

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790720

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス特異的CD8 T細胞機能不全の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of dysfunctional HCV specific CD8 T cell during persistent HCV infection

研究代表者

石橋 由佳 (Ishibashi, Yuka)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60528305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：C型慢性肝炎患者のHCV特異的CD8 T細胞は、同一患者のEBVやinfluenza virus特異的CD8 T細胞と比較してPD-1, CTLA-4, LAG-3などの抑制性補助刺激分子の発現が高く一部の細胞は複数の抑制性補助刺激分子の共発現を認めた。特にHCVウイルス量が多いほど、複数の抑制性補助刺激分子の発現を認めた。興味深いことにPD-1陽性CD8 T細胞は陰性分画と比較して有意にTNFの産生が低くIL10産生が高い傾向にあり、上記の結果からHCV持続感染により一部のHCV特異的CD8 T細胞は抑制性補助刺激分子の発現を介して免疫寛容に陥っている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peripheral HCV specific CD8 T cells in patients with chronic HCV infections showed higher expressions of suppressive co-stimulation molecules such as PD-1, CTLA4, and LAG-3 compared with EBV or influenza specific CD8 T cells from the same individuals. HCV specific CD8 T cells in patients with higher viral load tended to express multiple suppressive co-stimulation molecules. Of interest, PD-1 positive HCV specific CD8 T cells produced higher TNF and lower IL-10 compared with PD-1 negative subsets. These results suggest that HCV specific CD8 T cells fall to be dysfunctional via the expression of multiple suppressive co-stimulation molecules during persistent HCV infection. Further study is needed to clarify the mechanism behind the immune tolerance in the liver and to overcome the HCV infection in humans.

研究分野：肝臓免疫

キーワード：C型肝炎ウイルス T細胞疲弊 獲得免疫

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(Hepatitis C virus; HCV)は高率に肝臓内で持続感染をきたすRNAウイルスであり、長い年月を経て慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌に進展する。HCV感染においてウイルスを特異的に認識し攻撃するHCV特異的CD8 T細胞が末梢血および肝臓内に存在するが、この細胞群の機能不全が持続感染、慢性化と関与することが知られている。抗原特異的エフェクターCD8 T細胞の機能低下を引き起こす要因として、HCV自身による変異、抗原提示細胞やヘルパーCD4 T細胞の機能不全やCD4+CD25+Foxp3+制御性T細胞の関与など様々な因子が考えられるが、近年T細胞の疲弊(以下 exhaustion)がその一因として報告されている。図1に示すとおり、CD8 T細胞はMHC/T細胞受容体を介して抗原提示を受け、B7/CD28を代表とする活性化補助シグナルの働きによりIFN- γ 、TNF- α などのTh1サイトカインやPerforin, Granzymeなどの傷害顆粒を産生するエフェクター機能を獲得し、自らも増殖しウイルスの排除に重要な役割を果たす。この時点でウイルスの排除に成功すると抗原特異的T細胞は記憶細胞となる一方で、ウイルスの増殖能力が勝ると徐々にエフェクター機能を失いこの現象をT細胞のexhaustionと呼ぶ。Programmed cell death-1(PD-1)/PD-ligandをはじめとする抑制性補助シグナルのexhaustionへの関与が様々な病態において報告されており、抗原特異的CD8 T細胞の機能低下を引き起こす要因として注目されている。近年抗ウイルス療法の進歩は目覚ましいが、Genotype 1b, 高ウイルス量の難治例に対するPegylated IFNとリバビリン併用療法による奏率は50%程度にすぎず、宿主側因子をターゲットとした新規免疫療法はC型肝炎に対する新たな治療法となりうる。一方、肝細胞癌においてAFP, NY-ESO-1, glypican-3をはじめとする腫瘍抗原を特異的に認識、攻撃する腫瘍抗原特異的T細胞の存在が知られている。前立腺癌やメラノーマをはじめとする種々の癌において腫瘍抗原特異的T細胞の機能不全と腫瘍悪性度の関与が報告されている。肝細胞癌においても腫瘍内浸潤リンパ球中の制御性T細胞の

頻度と悪性度の相関などの報告はあるが、exhaustionを介した機能不全の関連については一定の見解が得られていない。ラジオ波焼灼術をはじめとする早期肝癌に対する治療の進歩は目覚ましい一方で、進行肝癌に対する効果的な治療法は少なく、腫瘍免疫を介した新たな治療戦略の開発が早急に望まれる。2006年にマウスLCMV感染モデルにおいてはじめてPD-1のexhaustionにおける関与が報告された(Barber et.al. Nature 2006)。PD-1はCD28 familyの抑制性補助シグナル受容体の一つであり、慢性LCMV感染において機能不全に陥った抗原特異的CD8 T細胞のPD-1発現が亢進していることが示された。さらにPD-ligand(PD-L)抗体によるPD-L/PD-1シグナルの阻害により機能不全が少なくとも部分的に回復し、その結果LCMVウイルス量の低下が認められた。また同じくマウスLCMV感染モデルにおいて、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析の結果、疲弊した抗原特異的T細胞は、エフェクター細胞や記憶細胞と比較し、有意に複数の抑制性補助シグナル受容体の発現が亢進していることが示された。これらの経緯をもとに研究協力者である中本のグループはヒト慢性HCV感染におけるPD-L/PD-1シグナルのHCV特異的CD8 T細胞機能不全への関与に着目し同様の結果を示した(Nakamoto et.al. Gastroenterology 2008)。中本らはまず、慢性C型肝炎患者のHCV特異的CD8 T細胞においてPD-1の発現が他の非HCV特異的CD8 T細胞(CMV, EBV, influenza; 以下Flu)と比較し亢進しており、PD-1発現はエフェクター機能と逆相関していることを示した。重要なことに、末梢血HCV特異的CD8 T細胞はPD-1/PD-Lシグナルの阻害によりエフェクター機能の回復が得られた一方で、PD-1をさらに高発現した肝内HCV特異的CD8 T細胞はさらにエフェクター機能が低下しており、同シグナルの阻害後も機能回復は認められないことを(図2)複数の検体の比較で確認した。以上の結果よりHCV特異的CD8 T細胞(特に肝内浸潤リンパ球)のexhaustionにはPD-L/PD-1シグナルのみならず、他の負の制御経路の関与が示唆された。さらにその後の

検討において肝内浸潤 HCV 特異的 CD8 T 細胞は別の補助シグナルである Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) の発現亢進を認め、両シグナルの阻害により相乗的にエフェクター機能の回復が得られた (Nakamoto et.al. PLoS Pathog 2009)。一方で両経路の阻害後もエフェクター機能を有する HCV 特異的 CD8 T 細胞は全体の 30% 前後にすぎず、近年報告されている LAG-3, Tim-3 など両シグナル以外の複数の経路が関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

肝臓は肝動脈と門脈の両血管からの血流を受ける特殊な解剖学的特徴を有し、このため常に消化管由来の抗原提示を受ける。さらに 1) HBV, HCV, マラリアなどの病原体が持続感染する、2) 肝移植において、腎移植、骨髄移植と比較しドナー・レシピエント間の完全な血液型の一致がなくても移植が成立する、3) melanoma をはじめとする免疫系の関与が深い腫瘍が転移しやすい、などの事実から推測されるとおり、肝臓は免疫寛容な臓器の一つである。肝臓が免疫寛容である要因として様々な機序が報告されているが、今回我々は PD-1 をはじめとする抑制性補助シグナルと肝内浸潤リンパ球機能不全 (寛容) の関与を明らかにしたいと考えている。この点において、末梢血と肝臓の比較検討は独創的かつ重要であり、human の研究においては一般的に肝組織の取得は容易でないが、倫理委員会の規則のもと当院外科移植班と連携し本研究を遂行したいと考えている。本研究の成果は C 型慢性肝疾患、肝細胞癌に対する新規免疫療法の確立のみならず、肝臓の免疫寛容の機序を解明する足がかりになると考えている。

3. 研究の方法

(1)慢性 C 型肝炎患者における検討

末梢血および肝組織からのリンパ球の単離

T 細胞上の活性化および抑制性補助シグナル分子の発現の検討

HCV 特異的 CD8 T 細胞のエフェクター機能の解析

抗ウイルス療法中の HCV 特異的 CD8 T 細胞機能の経時的変化と補助シグナル阻害による機能修飾

(2)急性腸炎-急性肝炎モデルマウスを用いた基礎的検討

マウス急性肝障害モデルを用いて腸肝相関の観点から肝臓特有の免疫寛容誘導機序の解明を行う。具体的には、Dextran sulfate sodium (DSS) 惹起腸炎の存在下に、引き続き急性肝障害を惹起する Concanavalin A (ConA) を静脈的に投与し、腸肝相関の観点から、腸内の炎症、および腸内細菌叢の変化が肝臓内免疫応答・免疫寛容に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1)慢性 C 型肝炎患者における検討

末梢血、肝内非癌部および肝内癌部浸潤肝細胞癌特異的 CD8 T 細胞の解析は HLA A24 患者の NS3 1073, 1406, 2594 領域の Class 1 tetramer を用いた。既報どおり、C 型慢性肝炎患者の HCV 特異的 CD8 T 細胞は、同一患者の EBV や influenza virus 特異的 CD8 T 細胞と比較して PD-1, CTLA-4, LAG-3 などの抑制性補助刺激分子の発現が高く一部の細胞は複数の抑制性補助刺激分子の共発現を認めた。特に HCV ウイルス量が多いほど、複数の抑制性補助刺激分子の発現を認めた。非常に興味深いことに PD-1 陽性 CD8 T 細胞は陰性分画と比較して有意に TNF の産生が低く IL10 産生が高い傾向にあり、上記の結果から HCV 持続感染により一部の HCV 特異的 CD8 T 細胞は抑制性補助刺激分子の発現を介して免疫寛容に陥っている可能性が示唆された。

Genotype 1b、高ウイルス量の難治症例における抗ウイルス療法中の末梢血 HCV 特異的 CD8 T 細胞の発現頻度、エフェクター機能を投与前、1W, 2W, 4W, 8W~48W まで経時的に検討し治療効果との相関を検証した。その結果抗ウイルス療法により HCV ウイルス量が低下すると、in vitro の aPD-L1 投与により HCV 特異的 CD8 T 細胞のエフェクター機能の著明な改善が認められた。さらに直接作用型抗ウイルス製剤 (DAA 製剤) である Daclatasvir/Asunaprevir (DCV/ASV) 治療を

行った HCV genotype 1 の持続感染症例を対象に、direct sequence 法を用いて NS3/NS5A 領域のアミノ酸変異を測定し、同時に flowcytometry を用いて末梢血単核球を分析して、ウイルス排除に関わる NK 細胞、NKT 細胞、および HCV 特異的 CD8 T 細胞をはじめとする宿主免疫応答と治療前 resistance associated variant (RAV) の存在との関連を検証した。治療前の NS3 RAV (T54S, Q80R, A156S, D168E/V) は 8%、NS5A RAV L31M は 2%、Y93H は 15% の症例に存在していた。Y93H 変異の有無別に宿主背景を検討した結果、年齢・性別・IFN 治療の既往・肝線維化の程度に有意さを認めなかったが、Y93H 変異の存在症例は非存在症例と比較して HCV RNA 量が高い傾向を認めた。さらに Y93H 変異の存在例ではウイルス駆除に関わる IFN-g 産生に関する NK 細胞や NKT 細胞、CD8 T 細胞の NKG2D 発現が有意に高く、これらの結果から HCV 持続感染、およびその排除にウイルス側因子と宿主側因子が密接に寄与する可能性が示唆された。

(2) 急性腸炎-急性肝炎モデルマウスを用いた基礎的検討

DSS-Con A 群において、Water-Con A 群と比較して血清学的、および組織学的に有意な肝障害の軽減が認められた。Water-Con A 群において TNF 産生性 CCR9 陽性マクロファージが肝臓内に増加しているのに対し、DSS-Con A 群では IL-10 産生性 CCR9 陰性マクロファージの増加、CD8 T 細胞の機能低下を認めた。さらに DSS-Con A 群において著明な腸管透過性の亢進を認め、同モデルの門脈血由来血清の前投与により Con A 肝障害の軽減が認められ、腸管由来微生物、およびその代謝産物の暴露が肝臓内免疫寛容に寄与する可能性が考えられた。興味深いことに存在する腸炎とその後誘導される肝障害の程度は逆相関する傾向が認められ、ヒト HCV 感染における結果と同様に肝臓内の過度の炎症を回避するために免疫応答・免疫寛容のバランスが制御されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Chu PS, Ebinuma H, Nakamoto N, Sugiyama K, Usui S, Wakayama Y, Taniki N, Yamagichi A, Shiba S, Yamagishi Y, Wakita T, Hibi T, Saito H, Kanai T. Genotype-associated Differential NKG2D Expression on CD56+CD3+ Lymphocytes Predicts Response to Pegylated-Interferon/Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. **PLoS One** 10(5): e0125664, 2015 査読有
2. Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu PS, Usui S, Ishibashi Y, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Saito Y, Fukasawa M, Saito K, Yamagishi Y, Wakita T, Takaku H, Hibi T, Saito H, Kanai T. Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus. **PLoS One** 9(4): e94460, 2014 (IF=3.534) 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
石橋 由佳 (Yuka Ishibashi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・助教
研究者番号: 60528305

(2) 研究分担者 該当者なし

(3) 連携研究者 該当者なし

(4) 研究協力者
中本 伸宏 (Nobuhiro Nakamoto)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・専任講師
研究者番号: 40383749