



Title	Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin
Author(s)	貝森, 亜紀
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45545
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	かいもり さとう あ き 貝森 (佐藤) 亜 紀
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 18940 号
学位授与年月日	平成 16 年 6 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科先端応用医学専攻
学位論文名	Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin (シュード C 型肝炎ウイルスは未熟ミエロイド系樹状細胞に侵入しその侵入にはレクチンが関与する)
論文審査委員	(主査) 教授 林 紀夫 (副査) 教授 門田 守人 教授 宮坂 昌之

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示細胞であり、ウイルスに対する免疫反応の賦活や調節を行っている。また DC には機能的に異なるサブセットとして myeloid DC (MDC)、plasmacytoid DC (PDC) が存在する。C 型肝炎患者において末梢血中の MDC、PDC の減少と機能低下が、持続感染の成立や肝障害の病態に深く関与していることが示唆されている。その機序として HCV の DC への感染が想定されるが、各サブセットへの tropism を含め詳細は明らかでない。今回我々は、HCV の E1E2 蛋白を介した細胞へのウイルス侵入を評価できる pseudo-HCV を用いて DC サブセットへの感染の有無を明らかにする事、また DC を HCV の感染から防御する方法を明らかにする事を目的とした。

〔方 法〕

pseudo-HCV は、HCV の E1E2 を envelope とし Vesicular stomatitis virus (VSV) の遺伝子に GFP がレポーターとして組み込まれており細胞に侵入すると蛍光を発する (阪大微研松浦教授からの供与)。Healthy donor の血液よりそれぞれ CD14, BDCA-1, BDCA-4 の磁気抗体を用いて分離した単球、MDC 前駆細胞 (pre-MDC)、PDC 前駆細胞 (pre-PDC)、またそれぞれにサイトカインを用いて誘導した MDC、PDC に pseudo-HCV を添加し 24 時間後、蛍光顕微鏡と FACS にて細胞への侵入を評価した。臍帯血より分離した CD34 陽性細胞、肝癌細胞株 (HepG2) にも同様の検討を行った。またサイトカインを用いて誘導した MDC、PDC に HCV 患者の血清を添加し、24 時間後に Real time PCR 法を用いた HCV-RNA 定量評価及び strand specific RT-PCR 法を用いた negative-strand の検出を行った。

〔成 績〕

pseudo-HCV は単球、pre-MDC、CD34 陽性細胞に侵入しなかった [% of GFP+cells < 0.5%]。HepG2 には、高率に侵入した [% of GFP+cells 84.6%]。サイトカインを用いた MDC のうち GM-CSF のみで誘導した MDC は GM-CSF+IL-4 で誘導した MDC より高い侵入率を認めた。PDC にはウイルス侵入は認めなかった [% of GFP+cells, mean; MDC/GM-CSF, MDC/GM+IL-4, PDC; 28.8%, 3.82%, 0.14%, n=3]。これら 3 種の細胞に HCV 患者血清

を添加後、HCV-RNA の定量評価を行った実験においても、GM-CSF 誘導 MDC に高い HCV-RNA titer を認めた。また同じく strand-specific RT-PCR 法を用いた実験では HCV-RNA の複製中間体である negative strand RNA は GM-CSF 誘導 MDC で検出されたが、PDC には検出されなかった。

GM-CSF 誘導 MDC への pseudo-HCV の感染防御を目的として、種々のサイトカインや免疫調節物質をウイルス添加前に加えると、DC を成熟させる作用のある CpG oligodeoxynucleotide、CD40 ligand (CD40L) 処理群で侵入はそれぞれ約 5%、10% に抑制された。また最近 human immunodeficiency virus や結核菌の細胞への感染に関与していると報告されている DC-SIGN を初めとした C-type lectin の pseudo-HCV 細胞侵入への関わりを検討するため、mannan、EDTA、DC-SIGN 抗体をウイルス添加前に加えた。すると、ウイルス侵入は mannan により抑制されたが EDTA、DC-SIGN 抗体では抑制されなかった。一方、HepG2 においては、mannan によるウイルス侵入抑制効果は認めなかった。

〔総括〕

pseudo-HCV は未熟な MDC に選択的に侵入し、PDC には侵入を認めなかった。これは C 型肝炎患者由来の HCV を用いた感染実験の結果と一致した。また CpG oligodeoxynucleotide、CD40L などの成熟刺激により、MDC を HCV 感染から守ることができる可能性が示された。HCV の DC への感染には lectin が Ca 非依存性に関与し、その機序は肝癌細胞株とは異なる事が示唆された。pseudo-HCV system は感染の初期段階であるウイルス侵入を評価する非常に有用な系である。

論文審査の結果の要旨

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染の慢性化の原因の一つに不十分な細胞性免疫が指摘されている。C 型慢性肝炎患者の樹状細胞 (DC) の機能は低下しているという報告があり、この機序として DC への HCV の直接の感染が想定される。本研究の目的は、HCV の envelope 蛋白を有した Pseudo-HCV を DC に感染させる事により 1) HCV は DC のどのサブセットに感染するかを明らかにする事、2) HCV から DC を防御する方法を明らかにする事である。本研究により DC の 2 つのサブセットのうち myeloid DC (MDC) に HCV に対する感受性がある事が明らかになった。また MDC を感染より防御するには、IL-4、CpG oligo 2006、CD40 Ligand で DC を成熟させる事が有効であると判明した。これらの結果は今後抗 HCV 免疫応答賦活化による治療や、HCV 感染の責任分子の同定のために有益な知見となるため、学位論文に値すると考える。