

## 原著 C型慢性肝炎患者治療中のナチュラルキラー細胞動態についての検討

著者	椎名 正明, 小林 光樹, 昆 吏規, 小林 智夫, 近藤 泰輝, 上野 義之, 下瀬川 徹
雑誌名	東北大学医学部保健学科紀要
巻	18
号	1
ページ	23-30
発行年	2009-01
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/44353">http://hdl.handle.net/10097/44353</a>

## C型慢性肝炎治療中のナチュラルキラー細胞動態についての検討

椎名正明<sup>1</sup>, 小林光樹<sup>2</sup>, 昆 更規<sup>2</sup>, 小林智夫<sup>3</sup>,  
近藤泰輝<sup>4</sup>, 上野義之<sup>4</sup>, 下瀬川 徹<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東北大学大学院医学系研究科 消化器病態学

<sup>2</sup>東北大学大学院医学系研究科 がん看護学

<sup>3</sup>東北労災病院 消化器科

<sup>4</sup>東北大学病院 消化器内科

## Analysis of the Dynamics of Natural Killer Cells in Chronic Hepatitis C Patients Receiving Anti-viral Treatment

Masaaki SHIINA<sup>1</sup>, Koju KOBAYASHI<sup>2</sup>, Satonori KON<sup>2</sup>, Tomoo KOBAYASHI<sup>3</sup>,  
Yasuteru KONDO<sup>4</sup>, Yoshiyuki UENO<sup>4</sup> and Tooru SHIMOSEGAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine*

<sup>2</sup>*Department of Oncology Nursing, Tohoku University Graduate School of Health Sciences*

<sup>3</sup>*Department of Gastroenterology, Tohoku Rosai Hospital*

<sup>4</sup>*Department of Gastroenterology, Tohoku University Hospital*

Key words: C型肝炎ウイルス, ナチュラルキラー細胞, インターフェロン, 免疫

[Background] Hepatitis C virus (HCV) is a major factor for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, while limited patients with persistent infection can clear HCV by the standardized interferon with ribavirin protocol. Both drugs are supposed to effect on host-immune responses during the treatment towards viral eradication. However, little is known about these responses including natural killer (NK) cells.

[Aim] Examine NK-related population and markers in patients' blood receiving anti-viral treatment and discuss the role of NK and its dynamics in the disease status.

[Method] Thirteen patients were enrolled and divided into two groups according to the subgroup of infected HCV, Group 1 and Group 2 respectively. Heparinized blood was taken from all patients in the chronic state, and Group 2 was further followed up during and after the 24-week treatment. NK cells and NKT cells were identified in peripheral blood mononuclear cells by the surface staining of CD56 and CD3. NKG2D was also stained and analyzed on flow cytometry.

[Results] Frequency of CD56<sup>bright</sup> NK sub-population was higher in Group 1 than in Group 2 and the control group, while that of total NK cells did not differ. Dynamics of NK populations showed the up-regulation of CD56<sup>bright</sup> NK around the end of treatment and subsequent decrease at the follow-up point. The expression of NKG2D showed no significant difference between the groups.

[Conclusion] The continuous admission of interferon and/or ribavirin changes the balance of NK sub-population that may relate to the immune activity in HCV infection.

## 背景と目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、血液や体液を介して伝播するRNAウイルスであり、ヒトの肝臓に感染すると、70-80%と高率に持続感染へと移行する。HCVの持続感染と、それによって引き起こされる、肝実質の炎症がC型慢性肝炎であり、近年、肝硬変・肝細胞癌の最大の原因となっている<sup>1)</sup>。C型慢性肝炎に対する治療としては、わが国では、1992年から、インターフェロンをもちいた、抗ウイルス療法が開始されており、以後、リバビリンの併用やインターフェロンのペグ化といった改良を経て、ペグインターフェロンとリバビリンの併用治療が、標準的治療として確立された。これにより、難治例といわれた症例においても、約半数の患者に、持続的ウイルス排除へ導くことができるようになった<sup>2)</sup>。一方で、治療の副作用や、治療無効例への対応は、不十分である。

インターフェロンやリバビリンは、HCVに対する特異的な治療薬ではなく、ウイルス排除過程には、様々な作用が関与していると推測される。インターフェロンには、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ などがあるが、肝炎治療に使用されているのは、I型インターフェロンに分類される、前2者である。ウイルスに感染した肝細胞など上皮細胞は、内因性I型インターフェロンを産生し、autocrine, paracrine的に作用して、抗ウイルスシグナルを誘導する。さらに、インターフェロンには、免疫賦活・調節作用があることも知られている<sup>3)</sup>。治療併用薬として使用されるリバビリンは、核酸アナログでありながら、単独でのHCV抑制効果は、認められていない<sup>4)</sup>。しかし、近年では、その免疫調節作用が注目されている。

ナチュラルキラー(NK)細胞は、リンパ球系の細胞集団である。感染に際しては、好中球やマクロファージに次いで誘導されるため、自然免疫や早期誘導免疫に分類される。NK細胞の役割は、正常な自己のMHCを有さない、感染細胞や腫瘍細胞を、認知して細胞傷害をもたらすことである。近年、マウス同様にヒトのNK細胞に亜分画が存在することが示された<sup>5,6)</sup>。また、NK細胞、T細胞

双方の表面マーカーをあわせもつ、NKT細胞の概念も注目を浴びている。これら、NK、NKT細胞は、末梢血に比して、有意に肝臓内に多く認められているが、その詳細な意義は解明されていない<sup>7)</sup>。

今回われわれは、C型慢性肝炎の標準治療に際して、得られた臨床検体をもちいて、NK細胞関連因子と、肝炎の病態、治療との関連について検討した。

## 方 法

対象は、C型慢性肝炎13例(男7例、女6例)であり、さらにHCV群別に、sero-group 1 (Gr1)とsero-group 2 (Gr2)に分類した。コントロールには、B型慢性肝炎(CHB)4例をもちいた。HCVの亜分類は、インターフェロン治療効果と密接な関わりがあり、genotype 1 (Gr1に相当)は日本人に多くみられるが、難治性である。一方、genotype 2 (Gr2に相当)は、治療感受性が高い。症例プロフィールは表1の通りである。すべての症例で、明らかな感染症や腫瘍性病変の存在は除外されている。また、本研究は開始前に、東北大学医学部倫理委員会の承認を得て、文書をもちいたインフォームド・コンセントを実施済みである。HCV感染の診断は、HCV RNAアンプリコア法(ロッシュ社)、群別判定は、血清EIA法にておこなった。

肝炎治療は、2007年現在における、わが国のコンセンサス・ガイドラインに沿い、体重換算によるペグインターフェロン $\alpha$ 2b (60-100  $\mu$ g/週)と、リバビリン(600-800 mg/日)の併用治療を、Gr1には48週間、Gr2に対しては24週間にわたって施行した。静脈血採血は全例、治療開始直前に施行した。また、Gr2症例は、治療開始後、4週、8週、12週、24週終了時と、終了後24週の時点を含めた、経時的な採血も施行した。採血後、Ficoll比重遠心法により、末梢血単核球(PBMC)を分離した。一部症例では、解析まで $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した。

遠心洗浄したPBMCを、 $1 \times 10^6$  cells/mlの濃度で染色バッファー(0.1%ウシ血清アルブミン

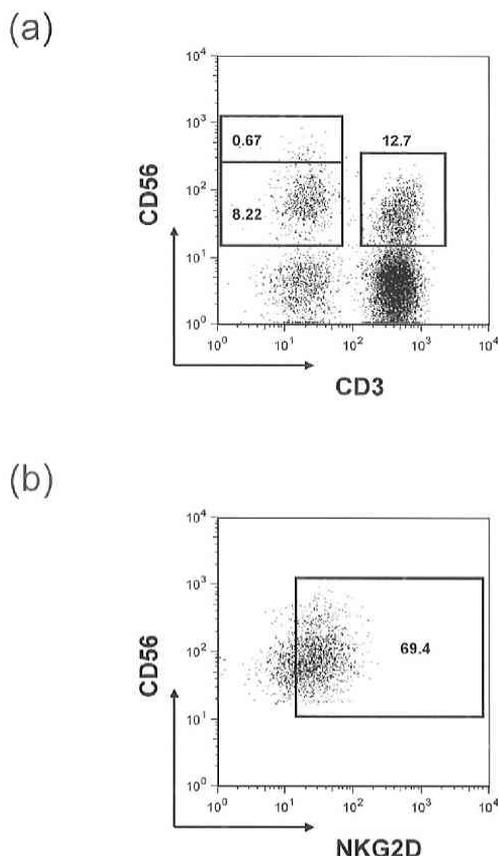


図1. フローサイトメトリーによる末梢血NK細胞分画の解析  
リンパ球集団をCD3/CD56で展開した。枠内は左上, 左下, 右が, それぞれ, CD56<sup>bright</sup> NK, CD56<sup>dim</sup> NK, NKT細胞である (a)。総NK細胞 (CD56<sup>bright</sup>とCD56<sup>dim</sup>の和) について, NKG2D発現レベルで展開し解析した (b)。図中の数値は, 各母集団に対する枠内細胞の比率を示す。

添加リン酸緩衝液)に懸濁させ, FITC標識-抗CD3抗体 (BD Biosciences, San Jose, CA), APC標識-抗CD56抗体 (Miltenyi Biotec, Germany), PE標識-抗NKG2D抗体 (BD Biosciences)を添加し, 氷上遮光で30分間インキュベートした。染色バッファーにて洗浄した後, 1%パラホルムアルデヒドで固定, フローサイトメトリー (FACS Calibur, BD Biosciences) による解析をおこなった。解析プロットにおける, CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞をNK細胞とし, CD56発現強度の違いにより, CD56<sup>bright</sup>NKとCD56<sup>dim</sup>NKに分類した。また, CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>細胞をNKT細胞と定義した (図1)。

統計解析は, 多群間比較 one-way ANOVA, post-hoc test には Tukey's multiple comparison test をもちい,  $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

### 結 果

対象症例の臨床検査データ比較 (表1):

治療前採血時点での, 年齢, 血清ALT値, HCV RNA量は, 表に示すとおりであり, いずれも, Gr1とGr2の群間では, 有意差を認めなかった。また, 治療終了後24週での, ウィルス排除率 (SVR) は, それぞれ, 43%, 83%であり, 群別の一般的な治療効果であった。

NK細胞関連分画の比較 (図2):

C型慢性肝炎のPBMCにおいて, フローサイトメトリーによる解析結果から, リンパ球におけるNK細胞頻度を求めると, Gr1  $21.4 \pm 2.5\%$ , Gr2  $20.2 \pm 7.0\%$ , コントロール  $33.1 \pm 6.0\%$  (mean  $\pm$  SEM) であり, 群間の有意差を認めなかった (a)。また, NKT細胞の頻度も, Gr1  $4.5 \pm 1.6\%$ ,

表1. 対象症例のプロフィール

	N	Age mean (range)	Sex (M/F)	ALT (IU/L)	HCV RNA (kcopies/ml)	SVR rate
Sero-group 1	7	55 (25-67)	3/4	22-212	9-3,700	43% (3/7)
Sero-group 2	6	57 (43-70)	4/2	16-112	670-4,700	83% (5/6)
Control (CHB)	4	47 (36-62)	4/0	42-282	N/A	N/A

SVR, sustained viral response; CHB, chronic hepatitis B; N/A, not available

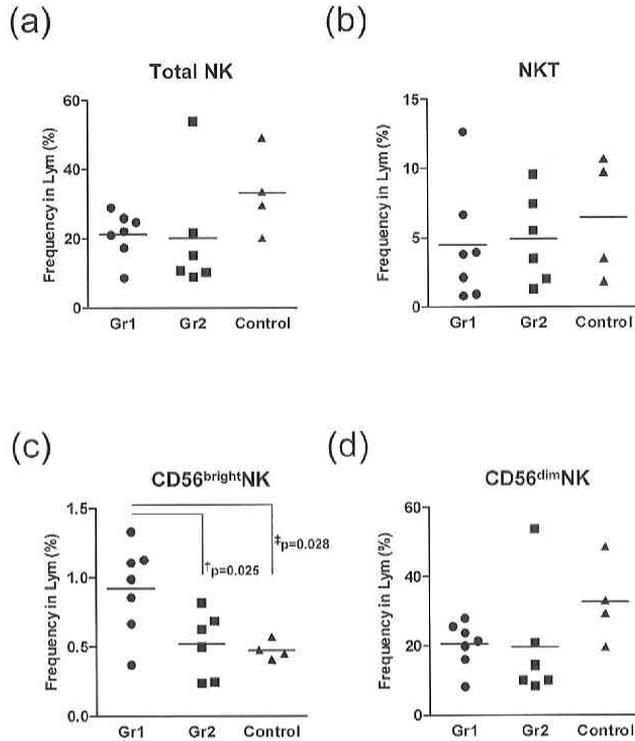


図 2. グループ間における NK 細胞関連集団比率の比較  
症例グループ毎の NK 細胞関連集団を、リンパ球に対する比率で示した。(a) NK 細胞, (b) NKT 細胞, (c) CD56<sup>bright</sup>NK 細胞, (d) CD56<sup>dim</sup>NK 細胞。

Gr2 4.9±1.3%, コントロール 6.4±2.2% であり, 群間の有意差を認めなかった (b)。NK 細胞については, CD56<sup>bright</sup>NK と CD56<sup>dim</sup>NK の亜集団に分けて検討した結果, 前者は, Gr1 が 0.92±0.12% であり, Gr2 0.52±0.09% ( $p=0.025$ ), コントロール 0.47±0.03% ( $p=0.028$ ) と他群に比して有意に高頻度であった (c)。

#### 抗ウイルス治療経過における NK 細胞関連分画の動態 (図 3) :

Gr2 症例に対しては 24 週間のインターフェロン治療が施行された。全 6 例について, 治療開始直前, 4 週, 8 週, 12 週, 24 週終了時, 24 週後効果判定時の NK 細胞関連分画の動態を検討した。その結果, NK 細胞と NKT 細胞に関しては, 治療開始時点と比較して, 一定の変動を示さなかった (data not shown)。CD56<sup>bright</sup>NK 分画は, 治療後

半に増加し, 終了後は減少するパターンを示し, 治療前, 4 週後と終了時 (24 週) の間では, 有意差を認めた ( $p<0.05$ ) (a)。一方, CD56<sup>dim</sup>NK 分画では, 一定の傾向を示さなかった (b)。

#### NK 細胞における NKG2D 発現頻度 (図 4) :

未治療時点での NKG2D 発現は, それぞれ Gr1 77.6±3.2%, Gr2 86.7±4.0%, コントロール 87.3±3.5% と, いずれの群でも高頻度であった。Gr1 で若干低頻度の傾向があったが, 有意差は認めなかった ( $p=0.12$ ) (a)。また, Gr2 症例での抗ウイルス治療中の経時的変動には, 一定の傾向を認めなかった (b)。

#### 考 察

免疫学的側面から, C 型慢性肝炎の病態を検討した場合, HCV 関連蛋白は, インターフェロンの

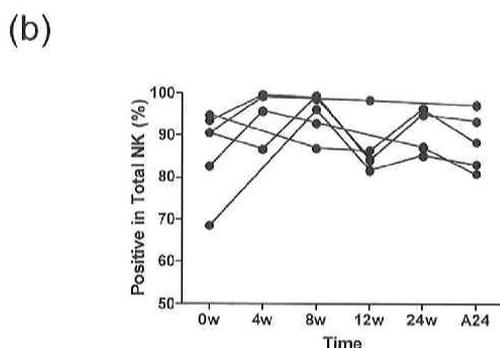
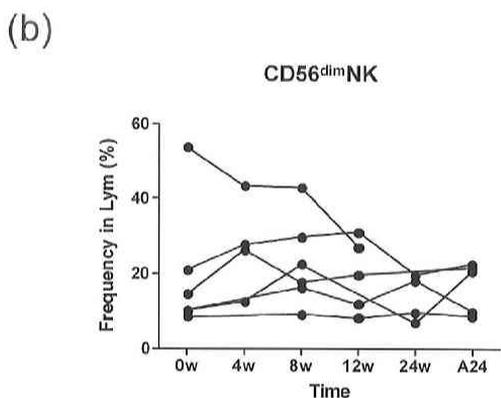
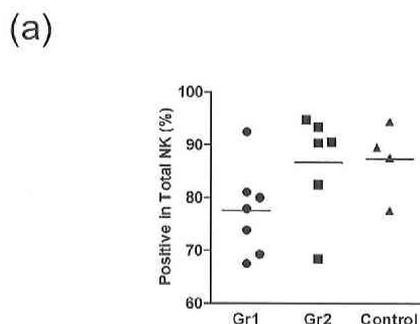
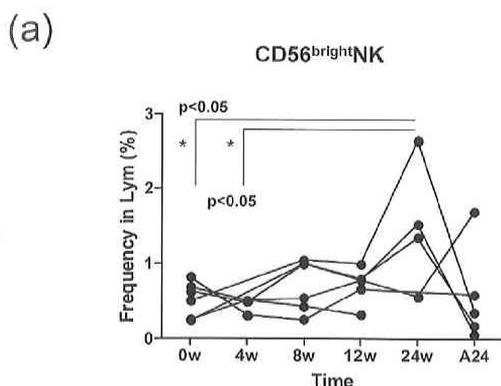


図4. NK細胞におけるNKG2D発現頻度の比較と推移  
治療前の症例グループ間比較 (a), sero-group 2の抗ウイルス治療前後での経時的変動 (b)。

図3. Sero-group 2 HCV感染症例における抗ウイルス治療期間中のNK細胞動態  
治療前後での、NK細胞頻度の変動。CD56<sup>bright</sup>NK細胞 (a), およびCD56<sup>dim</sup>NK細胞 (b)。

シグナルに抑制的に作用する<sup>8)</sup>。また、患者においては、末梢血・肝浸潤T細胞の特異的反応が減弱している。一方で、自然治癒した患者群では、年余にわたる反応が観察されていることから、HCVの排除には、宿主免疫の動態が深く関与していると考えられる<sup>9)</sup>。NK細胞は、元来、非特異的な作用をもつ、自然免疫応答に分類されており、慢性感染が成立した環境では、あまり重要視されてこなかった。しかし、近年では、C型慢性肝炎でのNK機能低下や、樹状細胞とNK細胞の相互作用が、取り上げられるようになった<sup>10,11)</sup>。今回われわれは、未治療状態、および24週治療群の経時的サ

ンプルをもちいて、NK細胞関連分画とマーカーについて検討をおこなった。

未治療での総NK細胞は、群間にて、有意差を認めなかったが、Gr2の1例を除けば、Gr1, Gr2ともに、C型慢性肝炎では、コントロールに比して、ややNK細胞が減少しており、既報にも合致する。NK細胞の数的な減少についての報告は、散見されるが<sup>12,13)</sup>、その原因や、個々の細胞の細胞傷害能については、未だ議論の最中である。今回われわれは、コントロールに健常者ではなく、持続的な肝障害があると考えられる、B型慢性肝炎をもちいたが、仮に症例数の増加などにより、有意な差が得られれば、このNK細胞の減少は、肝炎によるものではなく、HCV感染特異的な事象と

捉えることができよう。

また、興味深いことにNK細胞の亜分画でみた場合、CD56<sup>bright</sup>NKは、Gr1において、他群より、有意に高頻度であった。マウスのみならずヒトにおいても、CD56発現強度によって、亜分画が分類されることが明らかとなり、その分化過程や、意義などについての研究が盛んにおこなわれているところであるが、NK細胞のほとんどは、細胞表面のCD56が中程度発現し(CD56<sup>dim</sup>)、さらにCD16(FcγRIII)陽性である。CD16陽性細胞は細胞傷害能という、古典的なNK細胞活性を強く示す一方、総NK細胞の10%未満を占める、CD56<sup>bright</sup>NKは、むしろサイトカイン産生が盛んであり、immuno-regulatory NKと呼ばれることもある<sup>6)</sup>。Gr1症例は、HCV genotype 1の感染に相当し、既存治療に対して、ウイルス排除率(SVR)が低い(表1)。GenotypeとNK分画の検討は、これまでに報告がないが、治療抵抗性の一因として、CD56<sup>bright</sup>NKの増加と、その産生サイトカインにより、免疫的に制御されている可能性がある。

Gr2症例については、標準の治療期間が24週間のため、全6例にて治療中と判定時点でのフォローアップし得た。このなかでCD56<sup>bright</sup>NK細胞は、治療開始前と4週後から徐々に増加し、24週後をピークにして、その後は減少した。HIV/HCV共感染の治療における検討でも同様の報告があり、HIV量がコントロールされているなかでの、インターフェロン治療によって、HCV複製が効率的に治まった結果としているものの、治療終了後に再び前値に戻る傾向がみられることから<sup>12)</sup>、長期間の外因性インターフェロンによる、骨髄あるいは未熟NK細胞への直接作用かもしれない。

NK細胞活性を調節するシグナルには、killer immunoglobulin-like receptorなどの抑制性レセプターが多く知られているが、NKG2D(CD314)は活性化レセプターであり、標的細胞のMHC class I-related molecules (MIC) A/Bに反応するとされている<sup>14,15)</sup>。われわれは、今回の症例において、細胞レベルでのNK活性化レセプター発現が関連しているかどうかを検討した。残

念ながら有意差はみられなかったが、Gr1では発現頻度がやや低いように思われた。これについては、今後、症例数の増加を含めた検討が必要である。

## 結 論

CD56<sup>bright</sup>NK細胞は、HCV genotype 1感染例で高頻度にみられるほか、抗ウイルス治療中に増加することから、C型慢性肝炎の病態に密接にかかわっている可能性がある。

## 文 献

- 1) Liang, T.J., Rehermann, B., Seeff, L.B., Hoofnagle, J.H.: Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C, *Ann. Intern. Med.*, **132**, 296-305, 2000
- 2) Manns, M.P., Foster, G.R., Rockstroh, J.K., Zeuzem, S., Zoulim, F., Houghton, M.: The way forward in HCV treatment—finding the right path, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 991-1000, 2007
- 3) Biron, C.A.: Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections, *Semin. Immunol.*, **10**, 383-390, 1998
- 4) Kakumu, S., Yoshioka, K., Wakita, T., Ishikawa, T., Takayanagi, M., Higashi, Y.: A pilot study of ribavirin and interferon beta for the treatment of chronic hepatitis C, *Gastroenterology*, **105**, 507-512, 1993
- 5) Biron, C.A.: Activation and function of natural killer cell responses during viral infections, *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 24-34, 1997
- 6) Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., et al.: Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset, *Blood*, **97**, 3146-3151, 2001
- 7) Yonekura, K., Ichida, T., Sato, K., Yamagiwa, S., Uchida, M., Sugahara, S., et al.: Liver-infiltrating CD56 positive T lymphocytes in hepatitis C virus infection, *Liver*, **20**, 357-365, 2000
- 8) Gale, M., Jr., Foy, E.M.: Evasion of intracel-

- lular host defence by hepatitis C virus, *Nature*, **436**, 939-945, 2005
- 9) Rehermann, B., Nascimbeni, M. : Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection, *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 215-229, 2005
- 10) Corado, J., Toro, F., Rivera, H., Bianco, N.E., Deibis, L., De Sanctis, J.B. : Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection, *Clin. Exp. Immunol.*, **109**, 451-457, 1997
- 11) Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., et al. : Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN- $\alpha$ -stimulated dendritic cells in NK cell activation : impairment in chronic hepatitis C virus infection, *J. Immunol.*, **170**, 1249-1256, 2003
- 12) Gonzalez, V.D., Falconer, K., Michaelsson, J., Moll, M., Reichard, O., Alaeus, A., et al. : Expansion of CD56<sup>-</sup> NK cells in chronic HCV/HIV-1 co-infection : reversion by antiviral treatment with pegylated IFN $\alpha$  and ribavirin, *Clin. Immunol.*, **128**, 46-56, 2008
- 13) Kawarabayashi, N., Seki, S., Hatsuse, K., Ohkawa, T., Koike, Y., Aihara, T., et al. : Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, **32**, 962-969, 2000
- 14) Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., et al. : Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress inducible MICA, *Science*, **285**, 727-729, 1999
- 15) Lanier, L.L. : NK cell recognition, *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 225-274, 2005