

24. 肝炎ウイルス (1)

—HCV に対する抗ウイルス免疫応答—

井 廻 道 夫

はじめに

C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は約70%が慢性肝炎に移行し、約20~30年の経過で慢性肝炎患者の30~40%が肝硬変に移行し、肝硬変に移行すると年率約7%でほとんどすべての患者に肝臓が癌発生する。日本には約200万人のHCV感染者が存在し、毎年約2.5万人がHCV感染に伴う肝臓で死亡している。

C型肝炎の臨床の最終目標は肝臓癌発生を予防するためのHCV感染の制御によるウイルス排除である。この目標を達成する手段として、ウイルス増殖機構の制御と特異的抗ウイルス免疫応答の利用があるが、ウイルス増殖機構の制御によるウイルス排除においても、ウイルスの再増殖の抑制には抗ウイルス免疫応答が重要な役割を果たす。従って、HCVに対する免疫応答の解析は、C型肝炎の発症機序の解明だけでなく、新しい治療戦略を開発する上でも重要である。

肝炎ウイルス感染に対する免疫応答

肝炎ウイルス感染に対して、生体は図1のように免疫応答することがこれまでの研究から明らかにされている。肝炎ウイルスが肝細胞に感染すると、感染細胞はインターフェロン (IFN) α , β を産生し、肝炎ウイルスの増殖を抑制すると共に、NK細胞を活性化し、活性化したNK細胞は肝炎ウイルス感染細胞を傷害し、肝炎ウイルスを排除するように働く。同時に肝炎ウイルス感染に反応して2型樹状細胞は大量のIFN α を産生し、肝炎ウイルスの増殖を抑制する。このような非特異的抗ウイルス免疫応答で肝炎ウイルスが排除されなかった場合は、ウイルス特異的の中和抗

体、感染細胞が提示する細胞内で産生され、処理されたウイルス抗原断片を認識し、傷害する細胞傷害性T細胞 (CTL) がウイルスの排除に働く。抗体産生誘導、CTLの活性化、増殖に重要な役割を果たすのは1型樹状細胞である。肝炎ウイルス蛋白を取り込んだ樹状細胞は未感作の肝炎ウイルス特異的ヘルパーT細胞 (Th) を感作し、抗原刺激に対してCTLの活性化、増殖に重要なインターロイキン (IL)-2, IFN γ を産生する1型Th (Th1) およびB細胞の抗体産生を誘導する2型Th (Th2) を誘導する。更に、樹状細胞は未感作のCTLを感作すると共に、Th1の誘導、NK細胞、CTL活性化を促すIL-12も産生する。肝炎ウイルス感染に対してこれら免疫系が適度に反応した場合は、無症候性、あるいは急性肝炎を発症し、ウイルスは排除されるが、反応が不十分な場合は持続感染に移行し、反応が過度な場合は劇症肝炎を発症するものと考えられる。

中和抗体は二次感染における感染ウイルス排除には重要な役割を果たすが、一次感染あるいは持続感染でウイルス排除に重要な役割を果たすのはCTLと考えられており、以後HCV感染における細胞性免疫応答について述べる。

HCV感染におけるTh応答

ウイルス感染に対するTh応答はウイルス抗原刺激に対する単核球の増殖応答で解析されてきた。サイトカインの測定が可能になり、Th1応答はIFN γ , IL-2産生能を単核球の培養上清で測定する方法と産生細胞を1個1個のレベルで検出するELISPOT (enzyme-linked immunospot) アッセイで、Th2応答は同様な方法でIL-4, IL-13産生を見ることにより、抑制性細胞応答はIL-10産生を見ることにより解析できるようになった。

図2はHCV汚染免疫グロブリン製剤によるHCV感染の集団発生症例における末梢血単核球のHCV抗原に対する増殖応答を示したものであるが、一時的感染で治癒した症例では持続感染に移行した症例と比較し、発症後早期のHCV NS3抗原を主としたHCV増殖応答が強く、その増殖応答は発症後6か月以上経過した時点でも保たれている

自治医科大学附属大宮医療センター (〒330-8503 埼玉県さいたま市天沼町1-847)

Anti-viral immune responses against hepatitis C virus

Michio Imawari

Omiya Medical Center, Jichi Medical School

1-847 Amanuma-cho, Saitama, Saitama 330-8503

TEL: 048-647-2111, FAX: 048-648-5166

E-mail: mimawari@jichi.ac.jp

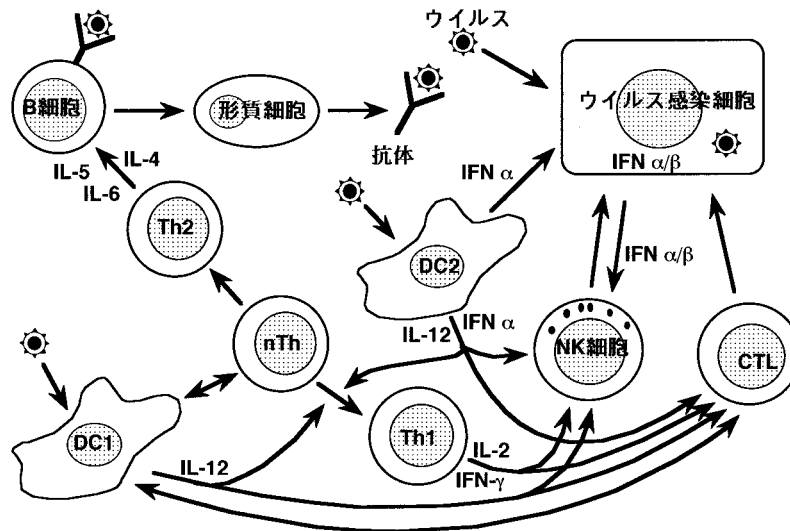


図1 肝炎ウイルス感染に対する免疫応答 (CTL: 細胞傷害性 T 細胞, nTh: ナイーブ Th 細胞, Th1: 1 型ヘルパー T 細胞, Th2: 2 型ヘルパー T 細胞, DC1: 1 型樹状細胞, DC2: 2 型樹状細胞, IL: インターロイキン, IFN: インターフェロン)

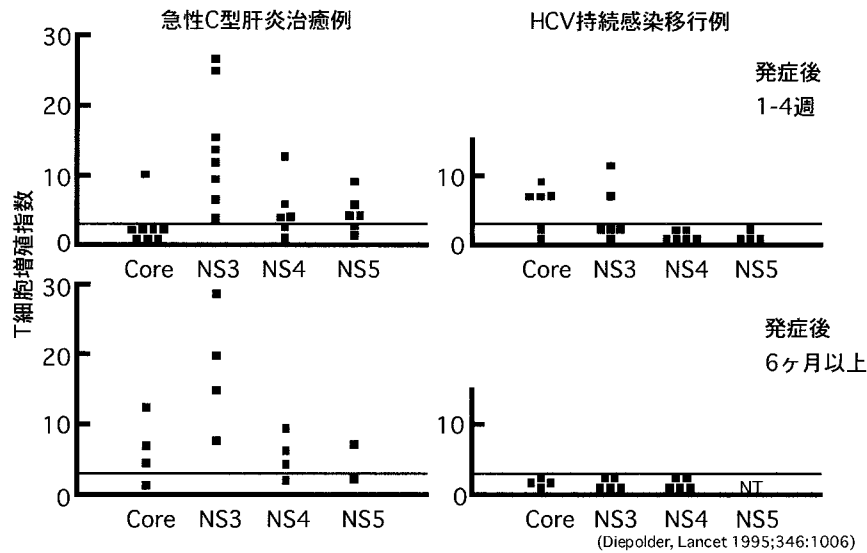


図2 C 型急性肝炎における T 細胞応答と予後

のに対して、持続感染に移行した症例では著明に低下している。即ち、HCV の排除には強い T 細胞応答が必要であると考えられる。

最近、IL-10, TGFβ 等を産生する細胞による免疫抑制が癌免疫やウイルス持続感染で注目されている。図3はC型慢性肝炎患者末梢血単核球のHCV NS3抗原刺激IFNγおよびIL-10産生細胞数をELISPOTアッセイで算定し、ALT値が100以下と以上で比較したものである。ALT値の高低による差は認められなかったが、抗ウイルス応答に働くIFNγ産生細胞より多くの免疫抑制性サイトカインIL-10細胞が存在することが注目される。

今後はHCV蛋白のどの部分がウイルス排除を促すTh1細胞を刺激するエピトープであるのか、あるいは抑制性サイトカイン産生細胞を刺激するエピトープであるのかを明らかにする必要がある。これらを明らかにすることは、抑制性のコンポーネントをもたないワクチン開発に重要である。

HCV 感染における CTL 応答

CTL 応答の解析はウイルス特異的 CTL を肝浸潤リンパ球から直接クローン化する方法、あるいは末梢血単核球を CTL エピトープを含むペプチドで刺激し、誘導すること

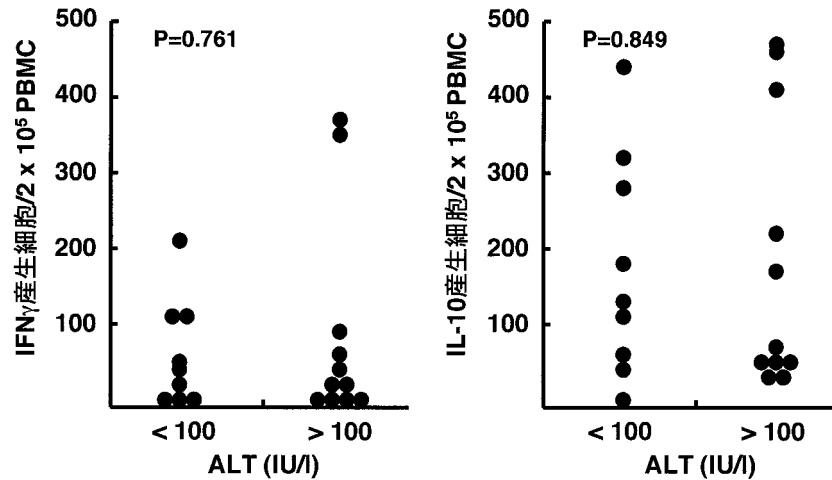


図3 ALTとNS3抗原特異的IFN γ , IL-10産生細胞 (Tajimi et al. 2001; unpublished data)

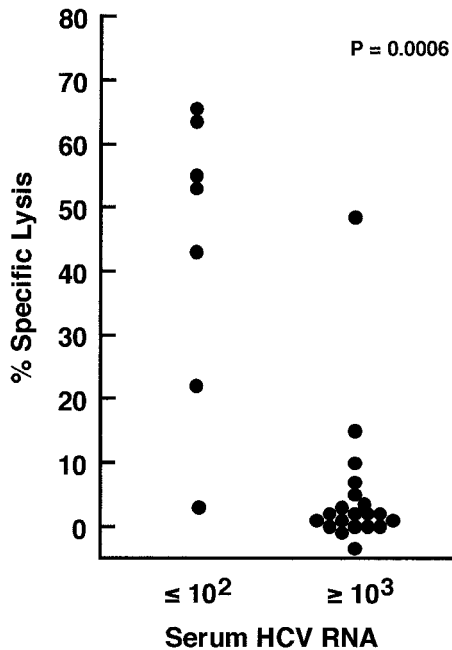


図4 CTL活性と血清HCV RNA量 (Hiroishi et al. Hepatology 1997; 25: 712)

により行われてきた。最近、新しい方法としてCD8陽性細胞をエピトープペプチドで刺激し、ELISPOTアッセイで解析する方法とHLAテトラマーあるいはダイマーにエピトープペプチドを結合したものをプローブに用い、このプローブを認識するT細胞受容体をもつCTLをFACSで解析する方法が登場している。

私達はHLA-B44を有するC型慢性肝炎患者末梢血単核球を、HCVコア抗原全体をカバーし、10アミノ酸ずつオーバーラップする20アミノ酸の18種類のペプチドで刺激し、CTLを誘導することにより、HCVコア抗原アミノ酸

残基88-96がHLA-B44拘束性HCV特異的CTLであることを明らかにした。図4はHLA-B44を有するC型慢性肝炎患者におけるHCVコア抗原88-96特異的CTL活性と血清HCV RNA量との関係を示したものであるが、HCV特異的CTLはHCVの増加を抑制している可能性が示唆される。図5はHLA-A2.1を有するC型急性肝炎患者におけるCTL応答をHLA-A2.1拘束性HCV特異的CTLエピトープペプチド-HLA-A*0201テトラマーにより解析した結果であるが、早期に強く誘導されるCTLと回復期に誘導されてくるCTLがあり、いずれのCTLも急性期には多くが活性化(CD38陽性)しているのに対し、回復期には急速に活性化したCTLの割合が低下することが明らかにされている。図6はC型急性肝炎のピーク時とC型慢性肝炎患者、HCV抗体陽性HCV RNA陰性患者(HCVを既に排除した患者)の末梢血中のHCV特異的CTLをHLA-A*0201-CTLエピトープペプチドテトラマーにより解析した結果であるが、急性肝炎では末梢血中にHCV特異的CTLが検出できるがHCV以外のウイルス感染と比較するとその数は少なく、慢性肝炎ではほとんど検出できずCTL応答が抑制されていること、一般にウイルスが排除された後にはメモリーCTLが検出されるが、HCV感染においてはウイルス排除後にはメモリーCTLもほとんど検出感度以下に減少することが明らかである。これらの結果からもHCV感染におけるCTL応答は弱いことが推測される。

HCV蛋白全体に対するCTL応答の解析

ペプチドによるCTL誘導やHLAペプチドテトラマー(ダイマー)による解析は既知のCTLエピトープに対してのみの解析であり、対象となるHLAも限られる。HCV感染に対するCTL応答は複数のエピトープに対して見ら

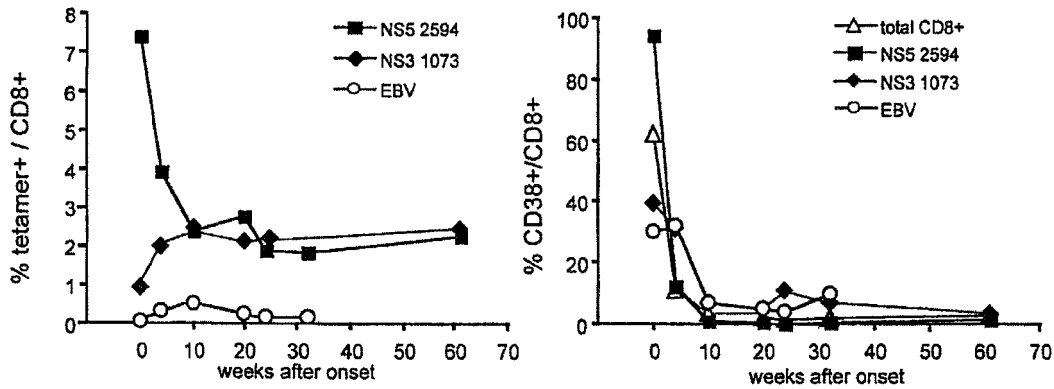


図5 C型急性肝炎末梢血単核球のHLAテトラマー解析 (Lechner F, et al. JEM 2000 ; 191 : 1499)

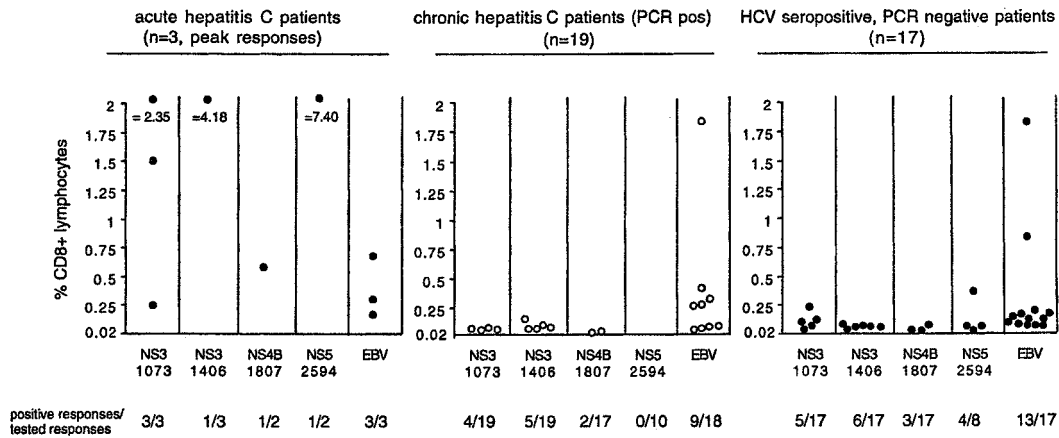


図6 C型肝炎末梢血単核球のHLAテトラマー解析 (Lechner F, et al. JEM 2000 ; 191 : 1499)

れ、CTL 応答を拘束する HLA も多彩であることが知られている。従って、これらの方法では HCV 全体に対する CTL 応答を評価することはできず、真に免疫学的に優位な CTL 応答を見ているかどうかは不明である。各種治療法の HCV 特異的 CTL 応答への影響を評価するには、HCV 全体に対する CTL 応答を解析する必要があるが、HCV 特異的 CTL 活性を末梢血で直接測定することは、CTL の数が極めて少ないため不可能である。最近、HCV の各領域を発現する遺伝子組換えワクシニアウイルスを感染させた患者自己 B 細胞株で患者末梢血単核球を刺激し、CTL を増殖させたのち、HCV 特異的 CTL 活性を測定する方法が報告されている。私達は、患者末梢血単核球から CD8 陽性、CD45RA 陰性のメモリー細胞、エフェクター細胞を濃縮した後に限界希釈法で得られた T 細胞株の CTL 活性を HCV の各領域を発現する遺伝子組換えワクシニアウイルス感染患者自己 B 細胞株を標的に測定することにより、HCV 全体に対する CTL 応答を評価する方法を開発した (図 7)。図 8 はこの方法で HCV 全体に対する CTL 応答を解析した C 型慢性肝炎の 1 例であるが、この患者では HCV の各領域すべてに対して CTL 応答が見られている。更にこの患者で

は CTL のクローン化にも成功し、新しい CTL エピトープがいくつか同定されている。この方法は HCV 全体に対する CTL 応答を評価だけでなく、新しい CTL エピトープの同定にも有用であると考えられる。

HCV 感染における樹状細胞機能

HCV 感染においては Th 応答、CTL 応答が他のウイルス感染と比べ弱いと考えられるが、この原因として HCV の抗原性そのものが低い可能性、HCV 蛋白そのものが抑制性サイトカイン産生を刺激する可能性が考えられ、実際それを支持する結果も得られている。また、HCV 感染者では樹状細胞のアロ刺激能が低下していること、CD86 の発現、IL-12産生能が低下していることが報告されており、HCV 感染では樹状細胞機能の低下により Th 応答、CTL 応答の抑制が、持続感染の原因となっている可能性がある。どのような機序により樹状細胞機能が低下するのか、今後詳細に検討する必要がある。

HCV 感染に対するワクチン療法の可能性

ウイルス感染に対する免疫応答の研究目的の 1 つとして

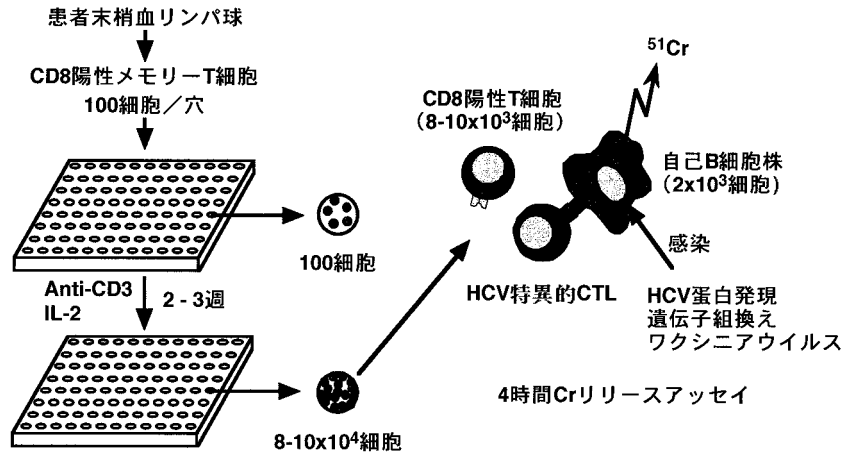
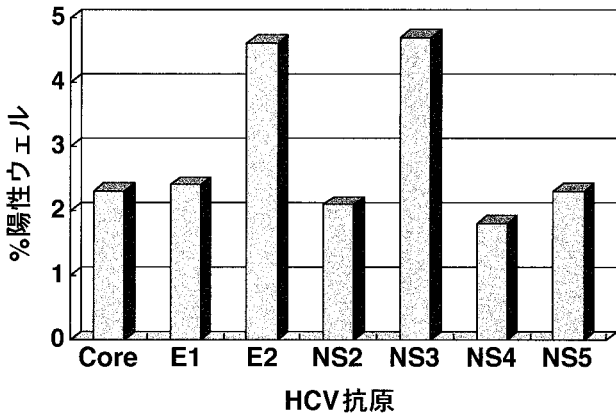


図7 HCV 特異的 CTL ライン化とアッセイ法



Patient's HLA: A*0206, 2402, B*5201, 5901, Cw*0102, 1202

図8 限界希釈法による HCV 特異的 CTL のライン化

ワクチンの開発がある。感染予防の目的では、中和抗体誘導を目標としたワクチンが用いられるが、HCV 特異的中和抗体の認識する HCV の領域にはアミノ酸変異が多く、ワクチンがある HCV クローンには効果があっても、その他のクローンの感染は予防できないことが報告されている。ヒトにおける HCV 汚染グロブリン製剤による集団感染症例での Th 応答の研究、ヒトにおける針事故による HCV 感染における CTL 応答の prospective study、チンパンジーの HCV 感染実験における細胞性免疫応答の検討から、HCV 排除には強い Th 応答、CTL 応答が重要であることが明らかにされている。従って、HCV 感染に対するワクチンとしては、強い Th 応答、CTL 応答を誘導するようなワクチンが重要と考えられ、このようなワクチンは新たな感染に対するワクチンとしてよりも、むしろ、持続感染者のウイルス排除を目的とした治療的ワクチンとして有用と考えられる。このような目的のワクチンとしては

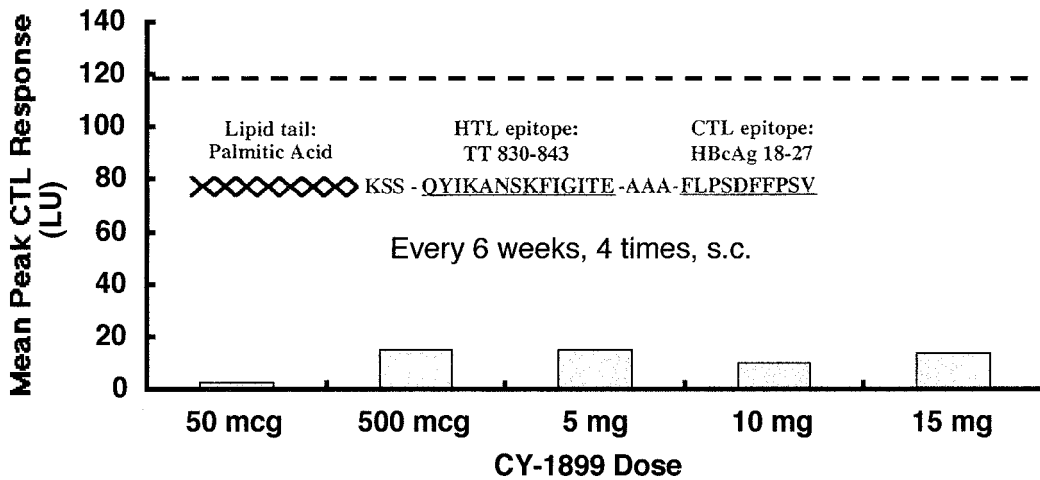


図9 B型慢性肝炎患者における HCV ワクチン CY-1899 に対する CTL 応答 (Heathcote et al. Hepatology 1999 ; 30 : 531)

HCV 特異的 CTL エピトープペプチドあるいは Th1 エピトープペプチドあるいはそれらを結合させたものと細胞性免疫応答を誘導しやすいアジュバントあるいはキャリアからなるワクチン, HCV 遺伝子をコードするウイルスベクター, HCV 遺伝子の DNA プラスミドがある。これまでの研究から HCV の抗原性は強くなく, HCV 蛋白には免疫抑制的に作用する領域も存在することが明らかになっている。HCV ワクチンの実用化には多様な HLA に対応する CTL エピトープ, Th エピトープの同定, 免疫抑制的に作用する領域の同定など解決すべきことが多数ある。実際, これまでに報告されている HCV ワクチンの動物実験では, Th 応答, CTL 応答の誘導は弱く, 実用化にはほど遠い成績である。

治療的ワクチンとしては B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染に対する HBV コンポーネントワクチンが先行している。このワクチンは白人に多い HLA-A2.1 拘束性の HBV 特異的 CTL エピトープペプチドと強力な Th エピトープである破傷風トキソイドの Th エピトープペプチド, キャリアとして CTL 誘導をサポートすることが知られているパルミチン酸誘導体を結合させたものである。このワクチンは HBV 陰性の健常者では十分な CTL 応答を誘導するが (図 9 の破線), B 型慢性肝炎患者では CTL 応答の誘導は抑制されており, 同様な問題は C 型慢性肝炎患者に

対する HCV ワクチン投与でも生じると考えられ, 肝炎ウイルス持続感染者における肝炎ウイルスに対する免疫応答の抑制をどのようにすれば解除できるかという問題も今後の研究の重要な課題である。

おわりに

医療器具のディスポーザブル化, 輸血製剤への HCV スクリーニングの導入で新たな HCV 感染は激減し, C 型慢性肝炎に対するインターフェロンの導入で投与を受けた約 30% の患者ではウイルスが排除されたが, 依然多数の HCV 持続感染者が存在し, 肝癌発生の危険に曝されている。これら患者の治療成績を向上させるには, HCV に対する細胞性免疫応答を増強させるような治療法の導入が必要である。

HCV 感染に対する免疫応答は抑制されており, これには様々な機序が関与している。1 つは全体に抗原性が低いことであるが, 同時にウイルス蛋白そのものが抑制性サイトカイン産生を誘導し, 樹状細胞機能を抑制することが明らかにされている。その他にも HCV に対する免疫応答に影響を与える因子が存在すると考えられる。HCV 感染に対する免疫応答の詳細な解析は新しい治療戦略の開発に重要である。