

## 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25年 4 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590730

研究課題名（和文） HCV感染症におけるトリプトファン代謝酵素による免疫トレランス誘導機構の解明

研究課題名（英文） Investigation for the mechanisms of immune tolerance against HCV mediated by tryptophan-catalyzing enzyme, IDO

研究代表者

笠原 彰紀（KASAHARA AKINORI）

大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70214286

研究成果の概要（和文）：トリプトファン代謝酵素（Indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO）は、トリプトファン（Trp）をキヌレニン（Kyn）に代謝し、免疫寛容に寄与する。本研究では、HCV感染患者における免疫機能低下の機序として、IDOの関与を明らかにすることを目的とした。検討によって、1）C型肝炎患者では、血漿Kyn濃度は非感染者より高値であり、IDO活性が亢進していること、2）血漿Kyn値は、肝組織でのActivity、Fibrosisと正相関を認めること、3）樹状細胞は炎症刺激によってIDO活性が亢進し、制御性T細胞の誘導に関与すること、4）IL28B SNP minor群に限っては、血漿Kyn値が低い方がペグIFN $\alpha$ /リバビリン治療によるSVR率は高いことなどが判明した。以上の結果より、C型慢性肝炎では、肝臓の炎症、線維化の進展にともなってIDO活性が亢進しており、樹状細胞におけるIDO活性の亢進は、制御性T細胞の誘導を増加させることで、HCVの持続感染やペグIFN $\alpha$ /リバビリン治療における難治要因となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A tryptophan-catabolizing enzyme, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), is reported to be an inducer of immune tolerance. Our aim was to clarify whether IDO is activated or not in chronic hepatitis C patients (CHC) and its role in immune responses. Serum kynurenine concentration in CHC patients was significantly higher than those in healthy donors, the levels of which were positively correlated with histological activity or fibrosis scores. IDO activity in IDO-DCs from the patients was significantly higher than those from the donors. Furthermore, IDO-DCs from the patients induced more regulatory T cells (Tregs) compared to those from donors. In patients with IL28B minor genotype, Kyn concentration was lower in SVR patients in Peg-IFN $\alpha$ /ribavirin therapy than those in non-SVR patients. In conclusion, systemic IDO activity is enhanced in CHC patients in correlation with the degree of liver inflammation and fibrosis. IDO-DCs from the patients are prone to induce Tregs, resulting in HCV persistence or the resistance to IFN-based therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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：HCV、IDO、キヌレニン、トリプトファン、樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

HCVは種々の免疫細胞の機能異常を来とし、宿主の免疫監視機構から逃れることで持続感染を成立させている。この免疫細胞の異常は、癌化した細胞が免疫監視から逃れ増殖、増大することにも寄与している。従ってHCV初感染から肝癌へ至る経過を阻止するためには、免疫系の制御が必須である。Peg-IFN $\alpha$ とRibavirinの作用機序はHCVに対する直接的な抗ウイルス作用以外に、宿主免疫系の活性化を介した機序が想定されている。従って超難治例に対しては、抗ウイルス作用の増強以外に免疫系へのアプローチが必要である。C型慢性肝炎患者においては、樹状細胞、T細胞、NK細胞など、免疫系全般に渡り機能低下が報告されているが、その機序に関しては明らかではない。

## 2. 研究の目的

Indoleamine-2,3-dehydrogenase (IDO)はトリプトファン (Trp) をキヌレニン (Kyn) に分解する酵素であり、感染症や癌において免疫寛容の成立に関与すると報告されている。本研究ではHCV感染症における免疫細胞全般に渡る機能低下の機序、抗HCV療法抵抗性の機序、肝癌進展の機序として、HCVの免疫細胞への間接的な干渉作用を想定し、そのメディエーターとして、IDOの関与と治療標的としての意義を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) C型慢性肝炎患者におけるIDO活性と臨床病態との関連性

セロタイプ1型のC型慢性肝炎患者 (CHC群) 160人と非感染者 (HV群) 30人を対象とした。血漿中キヌレニン (Kyn) とトリプトファン (Trp) 濃度をHPLC法にて測定し、Kyn値、Kyn/Trp比をIDO活性のSurrogate markerとして評価した。患者群においては、血液生化学検査値、肝組織検査でのActivity (A因子)、Fibrosis (F因子)、HCVRNA量、IL28B SNPなどとの関連性を検討した。

### (2) 樹状細胞におけるIDO活性の免疫学的作用の検討

CHC群、HV群から樹状細胞を誘導し、ナイーブCD4T細胞、NK細胞と共培養し、T細胞、NK細胞のフェノタイプやサイトカイン産生能を評価した。また細胞機能へのIDOの関与を評価するために、IDO特異的阻害剤 (1-MT) を用いて、変化の有無を検討した。

### (3) Peg-IFN $\alpha$ /ribavirin治療効果におけるIDOの関与の検討

セロタイプ1型・高ウイルス量のC型慢性肝炎患者110人を対象として、Response-guidedで治療を行い、終了後24週時点でのウイル

ス学的効果を判定した。治療前IDO活性 (Kyn値) をパラメーターに入れて、SVR群、Non-SVR群で比較し、SVR、NVRに寄与する因子を単変量、多変量で解析した。

## 4. 研究成果

(1) C型肝炎患者 (CHC) 血漿中Kyn濃度は、非感染者 (HV) より有意に高値であり、CHC群ではIDO活性が亢進していた。

(2) C型慢性肝炎患者160人を対象とした解析では、血漿中Kyn値は、肝組織でのActivity (A因子)、Fibrosis (F因子) と正相関を認めた。また血小板数とは逆相関した。他の臨床マーカー (年齢、性別、HCVRNA量、HCVセロタイプ、IL28B SNP major/minor など) とは相関を認めなかった。

(3) Peg-IFN $\alpha$ /ribavirin治療において、全例を対象とした単変量解析では、血漿Kyn値はSVR、NVRを規定する因子として抽出されなかったが、IL28B SNP minorに限った検討すると、単変量解析では、血漿Kyn値が低い方が、SVR率が高かった。また多変量解析でも低Kyn値が、IL28B minorでのSVRを寄与する因子として抽出された。

(4) C型慢性肝炎患者から樹状細胞を採取し、種々の炎症刺激 (サイトカインなど) で刺激してIDO発現と活性を評価した。TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、LPSなどの刺激によって、末梢血樹状細胞 (DC)、単球由来DCに機能的IDOが発現した。IDO発現DCとNaïve CD4+T細胞との共培養によって、IL-10産生細胞が誘導され、これは制御性T細胞 (Treg) の表現型と合致していた。IDO活性阻害剤の1-MT処理によって、Treg誘導能が低下したことから、DCに発現するIDOはTreg誘導に関与することが明らかになった。

(5) C型慢性肝炎患者血液中のTreg頻度は、血漿Kyn値 (IDO活性) と正相関した。

(6) 以上の結果より、C型慢性肝炎では、肝臓の炎症、線維化の進展にともなってIDO活性が亢進しており、樹状細胞におけるIDO活性の亢進は、Treg誘導を介してHCVの持続感染や、ペグIFN $\alpha$ /リバビリン治療における難治要因となることが示唆された。

## 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8件)

1. Higashitani, K., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Matsubara, T., Kakita, N., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Mita, E., Imai, Y., Kasahara, A., Okuno, A., Takikawa, O., Hayashi, N. and Takehara, T., Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol* 2013 in press.
  2. Oze, T., Hiramatsu, N., Song, C., Yakushijin, T., Iio, S., Doi, Y., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Tamura, S., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Hayashi, E., Kato, M., Miyazaki, M., Hosui, A., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Hayashi, N. and Takehara, T., Reducing Peg-IFN doses causes later virologic response or no response in HCV genotype 1 patients treated with Peg-IFN alfa-2b plus ribavirin. *J Gastroenterol* 47: 334-342, 2012
  3. Kanto, T. \*, Inoue, M., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Kakita, N., Matsubara, T., Higashitani, K., Hagiwara, H., Iio, S., Katayama, K., Mita, E., Kasahara, A., Hiramatsu, N., Takehara, T. and Hayashi, N., Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 47: 169-178, 2012.
  4. 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. and Hayashi, N. \*, Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. *J Hepatol* 54: 604-611, 2011.
  5. Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Yamada, A., Oshita, M., Kaneko, A., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Nagase, T., Inui, Y., Hijioka, T., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Imai, Y., Kato, M., Hosui, A., Miyagi, T., Yoshida, Y., Ishida, H., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N. \*, The efficacy of extended treatment with pegylated interferon plus ribavirin in patients with HCV genotype 1 and slow virologic response in Japan. *J Gastroenterol* 46: 944-952, 2011
  6. Inoue, Y., Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Fukuda, K., Mita, E., Haruna, Y., Inoue, A., Imai, Y., Hosui, A., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N. \*, Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin. *J Med Virol* 83: 419-427, 2011.
  7. Hiramatsu, N., Inoue, Y., Oze, T., Kurashige, N., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Miyagi, T., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T., Oshita, M., Mita, E., Hagiwara, H., Inui, Y., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y. and Hayashi, N. \*, Efficacy of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for hepatitis C patients with normal ALT levels: a matched case-control study. *J Gastroenterol* 46: 1335-1343, 2011.
  8. Miyagi, T., Takehara, T. \*, Nishio, K., Shimizu, S., Kohga, K., Li, W., Tatsumi, T., Hiramatsu, N., Kanto, T. and Hayashi, N., Altered interferon-alpha-signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 53: 424-430, 2010.
- [学会発表] (計 7 件)
1. Higashitani K, Kanto T., Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Hiramatsu N., Mita E, Imai Y, Kasahara A., Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T. Association of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. **The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012, Nov 10**
  2. Matsubara T, Kanto T., Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Hiramatsu N., Kasahara A., Takehara T. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/TEM as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma **The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco CA, USA, 2011, Nov 7**
  3. Kakita N, Kanto T., Miyazaki M, Yoshio S, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Sakakibara M, Hiramatsu N., Kasahara A., Takehara T, Hayashi N. Enhanced ability of IL28A and IL28B induction in plasmacytoid

dendritic cells in chronic hepatitis C patients with major allele of IL28B single nucleotide polymorphism. **The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco CA, USA, 2011, Nov 8**

4. Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Doi Y, Ogawa H, Hagiwara H, Mita E, Kaneko A, Katayama K, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T. Viral suppression at week 4 exceeds the IL28B SNP for predicting SVR in pegylated interferon plus ribavirin combination therapy of genotype 1 infected patients with chronic hepatitis. **The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco CA, USA, 2011, Nov 6**
5. Yamada R, Hiramatsu N, Oze T, Harada N, Song C, Inoue Y, Kurokawa M, Miyazaki M, Yakushijin T, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T. Estimation of liver fibrosis by VTTQ (Virtual tissue touch quantification in chronic liver disease: the usefulness of VS/PLT). **The Liver Meeting AASLD 62nd Annual Meeting and Postgraduate Course, San Francisco CA, USA, 2011, Nov 6**
6. Higashitani K, Kanto T, Miyazaki M, Inoue M, Matsubara T, Kakita N, Itose I, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Active role of tryptophan catalyzing enzyme, indoleamine 2, 3-dioxygenase, in the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. **The Liver Meeting AASLD 61<sup>st</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston MA, 2010, Oct 30**
7. Higashitani K, Kanto T, Miyazaki M, Inoue M, Matsubara T, Kakita N, Itose I, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Indoleamine 2, 3-dioxygenase as an active inducer of regulatory T cells in chronic HCV infection. **17<sup>th</sup> International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses, Yokohama Japan, 2010, Sep 11**

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学  
ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原 彰紀 (KASAHARA AKINORI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70214286

### (2) 研究分担者

考藤 達哉 (KANTO TATSUYA)  
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
准教授  
研究者番号：80372613

平松 直樹 (HIRAMATSU NAOKI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：30362700

### (3) 連携研究者

なし