

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 岡本将明

学位論文題名

C型肝炎ウイルス感染におけるウイルス RNA 認識経路を介した生体応答の解析
(Analysis of biological response via viral RNA sensing pathway in HCV infection)

[背景と目的]

C型肝炎ウイルス(HCV)はフラビウイルス科に属し、+鎖 RNA をゲノムに持ち、ヒトの肝がんの最大要因である。肝がん患者の HCV 陽性割合は7割を超えており、HCV に対する免疫応答機構を明らかにすることは社会への大きな貢献が見込まれる。ウイルス感染では、パターン認識受容体からのシグナル伝達により、I 型 IFN 産生に代表される自然免疫系の活性化が起き、これが初期の免疫応答を担う。自然免疫系の活性化はその後の獲得免疫の起動にも必須であり、感染防御に非常に重要である。HCV 感染時には、エンドソーム上の TLR3 や細胞質内の RIG-I がウイルス RNA を認識し、TLR3 はアダプター分子 TICAM-1 (TRIF) を、RIG-I は IPS-1 (MAVS/VISA) を介して I 型 IFN やその他のサイトカイン産生を誘導する。IFN ファミリーのひとつである III 型 IFN のうち、IFN- λ 3 (IL28B) 遺伝子上流の多型は、HCV 感染患者に主流の IFN 治療成績との関連が明らかになっており、注目を集めるサイトカインだが、生体内での III 型 IFN 産生機構と作用機序は十分に分かっていない。

本研究では HCV 感染時の生体内での III 型 IFN 産生機構を解明する為、TICAM-1 KO マウス及び IPS-1 KO マウスを用いて、HCV RNA に対する III 型 IFN 産生経路の探索を行った。

また、III 型 IFN の受容体を発現する細胞は局限されているが、本研究において CD8 陽性樹状細胞 (CD8(+)) DC に III 型 IFN 受容体の発現が確認された。CD8(+)) DC は I 型 IFN 依存的に外来抗原を細胞障害性 T 細胞 (CTL) に抗原提示すること (クロスプレゼンテーション)、ナチュラルキラー細胞 (NK) の活性化を引き起こすことが知られており、これらの細胞間の働きが III 型 IFN を介して誘導されるか検討した。

[方法・結果・考察]

はじめにマウス生体内での HCV RNA に対する III 型 IFN 誘導経路を調べた。マウス肝臓へ核酸を導入するハイドロダイナミックインジェクション (HDI) 法を用いて、生体内で HCV RNA に対して RIG-I-IPS-1 経路で I 型 IFN 産生が誘導されることを示した報告がある。これに倣い HCV RNA を HDI 法によりマウス肝臓へ導入し、肝臓での III 型 IFN 誘導を調べると、IPS-1 依存的に III 型 IFN 発現が誘導された。生体内での IPS-1 依存的な III 型 IFN 誘導についてはこれまで報告がなかったが、これにより、生体内での IPS-1 依存的な III 型 IFN 誘導経路の存在が示された。また、マウス肝臓より肝実質細胞を単離し、Lipofectamine2000 を用いて HCV RNA による細胞内刺激を

加えると IPS-1 依存的に III 型 IFN が誘導された。

ヒト BDCA3 陽性樹状細胞 (BDCA3 (+) DC) が HCV に対して TLR3 依存的に、III 型 IFN を産生することが報告されている。また HCV 感染患者の DC 中に HCV 由来の RNA やタンパクが検出される症例報告がある。そこでヒト BDCA3 (+) DC のカウンターパートであるマウス CD8 (+) DC での HCV に対する III 型 IFN 誘導経路を調べた。CD8 (+) DC は古典的樹状細胞 (cDC) のサブセットであり cDC サブセットは他に CD4 (+) DC と CD4 (-) CD8 (-) DC (DNDC) がある。マウス脾臓より CD8 (+) DC、CD4 (+) DC、DNDC を単離し、HCV RNA による細胞質内刺激を加えた所、CD8 (+) DC で IPS-1 依存的な高い III 型 IFN 誘導がみられた。

一方、全長 HCV レプリコンを有する肝臓由来細胞株 Ocell と CD8 (+) DC を共培養すると、CD8 (+) DC による III 型 IFN の産生は TICAM-1 依存的であった。近年、HCV 感染肝細胞から HCV RNA 断片を含むエクソソームが放出され、樹状細胞に取り込まれることが明らかにされており、本実験系では、Ocell より放出された HCV RNA を含むエクソソームを CD8 (+) DC が取り込み、エンドソーム上の TLR3 が HCV RNA を認識し、TLR3-TICAM-1 経路依存的な III 型 IFN 産生が生じたと考えられる。

次に、CD8 (+) DC に III 型 IFN の受容体である IL28RA 及び IL10RB が発現していたことから、I 型 IFN 依存的に働く CD8 (+) DC の機能 (クロスプレゼンテーション、NK 活性化) が III 型 IFN により誘導されるか検討した。OVA と IFN- λ 3 をマウスに投与し、マウス脾臓中の OVA 特異的 CTL を FACS により測定したが、IFN- λ 3 投与による OVA 特異的 CTL の増加は観察されなかった。また、IFN- λ 3 存在下での CD8 (+) DC と NK の共培養においても、NK 細胞活性化マーカー CD69 の発現増加、IFN- γ の産生はみられなかった。

一方、CD8 (+) DC は IFN- λ 3 による刺激を加えることで、細胞質内 RNA 認識受容体 RIG-I の発現上昇が観察された。そこで、CD8 (+) DC を IFN- λ 3 で前処置した後、HCV RNA による細胞質内刺激を施したところ、RIG-I-IPS-1 経路依存的な III 型 IFN 誘導が増強された。これらの結果は肝実質細胞でも観察された。また、肝細胞で、抗 HCV に働く細胞質内タンパク (ISG20、RNAseL) の遺伝子発現が IFN- λ 3 により誘導された。

[結論]

以上の結果から、HCV 感染下では肝細胞や CD8 (+) DC は細胞質内の HCV RNA に対し、RIG-I-IPS-1 経路依存的に III 型 IFN 産生を誘導すること、また CD8 (+) DC は HCV 感染肝細胞から放出される HCV RNA を含むエクソソームを介して、TLR3-TICAM-1 経路を活性化することで HCV 非感染下においても III 型 IFN 産生を誘導できることが示唆された。

また、III 型 IFN は I 型 IFN とは異なり、CD8 (+) DC による CTL や NK の活性化などの細胞生免疫機構の促進はしないが、感染時、RIG-I-IPS-1 経路を介した III 型 IFN 産生誘導の positive feedback により、自然免疫系の働きを増強することが示唆された。