

Title	Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I
Author(s)	宮崎, 昌典
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48932">https://hdl.handle.net/11094/48932</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	宮崎昌典
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 21871 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-1 (C 型慢性肝炎感染患者由来ミエロイド樹状細胞における Toll 様受容体及び RIG-I の高発現とサイトカイン産生阻害)
論文審査委員	(主査) 教授 林 紀夫 (副査) 教授 川瀬 一郎 教授 松浦 善治

### 論文内容の要旨

#### [ 目 的 ]

C 型慢性肝炎において樹状細胞 (Dendritic cell, DC) の数的減少と機能低下が病態に関与することが報告されている。DC にはウイルス構成成分などを認識し I 型 IFN や炎症性サイトカインを誘導する Toll 様受容体 (TLR) や、TLR 非依存的にウイルスを認識し IFN を誘導する RIG-I、MDA-5 が発現しており、免疫の活性化に関与している。HCV 感染においても DC の TLR/RIG-I 発現と機能が重要な役割を担っていると考えられる。肝癌細胞を用いた HCV レプリコンの系では NS3/4A 蛋白が TLR3/RIG-I の経路を阻害することが報告されており、HCV による先天免疫系の抑制と持続感染との関連が示唆されている。本研究では C 型慢性肝炎の病態におけるミエロイド DC (MDC) の TLR/RIG-I の意義を明らかにするために、その発現と機能を非感染者と比較検討した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

39 名の C 型慢性肝炎患者 (CH) (内訳: 男性 22 名、女性 17 名、平均年齢  $53.4 \pm 10.3$  歳、平均血清 ALT 値  $93.9 \pm 51.0$  IU/l、全て HCV serotype1、血清 HCV ウイルス量  $1637 \pm 402$  KIU/ml) と非感染者 (HV) の PBMC より磁気抗体を用いて MDC を分離した。まず、TLR2、3、4 及び RIG-I、MDA-5 の mRNA レベルでの発現を Real-Time PCR を用いて定量したところ、CH 群において、TLR2、TLR4、RIG-I の発現は HV 群に比べ高値であったが、TLR3、MDA-5 の発現は両群で差を認めなかった。各 TLR、RIG-I の発現量と血清 ALT 値、血清ウイルス量には相関を認めず、各受容体発現が HCV 感染の結果もたらされた HCV 関連の蛋白、各種サイトカインによる亢進の可能性を考え、HCV 蛋白 (コア、NS3、NS4、NS5) や様々なサイトカインを非感染者 MDC に添加し、TLR 及び RIG-I の誘導を検討した。RIG-I は IFN $\alpha$  と PolyI : C で強く誘導され、TLR3 は IFN $\alpha$  で誘導されたが、いずれも TNF $\alpha$ 、PGE2 などの炎症性サイトカインや HCV 蛋白では誘導されなかった。DC の機能解析として、各 TLR 特異的リガンド (TLR2 リガンド: Pam3CSK4、TLR3/RIG-I リガンド: PolyI : C、TLR4 リガンド: LPS) を用いて MDC を刺激し IFN $\beta$ 、TNF $\alpha$  の誘導を Real-time PCR 法にて、IFN $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、IL-12、IL-6 の産生を ELISA にて定量した。結果、PolyI : C 及び LPS 刺激による IFN $\beta$ 、TNF $\alpha$  の誘導は CH 群で著明に低値であり、蛋白レベルでの解析において同刺激に

よる TNF- $\alpha$ 、IL-12 の発現においても CH 群で著明に低下していた。この抑制機序を解析するために、TLR/RIG-I 経路の抑制分子 (IRAK-M, A20) の誘導を、Real-Time PCR を用いて定量したが、抑制因子 IRAK-M、A20 の発現は CH 群で低値でありサイトカイン誘導能の低下の原因とは言えなかった。最後に TLR/RIG-I 経路に必須のアダプター分子 (MyD88, TRIF, IPS-1) の発現を mRNA レベルで定量解析したところ MyD88、IPS-1 は CH 群で高発現していたが、TRIF 及び TRAF6 の発現は低下していた。

[ 総 括 ]

C 型慢性肝炎患者の MDC では TLR2、TLR4、RIG-I の発現は亢進しており、その機序として炎症ではなく HCV 複製中間体 (PolyI : C) や感染に伴う内因性 IFN が関与する可能性が示唆された。これらレセプターのシグナル経路の下流におけるアダプター分子の発現は TLR/RIG-I の発現と同様に増強していた。しかし、各リガンド刺激による IFN $\beta$ 、TNF $\alpha$  誘導が低下しており、サイトカイン産生能の低下が認められた。以上より、アダプター分子より下流での、IRAK-M、A20 とは異なるシグナル抑制因子の存在が示唆され、TLR/RIG-I 経路が抑制されることが HCV の持続感染に寄与する可能性がある。特に TLR3 経路においては HCV 感染による TLR3-TRIF-TRAF6 への干渉が考えられ、MDC 機能を賦活するための治療標的になる可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

樹状細胞 (DC) はウイルス構成成分を認識する Toll 様受容体 (TLR) や RIG-I、を発現しており、I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生を介して免疫系を活性化させる。HCV NS3/4A 蛋白が TLR3/RIG-I の経路を阻害することが報告されており、HCV による先天免疫系の抑制と持続感染との関連が示唆されている。本研究では C 型慢性肝炎患者のミエロイド DC (MDC) に注目し、TLR/RIG-I 経路のサイトカイン誘導を非感染者の MDC と比較検討し、治療介入の可能性を検討した。肝炎群 MDC において TLR2、TLR4、RIG-I の発現は有意に高値であったが、TLR3 は両群で差を認めなかった。リガンド刺激による MDC の IFN $\beta$ 、TNF $\alpha$ 、IL-12 の誘導は肝炎群で著明に低値であった。特に TLR3、TLR4 経路に不可欠な TRIF と TRAF6 は肝炎群で低発現であり、HCV 感染においてこれらのシグナル経路の抑制が認められた。NS3 プロテアーゼ阻害剤を使用し、このシグナル抑制を解除することで、サイトカイン誘導能が回復した。本研究において HCV 持続感染の一因が TLR および RIG-I のシグナル経路の抑制が示唆され、臨床的にも有意義であり、学位の授与に値すると考えられる。