

## 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04月16日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590842

研究課題名（和文） C型肝炎に対する効果的治療戦略探索に向けた免疫細胞内IFNシグナル伝達機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of interferon- $\alpha$  signaling in immune cells of patients with hepatitis C virus infection to establish effective therapeutic strategy.

研究代表者

宮城 琢也 (MIYAGI TAKUYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80532986

研究成果の概要（和文）：ウイルス排除に重要な役割を果たす Natural Killer 細胞においてシグナル伝達や誘導遺伝子発現を含めたインターフェロンに対する反応性が、C型慢性肝炎患者では変化していることが明らかになり、治療効果との関連も認められた。Natural Killer 細胞におけるインターフェロンシグナル伝達の変化が、C型肝炎の慢性化や抗ウイルス治療抵抗性の原因のひとつとなっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrates altered interferon- $\alpha$  signaling in natural killer cells in patients with chronic hepatitis C virus infection and suggests the association of this alteration with the persistence of hepatitis C virus infection and the resistance to interferon- $\alpha$ -based therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：C型肝炎、インターフェロン、シグナル伝達、免疫細胞、NK細胞、STAT

## 1. 研究開始当初の背景

日本国内で200万人、全世界で1億7千万人の感染者がいるといわれるC型肝炎ウイルスは、高頻度に持続的な慢性肝炎を引き起こし、最終的には肝細胞癌を発生させることから、C型肝炎ウイルス感染症は大きな健康問題の一つになっている。しかしながら、最先端の抗ウイルス療法でも著効率は5割程度にとどまり、治療抵抗性メカニズムの解明が希求されている。また、治療効果を治療開始前に予測することは、個々の患者に応じた治

療プロトコールを作成することにより副作用を軽減できるだけでなく、費用対効果といった医療経済の面からも重要である。

C型肝炎に対する抗ウイルス療法の大きな柱はIFN- $\alpha$ である。その作用機序としては、IFN- $\alpha$ によって誘導されるProtein kinase RやMxAといった抗ウイルス活性をもつ蛋白による直接的な作用と、IFN- $\alpha$ によって誘導される免疫調節作用を介したウイルス感染細胞排除作用とによると考えられている。ウイルス感染細胞を排除する際に

は Natural Killer (NK) 細胞、NKT 細胞、T 細胞といったエフェクター機能を有する免疫細胞が不可欠であり、それら細胞の持つパーフォリン、グランザイムといった細胞傷害因子や液性因子として産生される IFN- $\gamma$  が重要な役割を果たす。

IFN- $\alpha$  シグナルは主に、細胞質に存在する Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) によって伝えられる。すなわち、リン酸化された STAT (phosphoSTAT; pSTAT) が核内に移行し DNA と結合することにより数百もの遺伝子発現が誘導される。誘導される遺伝子には、抗ウイルス蛋白の他に免疫調節作用因子としてパーフォリン、グランザイムといった細胞傷害に関与する因子も含まれている。このようなシグナル伝達において STAT1 が重要な役割を果たすことが知られている。また我々は、STAT4 のリン酸化 (pSTAT4) によって IFN- $\gamma$  の誘導シグナルが伝えられることを報告した (Miyagi T, et al., J Exp Med. 2007; 204: 2383-96)。

IFN- $\alpha$  によって誘導されるパーフォリン、グランザイムといった細胞傷害因子や IFN- $\gamma$  は、NK 細胞、NKT 細胞、T 細胞といったエフェクター機能を有する免疫細胞がウイルス感染細胞を排除する際に重要な役割を果たすことから、治療として生体に投与される外因性 IFN- $\alpha$  によるシグナルがこれら細胞内においてどのように伝達されるかに応じて、治療効果が規定される可能性が考えられる。そこで本研究においては、これら免疫エフェクター細胞における IFN- $\alpha$  シグナル伝達に注目した。

## 2. 研究の目的

C 型慢性肝炎患者の免疫細胞における IFN- $\alpha$  応答性に関して、細胞内シグナル伝達・遺伝子発現誘導・蛋白産生および治療効果の各段階から解析することにより、慢性化機序や治療抵抗性メカニズムの解明および治療効果予測マーカーの探索を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) C 型慢性肝炎における免疫エフェクター細胞内 IFN- $\alpha$ シグナル伝達の解析

#### ①対象

C 型慢性肝炎患者と対照として、健常者。

#### ②研究材料と方法

上記対象より末梢血を採取し、単核球を分離した。単核球を *in vitro* にて IFN- $\alpha$  を含めた各種サイトカインで刺激し、細胞を回収した。細胞を下記特異的抗体により染色し、フローサイトメトリーにて解析した：細胞膜表面抗原 (CD3, CD56)・細胞内 IFN- $\alpha$  シグナル関連分子 (pSTAT1/4, STAT1)。細胞より

蛋白を採取後、Western Blotting にて下記蛋白を検出解析した：IFN- $\alpha$  シグナル関連分子 (pSTAT1/4, STAT1)。

#### ③検討項目

C 型慢性肝炎患者と非感染健常者間において、NK 細胞、NKT 細胞、T 細胞といった免疫エフェクター細胞各サブセットでの IFN- $\alpha$  シグナル伝達様式にサブセット間や対象群間でどのような差異が認められるか解析した。

### (2) C 型慢性肝炎における免疫エフェクター細胞での IFN- $\alpha$ 誘導遺伝子発現の解析

#### ①対象

C 型慢性肝炎患者と対照として健常者。

#### ②研究材料と方法

上記対象より末梢血を採取し、単核球を分離した。単核球より NK 細胞、NKT 細胞、T 細胞といったサブセットを磁気抗体にて単離した。単離したサブセットを *in vitro* にて IFN- $\alpha$  で刺激し、細胞を回収した。回収した細胞より RNA および蛋白を採取した。IFN- $\alpha$  刺激により誘導された遺伝子発現の変化を Real-time PCR にて解析した。

#### ③検討項目

C 型慢性肝炎患者と非感染健常者間において、免疫エフェクター細胞各サブセットでの IFN- $\alpha$  シグナル遺伝子発現誘導様式にどのような差異が認められるか解析した。

### (3) PEG-IFN- $\alpha$ /Ribavirin による抗ウイルス療法を受ける C 型慢性肝炎患者において、免疫エフェクター細胞サブセットにおけるシグナル伝達様式や遺伝子発現様式と治療効果との関連を解析した。

#### ①対象

PEG-IFN- $\alpha$ /Ribavirin による治療を受ける患者 (HCV-RNA: genotype 1 型、高ウイルス量)

#### ②研究材料と方法

上記対象より治療開始前後下記時点で末梢血を採取し、血清および単核球を分離した：(開始前、開始後 1 日、4 週、12 週、治療終了後 6 ヶ月)。

生体に投与された IFN- $\alpha$  による免疫エフェクター細胞内での IFN- $\alpha$  シグナル伝達を解析した。細胞を下記特異的抗体により染色し、フローサイトメトリーにて解析した：細胞膜表面抗原 (CD3, CD56)・細胞内 IFN シグナル関連分子 (pSTAT1/4, STAT1)。

生体に投与された IFN- $\alpha$  による免疫エフェクター細胞内 *in vivo* 誘導遺伝子発現を解析した。治療開始前後各採血ポイントで前記と同様に免疫細胞サブセットを単離した。単離した細胞より RNA を採取した。投与された IFN- $\alpha$  による誘導遺伝子発現の変化を Real-time PCR にて解析した。

治療効果モニタリングとして、各採血ポイントでの血清中 HCV-RNA 量を Real-time PCR 法にて定量した。

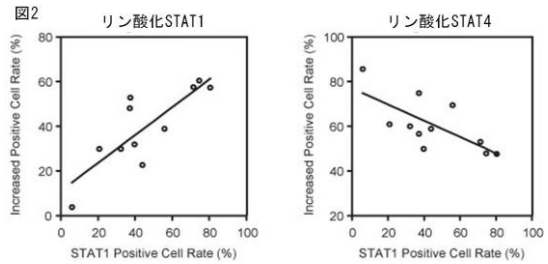
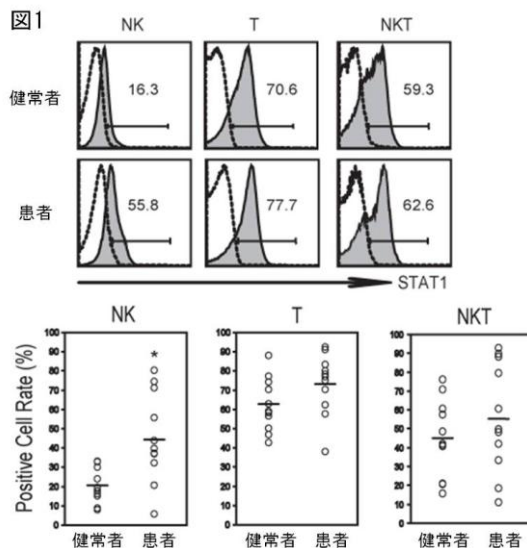
患者背景として、治療開始前血清を利用して下記背景因子を測定した：肝機能検査値・血小板値。肝生検施行例については、病理組織学的に炎症活動性や線維化を評価した。

### ③検討項目

血中 HCV-RNA の消失から判断した治療効果と免疫エフェクター細胞サブセットにおけるシグナル伝達様式や遺伝子発現様式との関連を解析した。

## 4. 研究成果

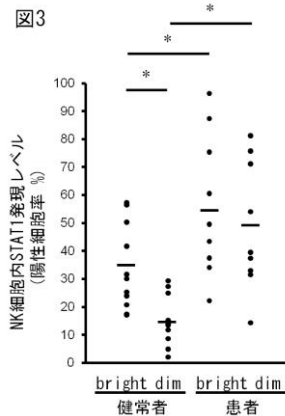
IFN- $\alpha$  シグナル伝達に重要な役割を果たす STAT1 発現量が、NK 細胞において健常者に比し C 型肝炎患者で有意に高かった (図 1)。NKT 細胞や T 細胞においては有意差を認めなかった。NK 細胞における IFN- $\alpha$  刺激でリン酸化される STAT の程度は、健常者に比し C 型肝炎患者で STAT1 リン酸化は有意に増強、STAT4 リン酸化は有意に減弱し、STAT1 発現量とそれぞれ有意な正相関、逆相関関係を示した (図 2)。NK 細胞におけるインターフェロン刺激による誘導遺伝子発現は、健常者に比し C 型肝炎患者で、リン酸化 STAT1 シグナル下流の *Suppressor of cytokine signaling 1* が有意に増強、リン酸化 STAT4 シグナル下流の *Interferon-gamma* が有意に減弱していた。*Perforin*、*Granzyme-b* は減弱傾向を認めた。また、IFN- $\alpha$  刺激による NK 細胞の細胞障害活性の増強度合いが、健常者と対照的に C 型肝炎患者においては、明らかに減弱していた。治療前の NK 細胞内 STAT1 発現量と治療開始後の IFN 誘導遺伝子発現量が逆相関関係を示した。すなわち治療前の STAT1 発現量が高いほど、投与された IFN- $\alpha$  に対する応答性が減弱する傾向を認めた。治療前の NK 細胞内 STAT1 発現量が比較的高い症例



においては、治療開始後 8 週目の血中 HCV-RNA が残存する傾向を、比較的低い症例においては、消失する傾向を認めた。

ウイルス排除に重要な役割を果たす NK 細胞においてシグナル伝達や誘導遺伝子発現を含めた IFN- $\alpha$  に対する反応性が、C 型肝炎ウイルス感染患者では変調をきたしていることが明らかになり、治療効果との関連も示唆された。

さらに、NK 細胞をサブセット (CD56<sup>bright</sup>、CD56<sup>dim</sup>) 別に解析すると、末梢血中の CD56<sup>dim</sup>NK 細胞サブセットの頻度が C 型肝炎患者で健常者に比して有意に低かった。NK 細胞活性化レセプターである NKG2D の発現が CD56<sup>bright</sup>、CD56<sup>dim</sup> 両サブセットにおいて、C 型肝炎患者で健常者に比して有意に低かった。また、抑制性レセプターである NKG2A/CD94 の発現は、CD56<sup>bright</sup> サブセットにおいて、C 型肝炎患者で健常者に比して有意に高かった。細胞内 STAT1 発現量が、CD56<sup>bright</sup>、CD56<sup>dim</sup> 両サブセットにおいて、C 型肝炎患者で健常者に比して有意に高く、



CD56<sup>dim</sup> サブセットで顕著であった (図 3)。

*in vitro* での IFN- $\alpha$  刺激で誘導される STAT リン酸化の程度が、CD56<sup>bright</sup> サブセットでは、サイトカイン分泌に必要な STAT4 リン酸化が有意に減弱し、CD56<sup>dim</sup> サブセットでは、細胞傷害に必要な STAT1 リン酸化が有意に増強していた。

C 型肝炎ウイルス感染症において、機能的に異なる特徴を有する二つの NK 細胞サブセット、すなわち、CD56<sup>bright</sup> サブセットと CD56<sup>dim</sup> サブセットとの間で異なった違いがあることが見出された。

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 3 8 件)

1. MIYAGI, T., SHIMIZU, S., TATSUMI, T., NISHIO, K., HIRAMATSU, N., KANTO, T., HAYASHI, N. & TAKEHARA, T. (2011) Differential alteration of CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> natural killer cells in frequency, phenotype, and cytokine response in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol*, 46, 1020-30. 査読有.
2. OZE, T., HIRAMATSU, N., YAKUSHIJIN, T., MOCHIZUKI, K., OSHITA, M., HAGIWARA, H., MITA, E., ITO, T., FUKUI, H., INUI, Y., HIJIOKA, T., INADA, M., KAYTAYAMA, K., TAMURA, S., YOSHIHARA, H., INOUE, A., IMAI, Y., KATO, M., MIYAGI, T., YOSHIDA, Y., TATSUMI, T., KISO, S., KANTO, T., KASAHARA, A., TAKEHARA, T. & HAYASHI, N. (2011) Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. *J Hepatol*, 54, 604-11. 査読有.
3. MIYAGI, T., TAKEHARA, T., UEMURA, A., NISHIO, K., SHIMIZU, S., KODAMA, T., HIKITA, H., LI, W., SASAKAWA, A., TATSUMI, T., OHKAWA, K., KANTO, T., HIRAMATSU, N. & HAYASHI, N. (2010) Absence of invariant natural killer T cells deteriorates liver inflammation and fibrosis in mice fed high-fat diet. *J Gastroenterol*, 45, 1247-54. 査読有.
4. MIYAGI, T., TAKEHARA, T., NISHIO, K., SHIMIZU, S., KOHGA, K., LI, W., TATSUMI, T., HIRAMATSU, N., KANTO, T. & HAYASHI, N. (2010) Altered interferon- $\alpha$ -signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, 53, 424-30. 査読有.
5. MIYAGI, T., LEE, SH. & BIRON, CA. (2010) Intracellular staining for analysis of the expression and phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STATs) in NK cells. *Methods Mol Biol*, 612, 159-75. 査読有.

[学会発表] (計 6 1 件)

1. 宮城琢也, C型慢性肝炎におけるNK細胞サブセット CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup>の関与、第53回日本消化器病学会大会、2011年10月21日、福岡。

2. 宮城琢也, Interferon- $\alpha$ -signaling in natural killer cells is impaired in chronic hepatitis C virus infection、第60回アメリカ肝臓病学会年次集会、2009年11月2日、ボストン(米国)。

3. 宮城琢也, C型肝炎に対するインターフェロン治療における免疫エフェクター細胞内シグナル伝達解析、第95回日本消化器病学会総会、2009年5月7日、札幌。

[図書] (計 2 件)

1. 宮城琢也, 中外医学社、Annual Review 2011 消化器 C型肝炎・肝がんにおける自然免疫応答、2011年、109~116。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 琢也 (MIYAGI TAKUYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80532986

(2) 研究分担者

竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：