

C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法における ヘルパー T細胞サイトカイン産生能の検討

武井伸之 吉益均 斉藤利彦 水口純一郎*

東京医科大学内科学第四講座 同免疫学教室*

【要旨】 C型慢性肝炎に対する IFN療法の治療効果とサイトカイン産生との関係を明らかにする目的で、IFN- α 療法を施行したC型慢性肝炎患者10例（著効5例，無効5例）および健常者8例の末梢血CD4陽性T細胞を抗CD3モノクローナル抗体で刺激し，培養上清中のIFN- γ （Th1サイトカイン），IL-4（Th2サイトカイン）を酵素抗体法を用いて測定した．患者群では健常者群に比べて治療前におけるサイトカイン産生が亢進していた．特にIFN- α 療法無効群では著効群に比べて治療前におけるIL-4産生の増強が認められた．しかし，IFN- γ 産生では両群間に差は認められなかった．次にサイトカイン産生を経時的に観察した．IFN- γ 産生では治療終了時に低下し，終了後3ヶ月で一過性のリバウンドを示し，6ヶ月で再び低下を示すというパターンをとり，両群間に有意差は認められなかった．一方，IL-4産生では両群とも治療により低下傾向を示し，終了後3ヶ月，6ヶ月でもレベルは同じかさらなる低下を示した．しかしながら，治療終了時ではIL-4産生レベルは無効群で有意に高く，無効群ではIFN- α 療法によるIL-4産生の抑制が著効群に比べ軽度であった．以上の結果から，治療前にサイトカイン産生がTh2優位で，IFN- α 投与によってもその抑制が不十分な例では治療の効果が少なく，サイトカイン産生パターンがIFN- α 療法の治療効果に寄与している可能性が示唆された．

はじめに

C型慢性肝炎に対しインターフェロン（IFN）療法が行われ，一定の成績をおさめているが，高ウイルス量やgenotype 1b例などでは著効の得られない可能性が高いと考えられている¹⁾．一方，ヘルパーT細胞にはそのサイトカイン産生能の相違により1型ヘルパーT細胞（Th1）と2型ヘルパーT細胞（Th2）の存在することが明らかとなり²⁾，種々の感染症や自己免疫疾患などでその病態形成に関与することが報告されている^{2,3,4,5)}．C型慢性肝炎においてもTh1, Th2がその病態形成に関与し，IFN療法の効果にも影響を与えているものと考えられるが，報告は少なく詳細は不明である．今回我々はC型

慢性肝炎患者におけるTh1, Th2の関与をIFN著効例と無効例につき比較検討した．

対象および方法

1. 対象

対象は当院でIFN- α 療法を行ったC型慢性肝炎患者10例（平均年齢54.9歳，男女比5:5）である．IFN- α は2週間連日投与後週3回の間欠投与とし24週間行った．IFN- α 総投与量は全例700 MU以上であった．IFN- α 療法終了後6ヶ月間ALT正常，HCV-RNA陰性の持続した著効例は5例，それ以外の無効例は5例であった（Table 1）．なお，健常者8例をコントロールとした．

1999年7月5日受付，1999年8月2日受理

キーワード：C型慢性肝炎，インターフェロン療法，ヘルパーT細胞，サイトカイン

（別刷請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学内科学第四講座 武井伸之）

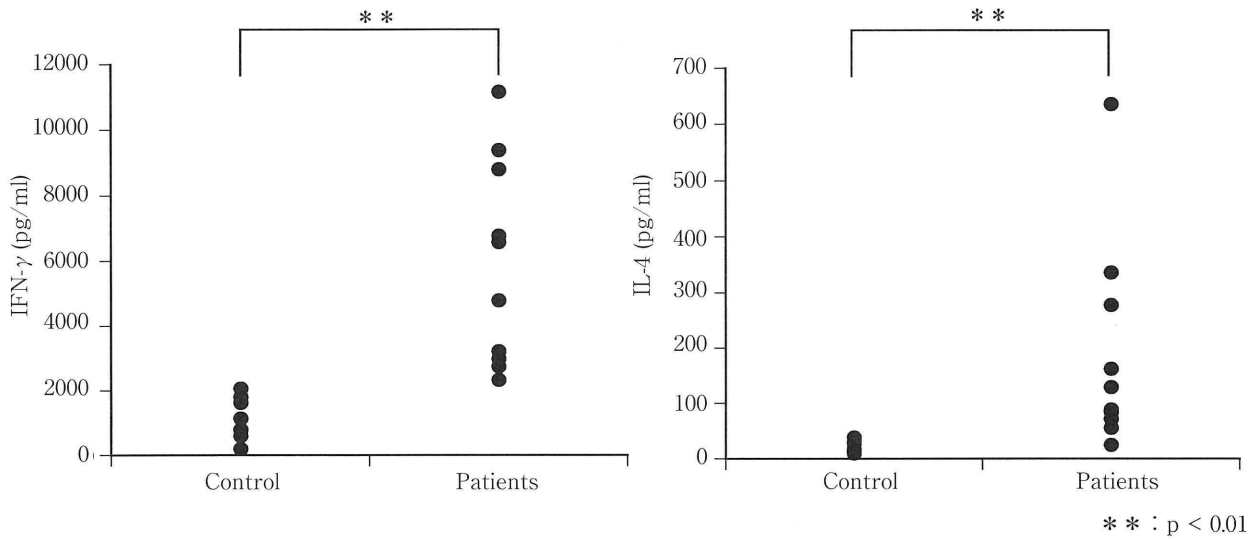


Fig. 1 Enhanced production of IFN-γ and IL-4 in CD4+ T cells from HCV-infected patients following anti-CD3 antibody stimulation.

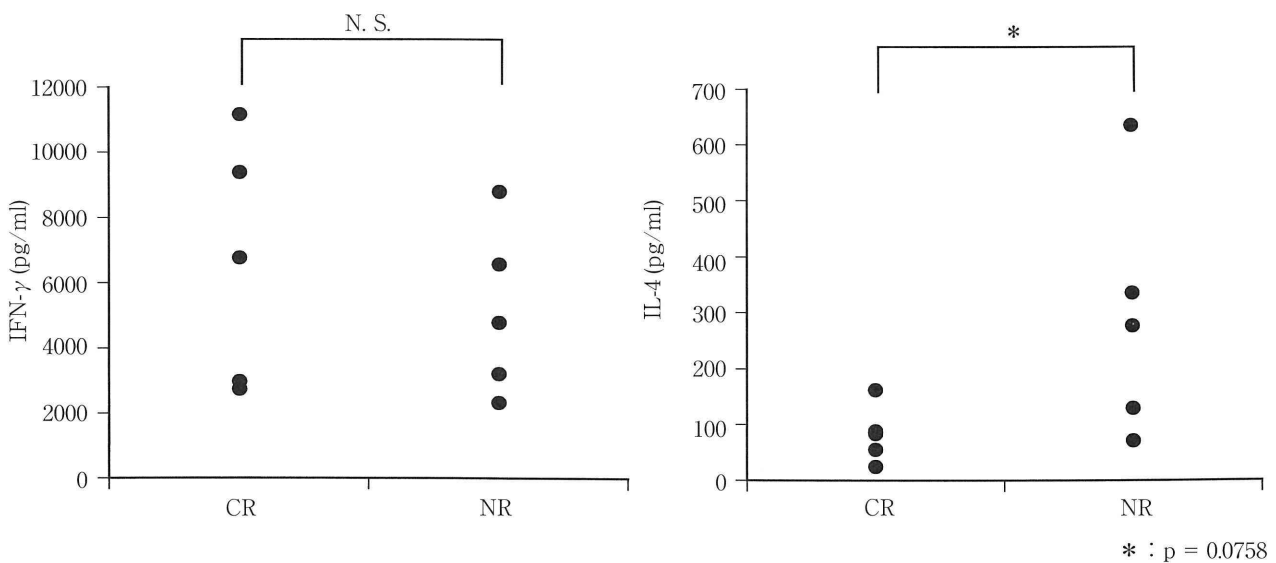


Fig. 2 Enhanced anti-CD3-induced IL-4 production in CD4+ T cells from NR before IFN-α treatment. No significant difference in IFN-γ production was seen between CR and NR.

2. ヘルパーT細胞の分離と刺激培養

上記のC型慢性肝炎患者10例よりヘパリン加末梢血を採取し、比重遠心法により単核球を採取、さらに、抗CD4抗体結合マグネティックビーズ(Dynal)を用いてpositive selectionして得られたCD4陽性細胞をヘルパーT細胞として用いた。フローサイトメトリーでは純度はいずれの検体においても100%であった。

この細胞を10% AB血清添加RPMI1640培地にて

2×10⁶/mlの濃度に調整し、抗CD3抗体を固相化したU底96穴プレートにて刺激培養した。なお、経過を観察しえた10例中8例においては、IFN-α投与前、終了時、終了後3ヶ月、終了後6ヶ月の時点でサンプルを採取した。

3. 培養上清中サイトカイン定量

刺激培養して得られた上清を-40℃で保存し、上清中のインターロイキン-4(IL-4)、インターフェロン-γ(IFN-γ)をELISA kit(Biosauce)にて測定

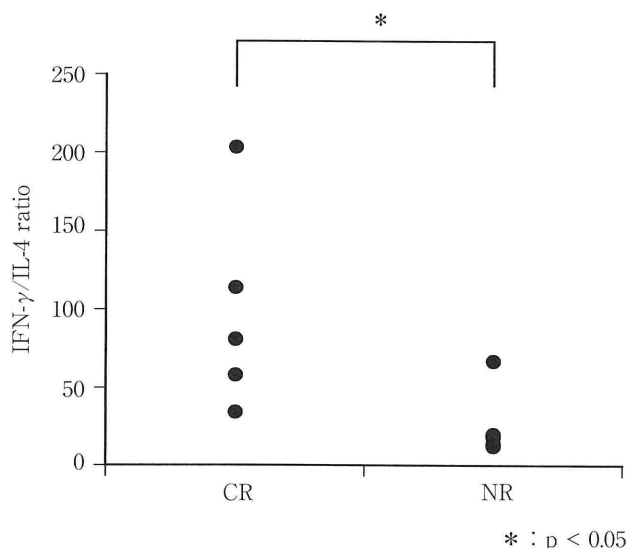


Fig. 3 Enhanced IFN- γ /IL-4 ratio in CR compared with NR before IFN- α treatment.

した。培養時間は健常者のサンプルにつき経時的測定を行い最高値をとる時間、すなわち、IL-4については24時間、IFN- γ については96時間とした。

4. 統計

成績は平均値±標準偏差で示した。群間比較にはMann-Whitney U検定，t検定を用い $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

1. IFN- α 投与前におけるサイトカイン産生能の検討

IFN- α 投与前における健常者群と患者群につき末梢血 CD4 陽性細胞を抗 CD3 抗体で 96 時間刺激培養して得られた上清中の IFN- γ を酵素抗体法にて測定したところ各々 1210 ± 660 pg/ml, 5861 ± 3145 pg/ml であった。IL-4 については同様に 24 時間刺激培養して得られた上清につき酵素抗体法にて測定したところ健常者群と患者群でそれぞれ 20 ± 11 pg/ml, 186 ± 186 pg/ml であり、IFN- γ , IL-4 いずれも患者群で有意に高値であった (Figure 1)。また患者群を IFN- α 著効例と無効例に分けて比較すると、96 時間刺激培養上清中の IFN- γ 値は著効例で 6593 ± 3756 pg/ml, 無効例で 5128 ± 2609 pg/ml, 24 時間刺激培養上清中の IL-4 についてはそれぞれ 82 ± 51 pg/ml, 289 ± 221 pg/ml であり、IFN- γ では両群間で有意差を認めなかったが、IL-4 では著効例に比し、無効例で高値の傾向にあった ($p = 0.0758$,

Figure 2)。同様に IFN- γ /IL-4 比を比較すると、著効例に比し無効例で有意に低値であった (98 ± 66 VS 26 ± 23 , Figure 3)。

2. サイトカイン産生能の経時的变化

対象 10 例のうち 8 例 (著効例 4 例, 無効例 4 例) では、IFN- α 療法前, 終了時, 終了後 3 ヶ月, 6 ヶ月と経時的に末梢血 CD4 陽性細胞を採取し抗 CD3 抗体で刺激培養した上清中の IFN- γ , IL-4 を酵素抗体法で測定した。その結果 96 時間培養上清中の IFN- γ 値は IFN- α 投与終了時には全例投与前に比し低下していた。これを治療効果別にみると無効群では有意差を認めたが、著効群では有意差を認めなかった (Figure 4)。24 時間培養上清中の IL-4 値については、著効群では IFN- α 投与前には無効群に比し低値の傾向を認め、IFN- α 投与終了時にも低値を維持しており、投与前に唯一 100 pg/ml 以上であった症例 No. 2 においても終了時には 100 pg/ml 以下に抑制されていた (49.5 ± 27.2)。これに対し無効群では全例で低下を認めたが、終了時には著効群に比し有意に高く 4 例中 3 例においては 100 pg/ml 以上であった (139.5 ± 68.6 , $p = 0.0433$, Figure 5)。IFN- α 投与終了後の抗 CD3 抗体刺激による末梢血 CD4 陽性細胞培養上清中のサイトカインレベルをみると IFN- γ では投与終了後 3 ヶ月の時点で IFN- α 投与前と同レベルにまで上昇し、投与終了後 6 ヶ月の時点で健常者と同レベルにまで低下しており (Figure 4), IL-4 では終了時よりさらに低下し、投与終了後 3 ヶ月, 6 ヶ月の時点では健常者と同レベルであった (Figure 5)。

考 察

患者群では健常者群に比し有意にサイトカイン産生能が亢進しているが、この結果は血清中サイトカインの結果⁶⁾と同様であり、HCV 感染ではヘルパー T 細胞が活性化されているものと考えられた。

サイトカイン産生能を IFN- α 治療効果との関係で検討すると、IFN- α 治療前において IFN- γ では著効例と無効例で有意差を認めなかったが、IL-4 では著効例に比し無効例で高値の傾向にあり、IFN- γ /IL-4 比は著効例に比し無効例で有意に低値であった。すなわち、Th1-Th2 バランスで考えると Th2 優位の感染状態では著効は得難いものと考えられた。これまでには、IL-4 同様 Th2 サイトカインである IL-10 が血清中で高値の場合は IFN 治療効果が

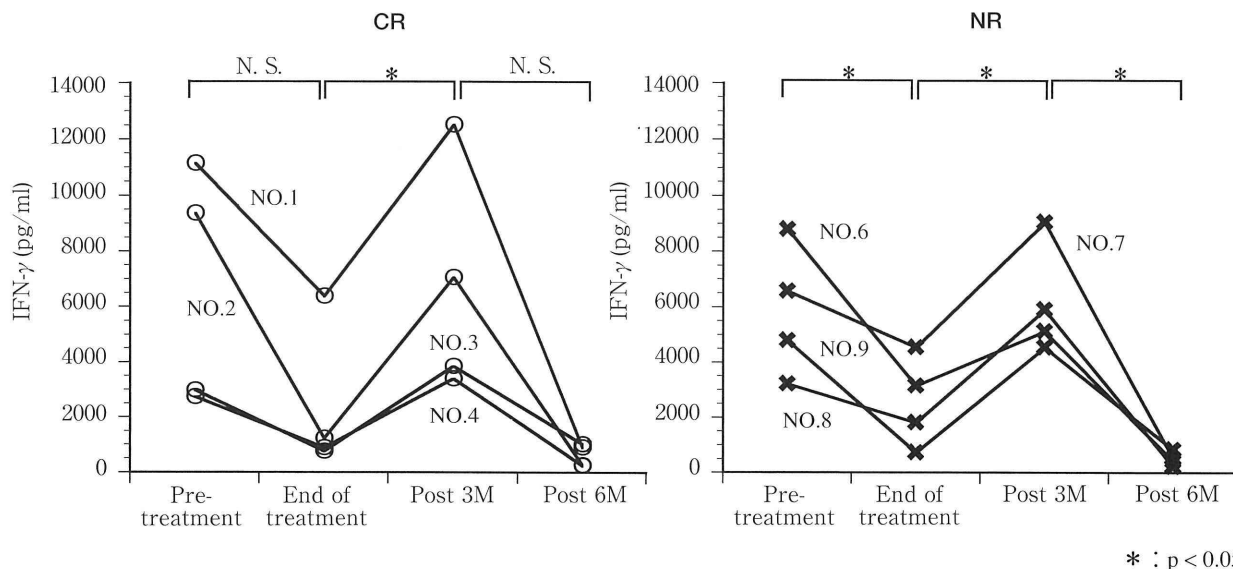


Fig. 4 Sequential measurement of anti-CD3-induced IFN- γ production in HCV- infected patients treated with IFN- α . No significant difference in the cytokine production pattern was seen between CR and NR.

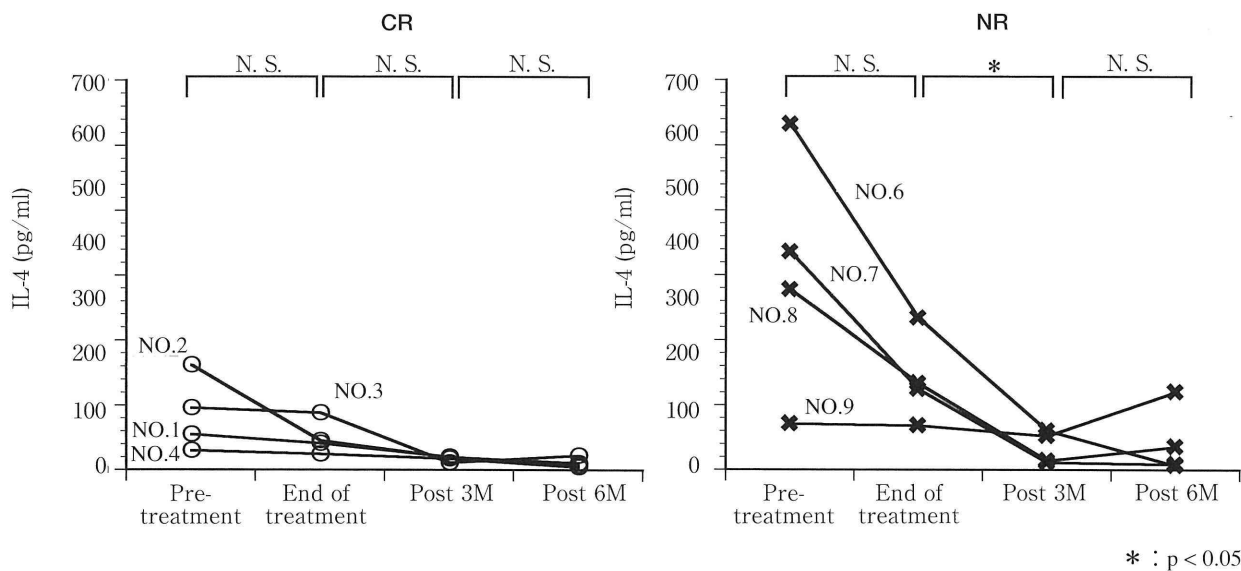


Fig. 5 Sequential measurement of anti-CD3-induced IL-4 production in HCV-infected patients treated with IFN- α . Because of insufficient inhibition of IL-4 production by IFN- α therapy in NR, the IL-4 value was significantly higher in NR than CR at the cessation of the therapy.

得難い⁷⁾との報告やHCVに対する抗体産生能とIFN- α 治療効果とは負の相関関係にある⁸⁾との報告があり、後者はTh2サイトカインが液生免疫を賦活することを考慮すれば、いずれも今回の結果を支持するものと考えられる。

IFN- α 投与によりIFN- γ 産生では無効群において有意な低下を認めたものの著効群においても全例に低下を認めており、その変化は同様のものと考えら

れた。一方、IL-4については著効群ではIFN- α 投与により終了時には全例100 pg/ml以下と低値を維持していたのに対し、無効群では抑制は認められたものの著効群に比し有意に高値で4例中3例においては終了時100 pg/ml以上であり、著効群に比し抑制が不十分であるものと考えられた。一般にウイルス感染においては、細胞性免疫が組織障害およびウイルスの排除に主要な役割を果たすものと考えられてい

Table 1 Clinical data

NO.	Age/Sex	Effect	Genotype	Pre-treatment	End of treatment	Post 3 M	Post 6 M
				ALT/HCV-RNA (Meq/ml)			
1	63/F	CR	2a	287/2.0	13/(-)	20/(-)	17/(-)
2	54/F	CR	2a	37/<0.5	11/(-)	10/(-)	13/(-)
3	59/F	CR	2a	56/2.5	10/(-)	12/(-)	16/(-)
4	52/F	CR	2a	194/<0.5	30/(-)	30/(-)	26/(-)
5	48/M	CR	2b	46/1.2	22/(-)	15/(-)	16/(-)
6	58/M	NR	2a	53/6.7	85/(-)	74/<0.5	55/4.0
7	45/M	NR	1b	81/5.2	30/<0.5	141/1.2	99/2.2
8	58/F	NR	1b	77/23.0	17/<0.5	91/20.0	73/14.0
9	61/M	NR	2a	225/0.90	23/<0.5	79/0.81	52/0.92
10	41/M	NR	2a	113/1.1	42/(-)	92/<0.5	83/4.0

る⁹⁾。C型慢性肝炎においてもその肝細胞障害機序は病理学的所見や無症候性キャリアの存在などから、一般のウイルスと同じく細胞性免疫の関与が考えられ¹⁰⁾、実際にHCV特異的細胞障害性Tリンパ球(CTL)の存在することも報告されている^{11,12)}。このようにHCVも含めウイルスの排除には主に細胞性免疫が働き、サイトカイン環境はTh1優位の状態になっているものと考えられる。この点を考慮すると今回の結果から無効群においてはIFN- α 投与によりTh2サイトカインであるIL-4の抑制が不十分なため細胞性免疫が十分賦活されずHCVの排除に至らなかった可能性が示唆される。しかし、無効群においてもある程度のIL-4の抑制は認められており、IFN- α の直接的な抗ウイルス作用と相まって投与終了時のウイルス量は0.5 Meq/ml以下と著明に減少したものと考えられる。C型慢性肝炎患者血清中サイトカインレベルの検討でもIFN- α 投与中Th2サイトカインであるIL-4, IL-10レベルの低下に伴いHCV-RNA量の減少を認め、Th2サイトカインを抑制することがIFN- α の抗HCV作用の一つのメカニズムであろうと結論しており⁶⁾、この報告は我々の結果を支持するものと考えられる。IFN- α のサイトカイン産生に及ぼす作用としては、in vitroの検討ではあるが健常人の末梢血CD4陽性T細胞についてIFN- γ 産生を賦活することによりTh1優位の状態にすると報告されているが¹³⁾、今回の結果はこの報告とは異なっており、HCVの持続感染はIFN- α のCD4陽性T細胞のサイトカイン産生に

及ぼす作用にも影響を与えているものと推測される。

IFN- α 終了後のサイトカイン産生動態については、終了3ヶ月後にはIFN- γ 産生能は亢進しており他のウイルス感染等で刺激を受けた場合にはIFN- γ が容易に産生され、それに伴う症状も出やすくなるものと予想され、注意を要すると考えられるが、その理由は不明であり今後の検討が必要と思われる。また終了6ヶ月後ではIFN- γ , IL-4産生いずれも健常者と同等に低下しているが、無効例ではこの時点では肝炎の程度は既に治療前と同様であった(Table 1)。無効例では終了6ヶ月以降IFN- γ , IL-4産生いずれもIFN- α 投与前と同等のレベルまで亢進するものと予想され、IFN- α 投与後では末梢での免疫応答は肝炎の再燃に遅れて認められるものと考えられた。

高ウイルス量の症例とgenotype 1b例ではIFN療法で著効の得難いことが明らかにされているため、ここでHCV-RNA量, genotypeとThバランス(IFN- γ /IL-4比)との関係を検討してみたい。各Thサブセットへの分化誘導機序の詳細については不明な点が多いが、抗原提示細胞(APC)膜上の特異的ペプチドとMHCクラスIIとの複合体の密度は各Thサブセットへの分化に影響を与える因子の一つと考えられている¹⁴⁾。HCV-RNA量に比例してAPC膜上のHCV特異的ペプチドとMHCクラスIIとの複合体の密度も増加するものと考えられ、HCV-RNA量とIFN- γ /IL-4比との間に相関のあることが

推測されたが、一定の傾向は認めなかった。また今回は症例が少なく genotype 別には検討できなかったが、抗原の種類も Th サブセットへの分化に影響を与える因子の一つと考えられており¹⁵⁾、今回用いた NS-5 領域の塩基配列に基づく genotype 分類では¹⁶⁾、この NS-5 領域にエピトープが存在すれば genotype によりエピトープすなわち抗原の種類が異なることになり、genotype が Th1 あるいは Th2 への分化に影響を与える因子となりうると考えられる。C 型慢性肝炎における Th1 および Th2 細胞への分化に影響を与える因子が明らかになれば、Th バランスをコントロールすることにより著効率を高めることができる可能性があると考えられる。

今回の検討では IFN- α 治療無効例では治療前に Th2 優位の状態にあることが示唆された。しかし、末梢血と肝局所の CD4 陽性 T 細胞では別の特性を有するという報告もあり¹⁷⁾、今回の結果が肝局所の免疫反応を反映していない可能性も否定できない。肝組織より得られたサイトカイン mRNA の検討では、IFN- α 治療無効例で Th1 サイトカインの mRNA レベルが高いと報告されており¹⁸⁾、今回の結果と異なるが、この報告は肝組織全体についての検討であるため単純に比較はできない。今後は肝局所の CD4 陽性 T 細胞を用いた検討により、C 型慢性肝炎における Th1-Th2 バランスと IFN 治療効果との関連を明らかにし、IFN 治療無効例に対する新たなサイトカイン療法を確立する必要がある。

結 論

1) C 型慢性肝炎においては、IFN- α 治療前に Th2 優位であると治療効果が少ないと考えられた。

2) IFN- α 療法無効例では IFN- α による Th2 サイトカイン産生の抑制が不十分なため細胞性免疫が十分賦活されず、HCV の排除に至らない可能性が示唆された。

文 献

- 1) Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquin M, Degott C, Descombes I, Le Breton V, Milotova V, Benhamou JP, Erlinger S: Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology* **22** (4 Pt 1): 1050

- ~6, 1995
- 2) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T-cell clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**: 2348~2357, 1986
- 3) Sher A, Coffman RL: Regulation of immunity of parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu Rev Immunol* **10**: 385~409, 1992
- 4) Garra AO, Murphy KM: T-cell subsets in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **5**: 880~886, 1993
- 5) Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO: Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* **16**: 34~38, 1995
- 6) Thomas VC, Olivia MM, Robert GG, Janeth CV, Sheri MK: Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre-and post-treatment with interferon alfa. *Hepatology* **24**: 6~9, 1996
- 7) N. Kuzushita, N. Hayashi, K. Katayama, T. Kanto, M. Oshita, H. Hagiwara, A. Kasahara, H. Fusamoto, T. Kamada: High levels of serum interleukin-10 are associated with a poor response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* **32**: 169~174, 1997
- 8) Hanns L, Christopher N, Hans-Peter D, Barry S, Gred M, Bernd G, Karl-Hermann MZB, Guido G: Significance of IgG and IgM HCV antibody secretion in vitro in patients with chronic hepatitis C: correlation with disease activity and response to interferon- α . *Hepatology* **20**: 1383~1389, 1994
- 9) Welsh RM: Regulation and role of natural killer cell-mediated immunity during virus infection. In: *Human Immunity to Viruses* (ed by Ennis N), p21, Academic Press, New York, 1983
- 10) Genesca J, Esteban JI, Alter HJ: Blood-borne non-A non-B hepatitis C. *Semin Liver Dis* **11**: 147~164, 1991
- 11) Koziel MJ, Dudley D, Wong JT, Dienstag J, Houghton M, Ralston R, Walker BD: Intrahepatic cytotoxic T lymphocytes specific for hepatitis C virus in persons with chronic hepatitis. *J Immunol* **149**: 3339~3344, 1992
- 12) Kita H, Moriyama T, Kaneko T, Harase I, Nomura M, Miura H, Nakamura I, Yazaki Y, Imawari M: HLA B44-restricted cytotoxic T lymphocytes recognizing an epitope in hepatitis C virus nucleocapsid protein. *Hepatology* **18**: 1039~1044, 1993
- 13) Volker B, Thomas G, Sefik A, Christoph HH: Interferon α increases the frequency of interferon

- γ -producing human CD4⁺ T cells. *J Exp Med* **178** : 1655~1663, 1993
- 14) Pfeiffer C, Stein J, Southwood S, Ketelaar H, Sette A, Bottomly K : Altered peptide ligands can control CD4⁺ T lymphocyte differentiation in vivo. *J Exp Med* **181** : 1569~1574, 1995
- 15) Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S : Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* in vitro human T cell with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* **88** : 346~350, 1991
- 16) P Simmonds, EC Holmes, TA Cha, F McOmish, B Irvine, E Beall, PL Yap, J Kolberg, MS Urdea : Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* **74** : 2391~2399, 1993
- 17) Maria AM, Piero P, Derya U, Stefano C, George K, Michael H, Maurizia RB, Ferruccio B, Sergio A : Compartmentalization of T lymphocytes to the site of disease: intrahepatic CD4⁺ T cells specific for the protein NS4 of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C. *J Exp Med* **178** : 17~25, 1993
- 18) Fukuda R, Ishimura N, Ishihara S, Chowdhury A, Moriyama N, Nogami C, Miyake T, Niigaki M, Tokuda A, Satoh S, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S : Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. *Liver* **16** : 390~399, 1996

Cytokine production of helper T cells from chronic hepatitis C patients treated with interferon- α

Nobuyuki TAKEI, Hitoshi YOSHIMASU, Toshihiko SAITO and Junichiro MIZUGUCHI*

Fourth Department of Internal Medicine and Department of Immunology*, Tokyo Medical University

Abstract

The aim of this study is to clarify the relationship between the efficacy of interferon (IFN)- α therapy for chronic hepatitis C patients and cytokine production. We cultured peripheral CD4⁺ T cells under stimulation of anti-CD3 antibody and measured the time course concentration of IFN- γ (Th1 cytokine) and interleukin (IL)-4 (Th2 cytokine) in supernatant by ELISA. At pretreatment, their production in the patient group was significantly higher than that in control. IL-4 production in non-responders (NR) tended to be higher than that in complete responder (CR) at pretreatment, however, there was no significant difference in either of the groups as to the IFN- γ production before IFN- α therapy. Next we studied the time course production of cytokines. IFN- α caused a decrease of IFN- γ at the end of therapy followed by transient increase after 3 months and then decrease again to the control level at 6 months after the cessation of IFN- α therapy. This cytokine production pattern was the same in both groups. Unlike IFN- γ , the kinetics of IL-4 production by IFN- α therapy tended to decrease at the cessation of IFN- α therapy followed by further decrease after 3 months and there was no significant difference between 3 months and 6 months. However, IL-4 production was significantly higher in NR than in CR at the cessation of the therapy, suggesting that inhibition of IL-4 production by IFN- α was insufficient in NR. In conclusion, it is suggested that it is hard to obtain complete response in those patients who have Th2 dominant cytokine production and insufficient suppression of those cytokines, and that cytokine production pattern might contribute to the efficacy of IFN- α therapy for chronic hepatitis C.

〈Key words〉 Chronic hepatitis C, Interferon therapy, Helper T cell, Cytokine
