



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	乙第1894号
学位記番号	論第1659号
氏名	五十川 正記
授与年月日	平成30年12月31日
学位論文の題名	<p>Intrahepatic Cross-Presentation and Hepatocellular Antigen Presentation Play Distinct Roles in the Induction of Hepatitis B Virus-Specific CD8+ T Cell Responses (肝臓内クロスプレゼンテーションと肝細胞抗原提示はHBV特異的CD8+ T細胞 応答の誘導において異なる役割を担う)</p> <p>Journal of Virology. Vol. 92 : Issue 21. 2018 Oct 12</p>
論文審査担当者	<p>主査： 山崎 小百合 副査： 大原 弘隆、田中 靖人</p>

論 文 内 容 の 要 旨

B型肝炎ウイルスは急性または慢性肝炎の原因となり、B型慢性肝炎の多くは肝硬変、さらには肝細胞癌へと進行する。HBVの排除には感染細胞を選択的に破壊することの出来る獲得免疫、特にHBV特異的CD8+T細胞応答が必要不可欠である。機能的なHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導が、B型慢性肝炎の治療に重要と考えられているが、そのようなT細胞応答がどのような機序で誘導されるのかは明らかにされていない。

我々は、HBV特異的T細胞受容体(TCR)を発現するTCRトランスジェニックマウス(TCR-Tgマウス)から単離したHBV特異的ナイーブCD8+T細胞を、肝臓内で活発にHBVを複製するHBVトランスジェニックマウス(HBV-Tgマウス)に養子移入することにより、HBV特異的ナイーブCD8+T細胞は肝臓内で抗原認識し、免疫寛容へと誘導されることを報告した。さらにこの免疫寛容は、HBV-Tgマウス中の樹状細胞(DCs)を抗CD40抗体(α CD40)で刺激することにより克服出来ることも明らかにした(Isogawa M, et al. PLOS Pathogen 2013)。しかしながら、内因性のHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導にDCsがどの程度重要なのかは検討していなかった。また、機能的なHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導がどの臓器で行われるのか、さらにその誘導にはどの細胞による抗原提示が重要なのかも不明であった。

本研究では、まず内因性の特異的CD8+T細胞応答の誘導に、DCsがどの程度関与しているのかを検討した。CD11cプロモーターの下流にジフテリアトキシン(DTX)受容体を発現するCD11c-D α OGマウスでは、DTXを投与することによりDCsが特異的に除去される。DTXを投与したCD11c-D α OGマウスもしくは野性型B6マウスに、HBV-DNAをハイドロダイナミックインジェクション(HDI)法で導入し、その際に認められるHBV特異的CD8+T細胞応答を解析した。強いHBV特異的CD8+T細胞応答が、DTXを投与したB6マウスで誘導されたのに対し、DTXを投与により樹状細胞を除去したCD11c-D α OGマウスでは誘導されなかった。この結果は、内因性のHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導にもDCsが必要であることを示唆している。

次に、このHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導が肝臓内もしくはリンパ組織内で行われるかを検討した。機能的なT細胞応答の誘導はリンパ節や脾臓などのリンパ組織で誘導されると考えられている。ナイーブT細胞のリンパ組織へのホーミングは、CD62Lに対する抗体(α CD62L:Me1-14)を投与することで阻害できる。そこで、脾摘を行なった野性型B6マウスを α CD62Lで処理し、HDI

法を用いて HBV 発現を肝臓内で誘導した。Sham surgery を施し、NaCl で処理したマウスをコントロール群として使用した。予想に反して、脾摘 + α CD62L 処理群とコントロール群で、HBV 特異的 CD8+T 細胞応答に違いは認められなかった。同様の結果は、HBV-Tg マウスに HBV 特異的 TCR-Tg T 細胞を養子移入する系でも確認された。以上の結果は、機能的な HBV 特異的 CD8+T 細胞応答の誘導に、リンパ組織へのホーミングは必要でないことを示唆している。

最後に機能的な HBV 特異的 CD8+T 細胞応答の誘導において、肝細胞による抗原提示と樹状細胞などの抗原提示細胞による抗原提示がどの程度寄与しているかを検討した。実質細胞と骨髄由来細胞の両方が抗原提示できるマウス、実質細胞のみが抗原提示細胞できるマウス、骨髄由来細胞のみが抗原提示できるマウスを骨髄移植により作成した。これらのマウスに HBV 特異的 TCR-Tg T 細胞を養子移入した後、HDI 法を用いて HBV 複製を誘導した。実質細胞のみが抗原提示できるマウスでは、実質細胞と骨髄由来細胞の両方が抗原提示出来るマウスに比べて、HBV 特異的 CD8+T 細胞の増殖がおよそ 4 分の 1 に減少した。興味深いことに、骨髄由来細胞のみが抗原提示できるマウスでは、HBV 特異的 CD8+T 細胞の増殖はおよそ 10 分の 1 まで減少した。類似の骨髄キメラマウスを HBV-Tg マウスを用いた作成した場合、HBV 特異的 CD8+T 細胞の増殖は、骨髄由来細胞のみが抗原提示できるマウスでさらに顕著に抑制された。この結果は HBV 特異的 CD8+T 細胞の増殖には実質細胞、すなわち肝細胞による抗原提示が DCs などの骨髄由来細胞による抗原提示よりも重要であることを示している。

以上の結果は HBV 特異的 CD8+T 細胞応答誘導における肝臓内での抗原認識の重要性を示すものであり、今後の B 型慢性肝炎に対する新しい免疫治療の開発に有益な情報であると考えられる。

(注) 和文で 2, 000 字以内でまとめる

論文審査の結果の要旨

B型肝炎ウイルスは急性または慢性肝炎の原因となり、B型慢性肝炎の多くは肝硬変、さらには肝細胞癌へと進行する。HBVの排除には感染細胞を選択的に破壊することの出来る獲得免疫、特にHBV特異的CD8+T細胞応答が必要不可欠である。本研究では機能的なHBV特異的CD8+T細胞応答が誘導される機序を検討した。

まずHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導に、DCsがどの程度関与しているのかを検討した。樹状細胞を除いたマウスもしくはコントロールマウスにハイドロダイナミックインジェクション(HDI)法を用いてHBVの複製を誘導し、その際に認められるHBV特異的CD8+T細胞応答を解析した。その結果、HBV特異的CD8+T細胞応答の誘導にDCsが必要であることが明らかとなった。

次に、HBV特異的CD8+T細胞応答の誘導が肝臓内もしくはリンパ組織内で行われるかを検討した。リンパ組織にHBV特異的T細胞が侵入しない環境をマウスで作り、肝臓内で複製するHBVに対する特異的CD8+T細胞応答を検討した。予想に反して、機能的なHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導に、T細胞がリンパ組織へ侵入する必要なく、肝臓がリンパ組織様の役割を果たすことが示唆された。

最後に機能的なHBV特異的CD8+T細胞応答の誘導において、肝細胞などの実質細胞と樹状細胞などの骨髄由来細胞による抗原提示がどの程度寄与しているかを検討した。実質細胞と骨髄由来細胞の両方が抗原提示できるマウス、実質細胞のみが抗原提示細胞できるマウス、骨髄由来細胞のみが抗原提示できるマウスを骨髄移植により作成した。実質細胞のみが抗原提示できるマウスでは、実質細胞と骨髄由来細胞の両方が抗原提示出来るマウスに比べて、HBV特異的CD8+T細胞の増殖が減少した。興味深いことに、骨髄由来細胞のみが抗原提示できるマウスでは、HBV特異的CD8+T細胞の増殖はさらに減少した。この結果からHBV特異的CD8+T細胞の増殖には実質細胞、すなわち肝細胞による抗原提示がDCsなどの骨髄由来細胞による抗原提示よりも重要であることが示唆された。

審査委員会では、主査の山崎教授より、HBV特異的CD8+T細胞応答誘導における樹状細胞の役割、CD40による樹状細胞の活性化の必要性、CD4+T細胞の役割や、HBV感染に対して自然免疫が活性化されない理由、B型急性肝炎の際にHBV特異的CD8+T細胞応答が誘導される機序、HBV特異的CD8+T細胞応答を活性化することによる肝障害の問題など8項目の質問があった。第一副査の大原教授より、B型慢性肝炎に対する免疫療法によって、過去のステロイドリバウンド療法でみられた様な劇症肝炎を誘発する危険性やその対応、マウスとヒトの免疫担当細胞の組成の違い、さらにはCD8+T細胞応答誘導における樹状細胞や肝臓の役割に関する今回の報告の新規性など、5項目の質問があった。第二副査の田中教授より、慢性化するウイルスの種類とそのメカニズムと問題点、cccDNAが残存していても通常はHBVの再活性化が起こらない理由、さらにはcccDNAが残存するメカニズムなど、専門領域に関する3項目の質問があった。本論文の著者はHBVに対する免疫応答を長年にわたり研究しており、これらの質問に対しても良好な回答が得られた。本研究は、今後B型慢性肝炎に対する新しい免疫治療のデザインに役立つ可能性があり、臨床的にも意義があると考えられた。よって本論文の著者には博士(医学)の学位を授与するに値すると判断した。

論文審査担当者 主査 山崎 小百合

副査 大原 弘隆、 田中 靖人