

平成 23 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790642  
 研究課題名(和文) 自律増殖型リンパ指向性 HCV 複製体の作成が免疫病態解析に与えるインパクト  
 研究課題名(英文) Costraction of full-length lymphotropic HCV strain and immunopathogenesis of HCV lymphotropism  
 研究代表者 近藤 泰輝 (Kondo Yasuteru)  
 東北大学・病院・医員  
 研究者番号：70455822

研究成果の概要(和文)：ヒト B cell lymphoma から放出されるリンパ指向性 HCV である SB-HCV strain が細胞株のみならず、ヒトプライマリーリンパ球に感染することを見いだした。また、HCV がナイーブ T 細胞に感染することにより T 細胞分化増殖に影響を及ぼすことが分かった。さらに、Th17 分化を誘導するサイトカイン環境である IL6、TGF-beta 存在下では Th17 への分化を増強することが判明した。

研究成果の概要(英文)：It was shown that lymphotropic HCV (SB-HCV strain) derived from B cell lymphoma could not only replicate in lymphoma-cell-lines but also in primary human lymphocyte especially B cells and CD45RA+RO-naïve T cells. SB-HCV strain could infect naïve CD4+ cells and suppress the activity of proliferation. We have found that HCV-core protein is responsible protein that could block STAT-1 signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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型肝炎ウイルス，リンパ指向性 HCV，T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は世界中で1.7億人が感染しており、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主な原因となっている。一方でHCV感染者ではAIHとの合併やリンパ増殖性疾患、クリオグロブリン血症に代表される様々な肝外病変が報告されている。最近、肝近傍リンパ節において、HCV複製中間産物が検

出されたという報告がなされたことにより、ある特定の宿主状態、特定のHCV-Strainによりリンパ球内での複製がおこるという可能性が示唆された。(Gastroenterology 2006 230(4):1107-16. Pal S et al.)

このようなリンパ指向性HCVは、悪性腫瘍治療などの際問題となるOccult感染のリザーバー、B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma(B

- cell NHL) の原因、Mixed Cryoglobulinemia 関連疾患の原因、HCV の宿主免疫応答エスケープ、自己免疫疾患の誘導と、様々な病態に関与している可能性が示唆されている。よってリンパ指向性ウイルスにつき十分な検討をすることは、臨床上、非常に重要な課題である。しかし、HCV のリンパ球感染については議論もあり、これまで体系的な検討はなされてこなかった。

リンパ指向性 HCV-Strain(SB-strain)を産生する SB-cell line が確立された後、B、T リンパ系細胞株での複製について検討を重ね、報告を行ってきた。(PNAS 2004 Machida K, Cheng KT et al., Virology 2007 Konod Y, Sung VM et al., J Virol 2008 Machida K, Kondo Y et al.) しかしながら、プライマリーヒトリンパ球を用いた検討は十分でなく、自律増殖を行う系の確立とその応用が急務である。

## 2. 研究の目的

リンパ指向性 HCV のヒトリンパ球-感染系を確立し、病態との関わりについて検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) SB 細胞より分泌された HCV を用いてヒトプライマリーリンパ系細胞への感染実験を行う

#### ① 各種リンパ系細胞の分離

PBMCを CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 抗体で染色した後、FACS Arria II にて各抗体陽性細胞を分離した。CD4 陽性細胞は CD45RA と RO 染色にて naïve CD4 陽性細胞と effector CD4 陽性細胞に分離した。幾つかの検討においては、より viable な細胞を得る目的で磁気ビーズを用いて細胞を分離した。

② 各種リンパ系細胞の培養と HCV 感染  
各種プライマリーリンパ系細胞を増殖培養させる目的でサイトカインコンディションの決定を行い、viability 60%以上の条件にて HCV 感染を施行した。

#### ③ 感染の確認

HCV-strand-specific nested PCR を施行して positive strand RNA と negative strand RNA の検出を rtTh polymerase を用いて施行した。複製中間体である negative strand RNA が検出されれば複製が起こっていると判断した。

### (2) CD45RA+RO-naïve CD4+細胞を用いて分化、増殖に与える影響を検討する

#### ①細胞増殖能に対する影響

単離した naïve CD4+細胞を CFSE 染色し

SB-HCV 感染による影響を FACS Canto II, FlowJo software にて検討した。コントロールとして UV-irradiated HCV を用いた。

#### ② T 細胞分化に対する影響

CFSE と CD45RA との 2 重染色を施行することにより分化への影響を検討した。また、1 週間の分化培養後の IFN-g 産生細胞頻度を IFN-g secretion assay を用いて検討した。Th17 分化条件下での IL17 産生細胞頻度について検討した。

#### ③ Th1 分化抑制、Th17 分化促進の責任蛋白の同定

HCV-Core, E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS5A 蛋白発現プラスミドを Nucreofector にて Transfect し、分化に影響を与える責任蛋白の同定をした。

#### ④ STAT シグナル解析

HCV-Core と NS5A をトランスフェクトした T 細胞にて IFN-g/STAT-1/T-bet シグナル解析を Immunoblot analysis と real-time PCR を用いて施行した。

⑤ HCV-Core 蛋白発現 Lenti-virus の作成  
長期に HCV-Core 蛋白を発現させる目的で HCV-Core 発現 Lenti-virus を作成し、ヒトプライマリー T 細胞に感染させ、各種 Th1, Th2, Th17 マスター遺伝子である Tbet, GATA-3, ROR $\gamma$ t の発現を解析した。

### (1) 慢性 C 型肝炎患者の血清を用いた検討

#### ① 慢性 C 型肝炎患者 200 名の臨床 DATA の解析

当院に肝生検目的で入院となった慢性 C 型肝炎患者 200 名の臨床 DATA を解析し、自己免疫疾患罹患率、クリオグロブリン関連疾患罹患率を検討した。また、抗核抗体、抗平滑筋抗体など、自己抗体陽性率について検討を加えた。

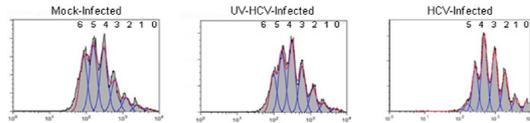
② 上記患者の中で血清が保存されていた患者について Th17 分化に重要であるサイトカインである IL6, TGF-beta, IL21 について ELISA で測定をした。

## 4. 研究成果

SB-HCV strain をプライマリーヒトリンパ系細胞に感染させた結果、CD4+T 細胞, CD14+ 単球, CD19+ B 細胞において negative strand RNA が検出された。CD4+ T 細胞の中では CD45RA+RO- naïve CD4+ T 細胞において良好に複製がみられた。培養刺激条件は CD3CD28 をコートしたビーズとともに、IL2 を加えた条件にて良好な複製が確認された。CFSE 染色

の結果、HCV 感染 CD4+ T 細胞では増殖能の低下が確認された。【図 1】

図 1

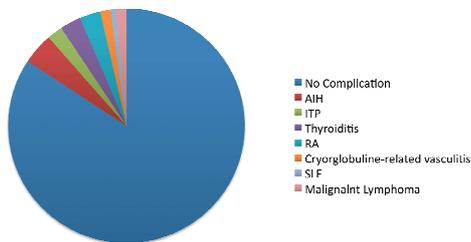


Journal of Gastroenterology 2011 Kondo Y et al. より改変

また IFN- $\gamma$  産生細胞への分化が有意に阻害された。この IFN- $\gamma$  産生に対する阻害作用は HCV-Core と NS5A 発現プラスミドを導入した T 細胞において確認された。更に、HCV-Core が STAT-1 シグナルを阻害することを見つけた。他の分化培養条件についても検討を加えた結果、Th17 分化条件である IL6, TGF- $\beta$  存在下でリンパ指向性 HCV は Th17 分化を増強することが分かり、この責任蛋白が HCV-Core であることが判明した。HCV-Core 蛋白を長期に発現させる目的で HCV-Core 発現 Lenti-virus を CD4+ T 細胞に感染させ検討を施行した。結果、Th17 のマスター遺伝子である ROR $\gamma$ t の有意な増強が確認された。

CHC 患者 200 名を解析した結果、抗核抗体陽性、抗平滑筋抗体陽性等の自己抗体陽性患者は多く、クリオグロブリン陽性患者も多いことが分かった。【図 2】

図 2



慢性 C 型肝炎患者における患者肝臓外病変の頻度

その中で血清が保存されていた患者について IL6, TGF- $\beta$  等のサイトカインを測定したが、IL6, TGF- $\beta$  が高い患者において有意に自己抗体陽性患者がみられた。このことから、リンパ指向性 HCV はこのような Th17 分化サイトカイン条件下で、さらに Th17 分化を促進している可能性が示唆された。

##### 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 20 件)

1. 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 in press 【査読有り】
2. Kondo Y, Ueno Y, et al. Lymphotropic HCV strain can infect human primary naïve CD4(+) cells and affect their proliferation and IFN-gamma secretion activity. J Gastroenterol. 2010 Aug 17. 232-41. 【査読有り】
3. Kimura O, Takahashi T, Ishii N, Inoue Y, Ueno Y, Kogure T, Fukushima K, Shiina M, Yamagiwa Y, Kondo Y, Inoue J, Kakazu E, Iwasaki T, Kawagishi N, Shimosegawa T, Sugamura K. Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. Cancer Sci. 2010 Jun 30 : 2145-2155. 【査読有り】
4. Tamai K, Tanaka N, Nakano T, Kakazu E, Kondo Y, Inoue J, Shiina M, Fukushima K, Hoshino T, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Aug 27;399(3): 384-90. 【査読有り】
5. Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, et al. Hepatitis B virus-replication could enhance Tregs activity by producing sHSP60 from hepatocyte. J Infect Dis. 2010 Jul 15;202(2):202-13 【査読あり】
6. Obara N, Fukushima K, Ueno Y, Wakui Y, Kimura O, Tamai K, Kakazu E, Inoue J, Kondo Y, Ogawa N, Sato K, Tsuduki T, Ishida K, Shimosegawa T. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. J Hepatol. 2010 Aug;53(2):326-34. 【査読有り】
7. Wakui Y, Inoue J, Ueno Y,

Fukushima K, **Kondo Y**, Kakazu E, Obara N, Kimura O, Shimosegawa T. Inhibitory effect on hepatitis B virus in vitro by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, rosiglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 May 28;396(2):508-14. 【査読有り】

8. Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Niitsuma H, Fukushima K, Yamagiwa Y, Shiina M, **Kondo Y**, Kakazu E, Tamai K, Obara N, Iwasaki T, Shimosegawa T. Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern. *J Viral Hepat.* 2011 Mar;18(3):206-15. 【査読有り】

9. Peg-IFN+RBV 併用長期投与の可能性 **近藤泰輝**、上野義之、下瀬川徹  
*肝胆膵* 2010 (61),90-96 【査読無し】

10. HBV 複製ストレスと細胞性免疫能の関係(解説)  
**近藤泰輝**、上野義之、下瀬川徹  
*Minophagen Medical Review*(0388-4783)55 巻 2 号 Page163-165 2010 【査読無し】

11. HCV 感染における小胞輸送経路 ESCRT の役割(原著論文)  
玉井恵一、上野義之、涌井祐太、小原範之、嘉数英二、井上淳、**近藤泰輝**、山極洋子、椎名正明、福島耕治、岩崎隆雄、下瀬川徹  
Source: *消化器と免疫* 46 号 Page206-210 2010 【査読無し】

12. Kakazu E, Ueno Y, **Kondo Y**, Fukushima K, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Ninomiya M, Shimosegawa T. Branched chain amino acids enhance the maturation and function of myeloid dendritic cells ex vivo in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology.* 2009 Dec;50(6):1936-45. 【査読有り】

13. Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Wakui Y, **Kondo Y**, Fukushima K, Niitsuma H, Shimosegawa T. Enhanced intracellular retention of a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis. *Virology.* 2009 Dec 20;395(2):202-9. 【査読有り】

14. **Kondo Y**, Ueno Y, Shimosegawa T. Immunopathogenesis of hepatitis B persistent infection: implications for immunotherapeutic strategies *Clinical Journal of Gastroenterology* 2009 Apr 2(2):71-79 【査読有り】

15. Kogure T, Ueno Y, Osamu K, **Kondo Y**, Inoue J, Fukushima K, Iwasaki T, Shimosegawa T. A novel third generation bisphosphonate, minodronate (YM529)

prevented proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells through inhibition of mevalonate pathway. 2009 May;39(5):479-89. 【査読有り】

16. Inoue J, Ueno Y, Nagasaki F, Akahane T, Fukushima K, Kogure T, **Kondo Y**, Kakazu E, Tamai K, Kido O, Nakagome Y, Ninomiya M, Obara N, Wakui Y, Takahashi M, Okamoto H, Shimosegawa T. Sporadic acute hepatitis E occurred constantly during the last decade in northeast Japan. *J Gastroenterol.* 2009;44(4):329-37. 【査読有り】

17. **Kondo Y**, Machida K, Liu M, Ueno Y, Kobayashi K, Wakita T, Shimosegawa T, Lai MM. Hepatitis C virus infection of T cells inhibits proliferation and enhances FAS-mediated apoptosis of T cells by down-regulating CD44v6 expression. *J Infect Dis.* 2009 Mar 1;199(5):726-36. 【査読有り】

18. 【肝硬変・肝癌の栄養代謝異常とその対策】肝硬変・肝癌の栄養代謝異常とその対策「非代償性肝硬変におけるアミノ酸 imbalance が免疫機構に及ぼす影響」  
嘉数英二、上野義之、**近藤泰輝**、下瀬川徹  
*消化器科* (0289-8756)49 巻 2 号 Page190-196 2009 【査読無し】

19. 非代償性肝硬変で出現する血漿アミノ酸不均衡は樹状細胞の成熟化を抑制する  
嘉数英二、上野義之、**近藤泰輝**、福島耕治、椎名正明、井上淳、玉井恵一、二宮匡史、下瀬川徹  
*東北医学雑誌* (0040-8700)121 巻 1 号 Page98-100 2009 【査読無し】

20. HBV 感染の際に肝細胞より産生される sHSP60 の Tregs 活性化における意義  
**近藤泰輝**, et al.  
*Minophagen Medical Review*(0388-4783)54 巻 2 号 Page137-139 2009. 【査読無し】

[学会発表] (計 13 件)

1. **Kondo Y**, et al. Immunological Response of HBV/HCV Co-infected Patients APASL STC HCV 千葉-幕張 2010. 12. 18
2. **近藤泰輝**, 上野義之, 下瀬川徹 日本肝臓学会 東部会 シンポジウム ウイルス肝炎における免疫応答の研究 病態解明と治療への応用 HBV複製を制御するための免疫病態解析 東京 2010.12.2
3. **Kondo Y**, et al. Analysis of chemokines derived from HBV-replicated

- hepatocellular carcinoma and infamed hepatocyte AASLD ポストン 2010.11.1
4. **近藤泰輝**, 上野義之, 下瀬川徹 日本肝臓学会大会 Drug FreeにてHBV複製をコントロールするための免疫病態解析 横浜 2010.10.13
  5. **Kondo Y**, et al. Possible Pathogenesis of Autoimmune Disease in Chronic HCV Infection: Relationship between Lymphotropic HCV and Th17 International meeting on Hepatitis C virus and related virus 横浜 2010.9.16
  6. **近藤泰輝**, et al. 日本肝臓学会総会 HCVウイルス感染とTh17分化誘導 山形 2010.5.27
  7. **近藤泰輝**, 上野義之, 下瀬川徹 日本消化器病学会総会 2010 シンポジウム: C型肝炎 ウイルス感染の分子免疫機構 HCV複製がT細胞内免疫シグナルに及ぼす影響と病態の関わり 新潟 2010.4.23
  8. **Kondo Y**, et al. Heat shock proteins derived from HBV-infected-hepatocyte enhance the function of regulatory T cells by TLR2 signaling APASL 2010 北京 2010.3.15
  9. **Kondo Y**, et al. HCV Replication in Human Lymphoid cells affects the development and proliferation activity 日本免疫学会総会 大阪 2009.12.3
  10. **Kondo Y**, et al. Stress-related proteins derived from HBV-infected-hepatocytes enhance the secretory functions of regulatory T cells AASLD ポストン 2009.11.1
  11. **Kondo Y**, Ueno Y, Machida K, et al. Possible pathogenecities of HCV replication in human lymphoid cells:

Potential role in human autoimmune diseases AASLD ポストン 2009.11.1

12. **近藤泰輝**, 上野義之, 下瀬川徹 慢性B型肝炎における過剰な制御性T細胞活性化のメカニズム (ワークショップ 3:免疫担当細胞異常からみた肝疾患の病態) JDDW 2009.10.14 横浜
13. **近藤泰輝**, 上野義之, 小林光樹, 椎名正明, 嘉数英二, 井上淳, 玉井恵一, 二宮匡史, 福島耕治, 下瀬川 徹 HBV感染肝細胞より産生されるsHSP60はTLR2を介してTregsの機能を増強する 日本肝臓学会総会 神戸 2009.6.4

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 近藤 泰輝 (Yasuteru Kondo)  
 東北大学・病院・医員  
 研究者番号: 70455822

(2) 研究分担者  
 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
 ( )

研究者番号: