

189. HCV 感染における自己免疫関連疾患発症機序の解析

近藤 泰輝

Key words : HCV, リンパ指向性, Th17, 自己免疫

東北大学病院 消化器内科

緒 言

C型肝炎ウイルス (HCV) に対する細胞性免疫反応, 液性免疫反応は慢性 C 型肝炎 (CH-C) から肝硬変, 肝細胞癌へと進行する病態において重要な役割を担っている. これらの免疫反応を阻害することで, HCV は宿主から排除されることを防いでいる一方で, 免疫反応が攪乱されることにより自己免疫疾患を発症する可能性がある. 実際 CH-C 患者における自己免疫疾患の有病率は他の慢性肝疾患患者と比較しても有意に高いことが報告されている. HCV は肝細胞指向性を有し, 基本的には肝細胞で複製増殖が起こる. 一方で, リンパ球をはじめ, 他の細胞内での複製の報告もあり, 我々も B 細胞, T 細胞内での複製について報告してきた¹⁻⁵⁾. リンパ球内で HCV の複製がおこると, 様々な機能異常が生じる. B 細胞内で複製がおこるとイムノグロブリンの変異が促進され自己抗体の産生が危惧される. また, T 細胞内で複製がおこると, STAT-1 シグナルの抑制により Th1 細胞への分化が阻害されることを報告してきた. 近年, 自己免疫疾患と深い関係がある T 細胞サブセットとして Th17 細胞が同定され注目を集めている. そこで, 我々は HCV 感染と自己免疫疾患, Th17 細胞の関係について解析を行うこととした.

方法および結果

1. CH-C 患者の自己免疫性疾患有病率と自己免疫マーカーの陽性率

250 名の CH-C 患者とそれ以外の慢性肝炎患者 (慢性 B 型肝炎患者 (CH-B) 62 名, 非アルコール性脂肪性肝炎患者 (NASH) 32 名) において自己免疫関連疾患の有病率と自己免疫関連検査陽性患者の頻度について比較した. 結果, CH-C 患者において自己免疫関連疾患の有意に高い有病率が確認された. また, クリオグロブリンの陽性率, 抗核抗体 (ANA) 陽性率は CH-C 患者において有意に高かった (図 1).

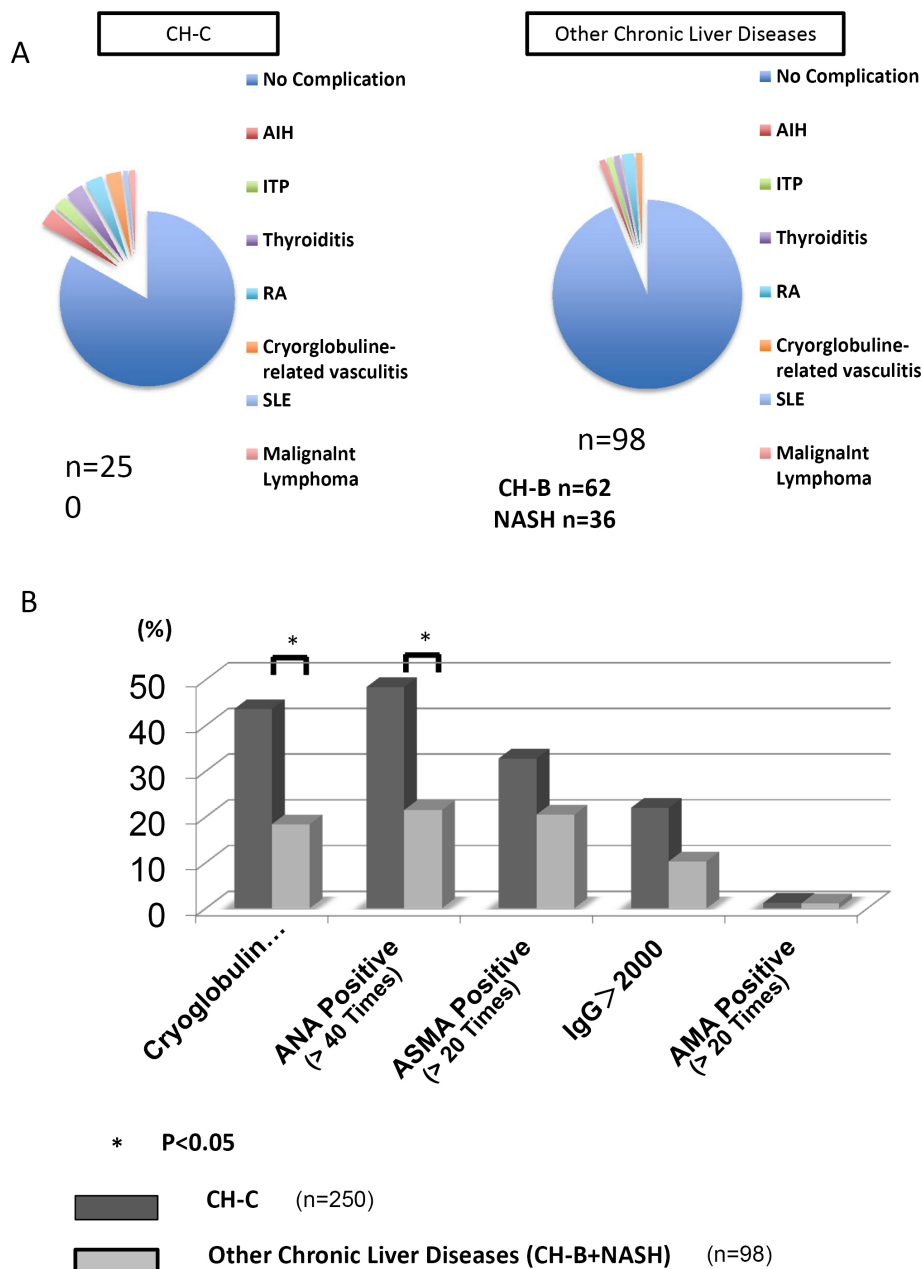


図1. 自己免疫関連疾患の有病率と自己免疫関連マーカー陽性率の比較.

CH-C とその他の肝疾患で各種肝外病変疾患の比較を行った. また自己免疫関連マーカーの比較を行った. 統計処理は χ^2 test を用いた.

2. 各種慢性肝疾患におけるサイトカイン測定

TGF- β 1, IL6, IL-1 β , IL17A, IL21, IL23 の定量を ELISA にて施行した. 各種肝疾患にて TGF- β 1 と IL6 の定量と比較を行った (図 2A). CH-C 患者では CH-B 患者や NASH 患者と比較して TGF- β 1 と IL6 が共に高い患者 (Double High と定義) が有意に高かった (図 2B). Double High 患者とそれ以外の CH-C 患者で抗核抗体とクリオグロブリンの陽性率を比較すると Double High 患者にて有意に陽性率が高かった (図 2C). IL-1 β , IL17A, IL21, IL23 の血清値も Double High 患者にて有意に高かった (図 2E).

IL6 と TGF- β 1 の mRNA 発現を PBMCs で測定したが, この結果も Double High 患者にて有意に高く, IL6 と TGF- β 1 の発現細胞が免疫細胞であることが想定された (図 2D).

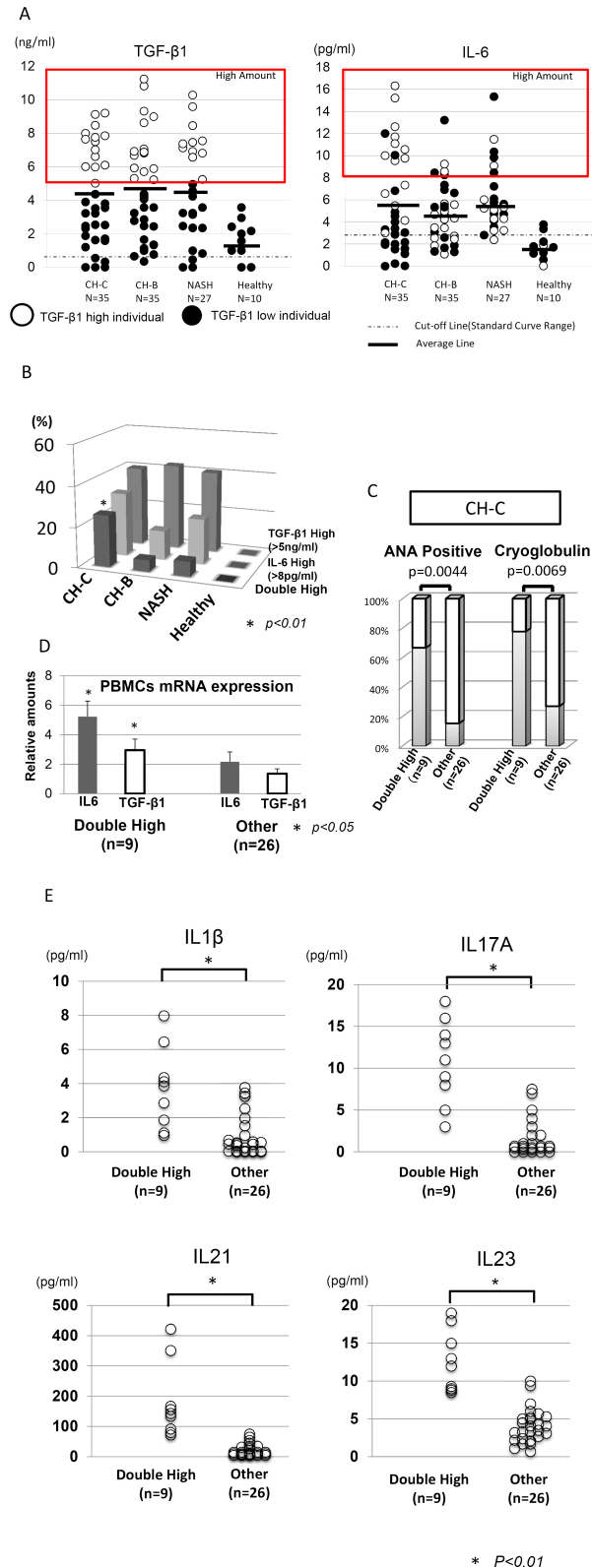


図2. クリオグロブリン陽性、抗核抗体陽性、Th17分化に影響を与えるサイトカイン環境の解析.

A, B) 各種肝疾患でサイトカインをELISAで測定した. C) 抗核抗体とクリオグロブリンの陽性率をDouble Highとそれ以外のCH-Cで比較した. D) PBMC内のIL6とTGF- β mRNAを測定した. E) Th17関連サイトカインをELISAにて測定した. 統計処理はB, Cで χ^2 testを, D, Eでindependent Student t testを用いた.

3. リンパ指向性 HCV-RNA の検出率の比較

次に Strand-specific nested PCR を用いて CD4⁺T 細胞内, CD19 陽性 B 細胞内の HCV-RNA の検出を行った。結果は positive strand, negative strand HCV-RNA とも Double High 患者にてそれ以外の CH-C 患者と比較して有意に高く検出された。

4. リンパ指向性 HCV の Th17 分化に与える影響

様々なサイトカイン環境下で naïve CD4⁺T 細胞にリンパ指向性 HCV を感染させて Th17 細胞分化にどのような影響を及ぼすかを Th17 cytokine secretion アッセイにて解析を行った。結果, リンパ指向性 HCV は Th17 分化誘導を有意に増強することが明らかとなった (図 3A)。次にトランスウェルシステムを用いて上層にリンパ指向性 HCV 感染 PBMCs, 下層に健常者の naïve T 細胞において IL6 と TGF- β 1 の中和抗体ありなしの環境下で Th17 細胞分化の検討を行った (図 3B)。結果, 上層にリンパ指向性 HCV 感染 PBMCs を置くことで下層の naïve T 細胞の Th17 細胞への分化が有意に増強され, この増強作用は IL6 と TGF- β 1 の中和抗体を置くことでブロックされることが分かった (図 3C)。

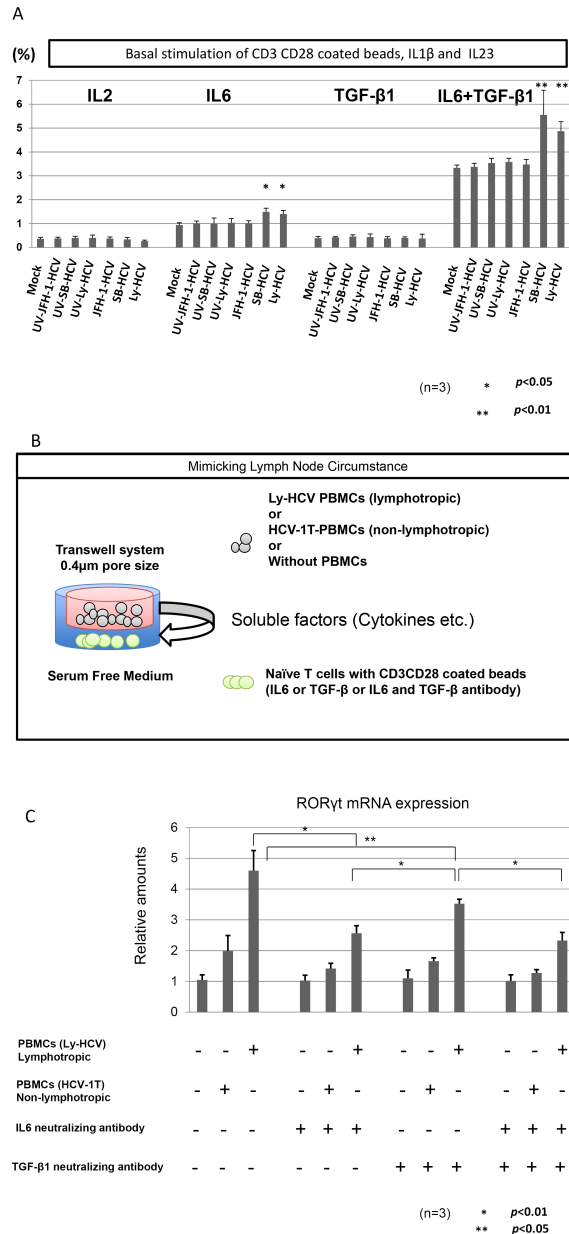


図 3. リンパ指向性 HCV の Th17 分化に与える影響.

A) 各種サイトカイン環境下でリンパ指向性 HCV の感染の有無で IL17 産生細胞頻度を解析した. B) トランスウェルを用いた実験の図. C) IL6 と TGF- β の中和抗体の有無, リンパ指向性 HCV の有無による ROR γ t mRNA の発現の比較. 統計処理は A, C で Mann-Whitney U test を用いた.

5. Th17 分化誘導に関わる HCV 責任蛋白の同定

naïve T 細胞に HCV のそれぞれの構成, 非構成蛋白 (E1, E2, Core, NS3, NS4B, NS5A, NS5B) 発現プラスミドをトランスフェクトし Th17 分化誘導に関わる責任蛋白の同定を行った. HCV-Core 蛋白を導入した細胞において, Th17 分化誘導が有意に増強した (図 4A). 次に STAT-1, STAT-3 のリン酸化に対する影響を検討した. HCV-Core を導入した細胞において STAT-1 リン酸化の抑制と STAT-3 リン酸化の亢進が確認された (図 4B). また, 長期発現系として HCV-Core 発現レンチウイルスを作成して解析を行ったが, 結果はプラスミドによる発現系と同様に Th17 分化誘導を有意に増強した (図 4C).

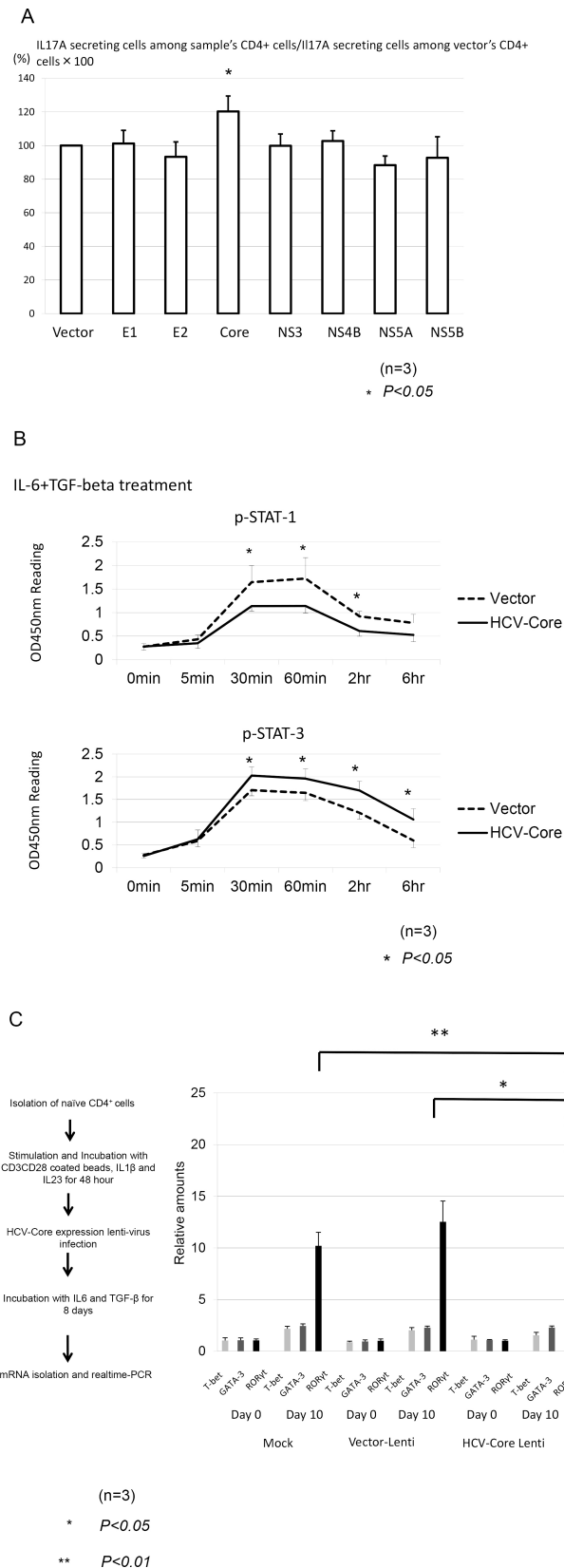


図 4. Th17 分化誘導に関わる HCV 責任蛋白の同定.

A) HCV 各種蛋白発現プラスミドを導入して Th17 細胞頻度を比較した. B) HCV-Core 蛋白導入の有無で STAT-1 と STAT-3 のリン酸化を比較した. C) HCV-Core 発現レンチウイルスを感染させ Th17 分化の検討を長期培養系にて確認した. 統計処理は A, B, C で Mann-Whitney U test を用いた.

考 察

多くの自己免疫疾患は HCV の関連疾患というだけでなく、Th17 細胞関連疾患として報告されている。この研究では、リンパ指向性 HCV が Th17 分化誘導を介して自己免疫疾患の病態に関わっていることを明らかにした^{6,7)}。Th17 分化誘導機序として二つの重要な事象が確認された。一つはリンパ指向性 HCV の存在により免疫担当細胞より IL6 と TGF- β 1 の発現が有意に高まる結果、Th17 分化誘導が増強するという事象であり、もう一つは、リンパ球内の HCV-Core 蛋白が STAT-3/ROR γ t シグナルを増強することにより Th17 分化誘導を増強するというものである。この中で HCV-Core の発現系はプラスミド発現系とレンチウイルス発現系を用いたがどちらの系においても Th17 分化誘導の増強が確認された。リンパ指向性 HCV の感染のみならず、エキソソーム分泌による HCV-Core の細胞間伝達の可能性もある。細胞間伝達は、エキソソームの濃度から全身的に起こるというよりは、複製局所でおこると考えられる。近年、インターフェロンを用いない経口剤のみで HCV の排除が可能となってきた。このことにより、今後、多くの自己免疫性疾患を持った HCV 患者が治療可能となってくる。これらの結果を詳細に解析することが自己免疫性疾患発症のメカニズムを探る上で必要である。

文 献

- 1) Kondo, Y., Sung, V., Machida, K., Liu, M. & Lai, M. M. : Hepatitis C virus infects T cells and affects interferon- γ signaling in T cell lines. *Virology*, **361** : 161-173, 2007.
- 2) Machida, K., Kondo, Y., Huang, J. Y., Chen, Y. C., Cheng, K. T., Keck, Z., Fong, S., Dubuisson, J., Sung, V. M. & Lai, M. M. : Hepatitis C virus (HCV)-induced immunoglobulin hypermutation reduces the affinity and neutralizing activities of antibodies against HCV envelope protein. *J. Virol.*, **82** : 6711-6720, 2008.
- 3) Kondo, Y., Machida, K., Liu, M., Ueno, Y., Kobayashi, K., Wakita, T., Shimosegawa, T. & Lai, M. M. : Hepatitis C virus infection of T cells inhibits proliferation and enhances FAS-mediated apoptosis of T cells by down-regulating CD44v6 expression. *J. Infect. Dis.*, **199** : 726-736, 2009.
- 4) Kondo, Y., Ueno, Y., Kakazu, E., Kobayashi, K., Shiina, M., Tamai, K., Machida, K., Inoue, J., Wakui, Y., Fukushima, K., Obara, N., Kimura, N. & Shimosegawa, T. : Lymphotropic HCV strain can infect human primary naïve CD4⁺ cells and affect their proliferation and IFN- γ secretion activity. *J. Gastroenterol.*, **46** : 232-241, 2011.
- 5) Kondo, Y. & Shimosegawa, T. : The direct effects of hepatitis C virus on the lymphoid cells. *World J. Gastroenterol.*, **19** : 7889-7895, 2013.
- 6) Kondo, Y., Iwata, T., Haga, T., Kimura, O., Ninomiya, M., Kakazu, E., Kogure, T., Morosawa, T., Aiba, S. & Shimosegawa, T. : Eradication of hepatitis C virus (HCV) could improve the immunological status and pyoderma gangrenosum-like lesion. *Hepatol. Res.*, **44** : 238-245, 2014.
- 7) Kondo, Y., Ninomiya, M., Kimura, O., Machida, K., Funayama, R., Nagashima, T., Kobayashi, K., Kakazu, E., Kato, T., Nakayama, K., Lai, M. M. & Shimosegawa, T. : HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PLoS One*, **9** : e98521, 2014.