日航熊本)

[7] Teppei Yoshioka, Yoshinobu Yokoyama, Akira Nishio, Yoshiki Onishi, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Minoru Shigekawa, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Naoki Hiramatsu, Takuva Miyagi, Tomohide Tatsumi and Tetsuo Takehara. 「NK cells play important roles in the pathogenesis of HBV infection via alternation of NKp46high NKG2Ahigh subset」. September, 16, 2015. The 66th Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (San Francisco)

Poster presentation

[8] Seiichi Tawara, Tomohide Tatsumi, Sadaharu Iio, Ichizo Kobayashi, Shigeki

Suemura, Atsuo Takigawa, Tadashi Kegasawa, Takahiro Suda, Teppei Yoshioka, Yoshiki Onishi, Akira Nishio, Satoshi Aono, Minoru Shigekawa, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Naoki Hiramatsu, Eiji Miyoshi, Tetsuo Takehara.
「 Evaluation of both Fucosylated haptoglobin and Mac-2 binding protein as new biomarkers to estimate liver fibrosis in chronic hepatitis C patients 」。 September, 16, 2015. The 66th Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (San Francisco)
Poster presentation

〔図書〕(計0件)

〔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

http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/research_jisyu.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

笠原彰紀 (Akinori Kasahara)

大阪大学医学部附属病院・教授

研究者番号：70214286

(2)研究分担者

巽智秀 (Tomohide Tatsumi)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20397699

宮城琢也 (Takuya Miyagi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80532986

(3)研究協力者

吉岡鉄平 (Teppei Yoshioka)

大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生