

平成12年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

課題番号				
<del>71253</del> 20000997A	71253	臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究	大野 泰雄	…… 1
20001001A	72001	日本におけるヒト肝細胞の保存・管理に関する基準の検討	小林 英司	…… 10
20001002A	72002	日本人の肝及び腎の薬物排泄能の個人差と遺伝子多型	遠藤 仁	…… 14
20001004A	72003	ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究 －産学共同のネットワーク作りをめざして－	松浦 成昭	…… 21
20000998A	72004	高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性、安全性評価法の確立	永森 静志	…… 25
20001003A	72005	ヒト薬物代謝酵素遺伝子多型簡易迅速定量法の臨床応用の新展開 －医薬品の適性使用と医療経済の効率化を目的として－	水柿 道直	…… 29
20001005A	72006	臓器移植患者におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量的解析を基盤とした免疫抑制剤の適正使用法確立に関する研究	乾 賢一	…… 39
20001000A	72007	エンドトキシン作用の種特異性の機構解明と、医薬品の有効性・安全性評価への応用に関する研究	棚元 憲一	…… 45
20000999A	72008	肝移植により摘出された患者肝細胞の保存方法の確立と病的細胞の分子生物学的解析	香坂 隆夫	…… 55

## 肝移植により摘出された患者肝細胞の保存方法の確立 と病的細胞の分子生物学的解析

主任研究者

国立小児病院  
小児医療研究センター  
香坂 隆夫

分担研究者

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| (1) . 京都大学大学院医学研究科     | 田中 紘一  |
| (2) . 東京大学医学部 小児外科     | 河原崎 秀雄 |
| (3) . 信州大学医学部外科学第一教室   | 川崎 誠治  |
| (4) . 株式会社 ユーエムエー研究開発部 | 多々納 俊雄 |

### 要旨

肝移植により摘出された肝組織の病的肝組織と細胞の解析というテーマで研究を行った。まず肝炎の発症増悪に対しての JAG1 遺伝子の関与を臨床基礎の両面にわたって解析し、NFκB 活性化、繊維細胞の産生する macrophage 活性化因子における Notch-JAG1 pathway の関与を証明した。劇症肝炎の再生結節中の肝細胞が細胞死から免れて増殖している機序を TUNEL 染色、Ki67 染色、アポトーシス関連蛋白、増殖因子、増殖因子レセプターなどを免疫染色、ウエスタンブロッティング、RT-PCR 等を用いて解析し、再生結節での肝細胞が細胞死を回避する機序を明らかにした。肝のバイアビリティの指標として endothelin-1 が役立つ結果を得、さらに臨床的検討として移植後の患者について、Epstein-Barr virus (EBV)感染と免疫抑制剤の関連を検討し、肝移植後 EBV 感染に対する治療指針を確立した。

### 1. 研究目的

前年度までの研究により、肝移植により摘出された肝組織の輸送手段および肝細胞の保存方法は確立されたので、今年度はこれらの検体を利用して、病的肝組織と細胞の解析という第二のテーマに添った研究を行った。病的肝の組織と細胞の検討では、1.JAG1 遺伝子と肝炎の検討を臨床基礎の両面にわたって解析し、2.劇症肝炎の再生結節の意義については病理的な面からの解析を行った。さらに肝細胞の生存という点から 3. 肝のバイアビリティと endothelin-1 との関係、4.薬物特に免疫抑制剤とEVウィルスとの関係について検討した。これらの研究はいずれも将来的には、肝の薬物代謝に役立つ情報を提供することを目標とした。

JAG1 遺伝子の異常によって生ずるとされるアラジール症候群は別名 Arterio-hepatic syndrome の名前で知られる通り、5 大症状のうち肝内胆道閉塞と肺動脈狭窄がその主たる症状をなしている。我々は、肺動脈狭窄や肝胆道疾患の単独の罹患患者について JAG1 遺伝子異常との関連を検索し、肺動脈狭窄患者 25 例には異常を見出せず、胆道閉鎖症の 10%に missense mutation を見出した。以上の結果を踏まえ JAG1 遺伝子の検索の対象を肝炎に広げ、遺伝子多型も含め、その異常遺伝子発現率を肝炎なしのグループと比較検討し、JAG1 遺伝子の肝炎への関与を疫学的に明らかにすることを第一の目的とした。新生児期、乳児期発症の肝炎は、大部分がウィルス感染由来としても肝炎への移行を決定する要因は不明であり、経過も遷延するものや、劇症化するものまで種々さまざまな経過を示す。これらの原因不明の肝炎および劇症肝炎について JAG1 遺伝子異常の有無について検討した。この調査により個々人の肝炎易発症性の要因について解析し、肝炎の発症を内因の方向より明らかにすることを第二の目的とした。

この研究の基礎医学的裏づけとして JAG1 遺伝子が肝炎の発症進展に果たす役割の解明を試みる。JAG1 遺伝子と肝炎との関連は、NFκB 活性化における Notch-JAG1 pathway の関与、繊維細胞から放出される macrophage 活性化因子について検討する。とくに繊維細胞より放出される macrophage 活

性化因子は未同定物質であるが、肝硬変の進展を促進する因子として興味もたれる。肝硬変症の繊維化へ移行した病態では、保存的療法以外に積極的な治療方法がないのが現状である。macrophage 活性化因子の同定と JAG1 の制御機構を利用して肝硬変への進展を防ぐ治療法を確立することが期待し得る。

劇症肝炎に対し、海外においては肝移植が積極的に行われ、本邦においても同疾患に対し生体肝移植が行われている。しかし劇症肝炎は内科的治療を行った場合生存率が 10~30%と予後不良であり、保存的治療の成績が悪い原因の一つとして、肝再生不全が挙げられる。肝細胞が広範に壊死してもそれに見合った肝細胞の再生が起こるなら血漿交換などで継ぐことで劇症肝炎患者は救命できるはずである。しかしながら血漿交換を行っていても再生が進まない例が存在する。一方劇症肝炎肝において、広範な肝壊死の中に再生結節を認めることがある。この再生結節中の肝細胞は何らかの機序により細胞死から免れて増殖していると考えられる。劇症肝炎における再生結節で肝細胞死、増殖の機序を解析し、劇症肝炎における新たな治療の可能性について検討する。

移植肝のバイアピリティは直接移植成績に影響を与える因子であるが、これを移植前や移植直後に評価することは難しい。血清や尿から簡便に肝のバイアピリティを評価するパラメータとして、血管拡張因子の一つであるエンドセリン 1(ET-1)が注目されている。そこで、ET-1 が移植肝のバイアピリティを反映しているか否かおよびその評価基準を確立する目的での検討をおこなった。

持続 Epstein-Barr virus (EBV)感染と免疫抑制剤の血中濃度は密接に関連している。肝移植後 EBV 感染に対する治療戦略を確立するために、肝移植後 EBV 感染の有無と活動性の診断に分子生物学的手法を用いたウイルス学的モニタリングの手技を確立しその臨床的意義を検索した。持続 EBV 感染と移植後免疫寛容現象の関係を明確化するため肝移植後の EBV 感染患者における治療法とくに免疫抑制療法との関連について検討した。

## 2. 研究方法

### 1). JAG1 の遺伝子の臨床調査

胆道閉鎖症 92 例、小児期発症の肝炎 45 例、アラジール症候群 42 例、および肺動脈狭窄のみの心疾患患者 24 例を対象とした。JAG1 遺伝子と肝炎に関する臨床的研究では、遺伝子検索に対する同意は倫理委員会の承認を得た informed consent の書式にもとずき書面でおこない、保護者の了解のもとに検査をおこなった。これらの患者の末梢血を検体とし、以前に報告した方法で DNA の抽出を行い、SSCP と cloning sequence 法により異常の有無を確定した。これらの検体採取にあたっては当院の倫理委員会の規定および許可条件に基づき、保護者または本人の了解を書面で得た。今回検討したアラジール症候群 42 例の中に早期より発生し、胆道閉鎖症と臨床的に鑑別不能な予後不良例が存在する。このような臨床症状を呈するアラジール症候群をとくに区別し early aggressive type としてその 8 例について検討した。

### 2). JAG1 遺伝子の炎症性 cytokine の産生と肝繊維細胞が放出する macrophage 活性化因子におよぼす効果

JAG1 の遺伝子と炎症性 cytokine の関連を調べるための実験には、肝細胞樹立株である Huh7 と胆管細胞の樹立株である Hucct1 を使い、TNF の刺激下で IL-8、IL-6 の産生量を比較した。この系に Free の JAG1 蛋白を固相および液相で添加するか、JAG の遺伝子を細胞内に導入して、cytokine の産生あるいは、NFkB の活性化、IL-8 の産生活活性化は luciferase assay を行った。繊維細胞（皮膚および肝、腎）および樹立された繊維芽細胞株（3T3、KMST など）を用いて研究をおこなった。マクロファージ側の細胞としては THP-1、A THP-1、U937 を用いた。

### 3). 劇症肝炎における再生結節における肝細胞死、増殖の機序解析

対象は 1992 年より生体肝移植を行った劇症肝炎 16 例である。その内訳は 18 歳以上の成人が 5 例、小児が 11 例で、患者平均年齢が 11.7±11.5 歳であった。性別では男が 6 例、女性が 10 例。原因では薬剤性 2 名、B 型肝炎が 2 名、原因不明が 12 例。亜急性型が 15 例、急性が一例であった。ドナーとレシピエントの血液型適合性は 3 例が適合、残り 13 例が一致であった。全例脳症の症状を有しており、術前に血漿交換ないし、血液交換を行っている。一例が術後 8 ヶ月で薬剤性自己免疫性溶血性貧血が原因で死亡したが、全体では 5 年生存率は 93.3%であった。

これらの患者の摘出肝の病理標本を用いてアポトーシスおよび増殖の機序を主として細胞染色を用いて調べる。再生結節中の肝細胞のアポトーシス細胞、増殖細胞をそれぞれ断片化した DNA の末端

を標識する TUNEL 染色、静止期以外の細胞回転にある核を染める Ki67 染色で確認しその細胞数を計測し比較する。さらにアポトーシス関連蛋白(Bad, Bax, Bclx, bcl2 など)、増殖因子(HGF, TGF, etc)、増殖因子レセプター(c-Met, EGFR)などを免疫染色、ウエスタンブロッティング、RT-PCR 等を用いてその発現を比較検討した。

#### 4). 移植肝のバイアピリティに関する研究

動物実験はイヌ、サルを用いた split liver transplantation(SLTX) を施行し、その際血清を採取し ET-1 の測定した。胆道閉鎖症患児の血清 ET-1 は保護者の許可の得られたものに付きルーチン検査の残血清をもちいた。

#### 5). 肝移植後の免疫抑制剤投与中に生ずる Epstein-Barr virus (EBV) 感染に対する治療戦略

対象は 1999 年 4 月から 2000 年 9 月まで、190 例の生体肝移植レシピエントで、832 検体について real time 定量 PCR 法を行った。そのうち、上記の研究期間以前に生体肝移植後 EB ウイルス感染症 (EBVD) を発症し研究期間中に経過観察された長期経過例 14 例および研究期間中に EBVD を発症した急性期例 17 例の計 31 例を対象とした。

本検討期間中に生体肝移植を行った患者についてはコントロールとして移植 7 日前および 7 日後に採血した。EBVD の診断は臨床症状、血清学的所見、病理学的所見によった。real time 定量 PCR 法は末梢血 1ml を EDTA 採血後、Ficoll-Paque で単核球を分離し、QIAamp Blood Kit で DNA を抽出した。これを EBV ゲノムの BALF5 領域から生成したプライマーと蛍光プローベを用いてパーキンエルマー社 ABI prism 7700 自動定量 PCR 器で EBV ゲノムを定量した。ゲノム量は copy/ $\mu$ gDNA であらわした。

### 3. 研究結果

#### 1). アラジール症候群の臨床型と遺伝子異常型との関連および異常 mRNA の働き

アラジール症候群は現在までに検索しえた 42 例についての遺伝子検索の結果と臨床経過との関係をしらべた。アラジール症候群は全体的には予後良好とされているが、なかには 3 か月未満で急速に進行する病型を示し、胆道閉鎖症と鑑別のつかないものもある。このようなアラジール症候群を early aggressive type と命名し区別した。遺伝子異常型とこの臨床型を比較すると、early aggressive type は、sporadic で DSL region を欠いている例が有意に多いことを示した。アラジール症候群の遺伝子異常を有する患者について mRNA の発現を調べ異常 mRNA の発現を確認した。これらの発現した異常 mRNA の働きを調べるため 7 種類の mRNA を合成し、これを用いて co-transfection, co-culture 法により、HGF の発現との関連をしらべた。Wild type および mutant の JAG1 遺伝子、stable HGF を double transfection した Cos7 細胞を用いて、HGF の activity を luciferase assay によって測定した。その結果 JAG1 遺伝子の異常の型により、HGF の luciferase activity、RNA の発現量に相違が認められ、wild type はもともと強く抑制し、mutant では CR>TM>EGF>DSL の順に抑制の効果が弱くなる傾向が認められた。さらに Notch との関連をしらべ Notch2 と HGF の発現が相関していることを見出した。(Figure 1) early aggressive type of AGS に DSL の 5'側に異常があり、DSL を欠いておりかつ sporadic な例が多いことを裏づける結果が得られた。

#### 2). 新生児、乳児期発症の肝炎および胆道閉鎖症の JAG1 遺伝子検索

胆道閉鎖症患児 92 例の JAG1 遺伝子検索を行った。家族性に発症している 1 家系では胆道閉鎖症例が叔母と患児に見出された。この例は祖父より JAG1 遺伝子異常をうけついでおり、この JAG1 遺伝子異常のない家系での胆道閉鎖症の発症はなく、この祖父の同胞は 8 人中 6 人が若年で死亡している。ついで孤立性に発症した 88 例の胆道閉鎖症の遺伝子検索を行い、7 例の missense mutation による JAG1 遺伝子異常例を見出した。うち 5 例が移植に移行していた。このことより重症例の胆道閉鎖症に JAG1 遺伝子異常例が多いことが示唆された。

また新生児期、乳児期発症の肝炎について検討した結果、JAG1 遺伝子の mutation は、45 例中に 8 例 (17.8%) にみられ、このうち 1 例のみ insert mutation で、7 例は missense mutation であった。この 7 例の missense mutation の異常部位の分布を調べた所、5 例は CR region に集中していた。50 例の正常人に対して、JAG1 遺伝子の mutation の検討も行ったが、患者と同じ型の mutation は見い出されなかった。アラジール症候群および胆道閉鎖症、新生児、乳児期発症の肝炎の遺伝子異常例の JAG1 遺伝子上の分布を図に示した。DSL region の異常は一般的に重い疾患に発現し、軽いものは CR region に多いことが示される。(Figure 2)

### 3). JAG1 遺伝子の肝炎発症におよぼす機序に関する基礎的検討

肝炎と JAG1 遺伝子および蛋白の関連を明らかにするため、肝細胞における炎症機序におよぼす JAG1 の効果について検討した。肝細胞樹立株である Huh7 は TNF $\alpha$  の刺激により IL-8 産生が増大する。JAG1 蛋白は、Huh7 での TNF $\alpha$  の刺激による IL-8 産生を抑制する。さらに肝細胞内の情報伝達機序として Notch-JAG1 pathway と、NF $\kappa$ B による変化について調べ、p50/p65 の gel shift assay によって、NF $\kappa$ B 系を介して Notch-JAG1 pathway が調節因子として働いている結果を得た。さらに JAG1 遺伝子の missense mutation についての検討を行い、変異部位によって、wild type と異なる反応を示すことを確認した。(Figure 3) missense mutation 蛋白を産生する JAG1 遺伝子は、免疫応答細胞や細胞内情報伝達機構に wild type とは異なる signal を送るものと考えられた。

3T3 を始めとする繊維細胞は THP1 に対し増殖とサイトカインの産生増強を促す因子を放出し、用量依存性に増大する活性を示す。JAG1 蛋白は産生抑制作用を示し、液相と固相の比較では固相の方が効率が高い。この活性は 3T3 細胞との co-culture で最大の効果を示し、mutant の作用は中間の値を示す。JAG1 はこの作用を抑制し、3T3 に transfection することによりこの因子の活性は完全に消失する。(Figure 4) JAG2 ではこの作用はない。

繊維芽細胞によるマクロファージ活性化因子の産生は、KMST、腎および皮膚由来の繊維細胞からの培養上清にも認められる。繊維芽細胞より産生される macrophage 活性化因子は、同定は出来ないが、JAG1 遺伝子が繊維芽細胞の macrophage 活性化因子の産生抑制に関連していることは、肝の繊維化を制御するものとして重要と考える。

### 4). 劇症肝炎における再生結節における肝細胞死、増殖の機序解析

肝移植の際摘出された劇症肝炎肝を用いて再生結節と、非再生結節部あるいは再生結節がない検体とを比較することにより、再生結節中の肝細胞に特異的に発現している因子を検索する。劇症肝炎での細胞死にはアポトーシスが関与していると考えられている。そこでまず、劇症肝炎標本を用いてアポトーシスの細胞を調べた。まず再生結節中の肝細胞のアポトーシス細胞、増生細胞をそれぞれ断片化した DNA の末端を標識する TUNEL 染色、静止期以外の細胞回転にある核を染める Ki67 染色で確認しその細胞数を計測した。TUNEL, Ki67 labeling index 両者とも正常肝に比し有意に高かった。また Ki67 labeling index は肝細胞よりも、再生結節周囲の偽胆管様細胞が有意に高かった。

また最近 HGF などの増殖因子、あるいは EGF のレセプターからのシグナルが細胞に作用すると抗アポトーシスに働く因子である Bclxl の発現を増強させるという報告がある。また劇症肝炎の実験モデルで HGF を導入することでその生存率が上昇することが示されており再生結節での肝細胞が細胞死を回避する一つの機序になっていることが推定される。HGF は測定できた範囲ではこれまでの報告どおり、肝組織中、血清中とも高濃度に存在していたがそのレセプターである c-Met は再生結節では蛋白レベルの発現をほとんど認めなかった。偽胆管様細胞では c-Met は強く発現していた。TGF $\alpha$  は再生結節中の肝細胞に正常肝や肝硬変肝に比べ高濃度に存在し、そのレセプター EGFR は再生結節に強い発現を認めた。一方肝細胞の増殖抑制因子である、TGF $\beta$  は非再生結節で強く発現を認めた。アポトーシス抑制因子は bcl-2, bcl-xl とも再生結節肝細胞に正常肝に比し高い発現を認めた。アポトーシス誘導因子である BAX はわずかであるが、正常肝より再生結節に高い発現を認めた。

### 5). 肝のバイアビリティのパラメータとしてのエンドセリン 1 (ET-1)

イヌ、日本サルを用いた生体肝移植の動物実験で 24 時間以上生存群は 24 時間以内死亡群に比較して、移植後 3 時間目の血清 ET-1 が有意に低かった。胆道閉鎖症患児の肝門空腸吻合術成功例は失敗例に比較して、術後 2-3 ヶ月目の血清 ET-1 が有意に低かった。胆道閉鎖症の肝移植後 1 週間目の血清 ET-1 は移植直前の血清 ET-1 に比較して有意に低かった。(table1-4) 以上の結果より、血清 ET-1 は移植肝バイアビリティの指標となり得ると考えられた。

### 6). Epstein-Barr virus (EBV)感染症と免疫抑制剤、肝不全による免疫学的異常との関連

肝移植後認められる EBV 感染症の治療戦略を決定するため、免疫抑制剤、肝不全による免疫学的異常との関連について検討した。

14 例の EBVD による長期経過例の結果ではタクロリムスを毎日投与継続している症例と中止した症例の期間中最高コピー数を比べると有意差をもって中止症例のコピー数が低かった。コピー数とタクロリムストラフ値との間には正の相関をみとめ、タクロリムス投与量が少ない方が EBV DNA コピー数が少ない傾向があった (Figure5,6)。期間中の死亡例はなかった。

17 例の急性期例では症状は発熱 5 例、上気道炎症状 2 例、下痢 1 例、腹水貯留 3 例、リンパ節腫

脹 3 例、PTLD3 例であった。リンパ節腫脹と PTLD の 6 例では 1 例をのぞいて移植から 9 ヶ月から 3 年後に発症したが、その他の症例は 1 ヶ月から 11 ヶ月後と早期に発症していた。タクロリムスは 7 例で投与中止し、6 例で減量した。5 例が死亡したが EBVD による死亡例はなかった。EBVD 発症前のコピー数は 0 から 26 コピー、中央値 0 コピー、最高値は 82 から 537,064 コピー、中央値 15968 コピー、回復期最低値は 0 から 8,900 コピー、中央値 33 コピーであった。全例で症状の改善に応じてウイルス量は速やかに減少した。

#### 考察

種々の研究報告から JAG1 遺伝子の働きは、発生段階の細胞の分化増殖に関連しているばかりか、生後の個体維持のためにも重要な役割を演じていると考えられる。JAG1 遺伝子およびその産生物は、免疫担当細胞の教育にも関連していることが示され、生後の役割が免疫学的にも注目されている。今回の調査はこれらの研究成果を踏まえ、生後生ずる疾患について検討を進めた。疾患対象は肝内胆道閉鎖と肺動脈狭窄がアラジール症候群の主たる症状であることより、まず両疾患の JAG1 遺伝子異常について検索した。その結果、肺動脈狭窄では異常は見出せず、胆道閉鎖症に異常を見出したことより、さらに新生児期乳児期発症の肝炎に検討を進めた。この肝炎においても、JAG1 遺伝子の mutation、特に missense mutation が高頻度に見られ、症状との関連に乏しいことより易発症性に関与していると考えた。またこの肝炎の missense mutation が CR region に集中しているという結果は、アラジール症候群における missense mutation が 5' 側に多いことと対をなしており、興味を持たれる。

肝炎を引き起こす要因としての Notch-JAG1 pathway の働きをしらべ、Huh7 細胞を TNF $\alpha$  で刺激し IL-8 を産生させる系で、JAG1 蛋白の IL-8 産生抑制効果を認めた。さらに JAG1 遺伝子は NF $\kappa$ B の活性化を阻害し、IL-8 の産生を抑制することを NF $\kappa$ B の gelshift assay、IL-8 の luciferase assay によって確認した。

ついで肝硬変への進展のメカニズムを JAG1-Notch pathway との関連で検討した。この研究は肝硬変時における繊維化の進展を繊維細胞より産生される macrophage 活性化因子を介した系により説明しようとするものである。繊維細胞の産生系では JAG1 遺伝子および産生物がその抑制に関与していることを明らかにした。若年期に発した慢性肝炎や胆道閉鎖は加齢とともに肝硬変へ移行し不幸な転帰となることが多いが、成人の肝炎の大部分を占める B 型、C 型肝炎もその予後はまた肝硬変への移行により決定される。これらの肝疾患では、virus 自身の変異が病状に関連するとされ、C 型肝炎においてはその subtype による interferon の効果の相違が予後に大きく関連していることが明らかとされている。われわれの研究は肝炎の発症の引きがねとなる外からの要因の機序解明でなく、内因の側から肝炎進展機序を明らかにしようとするものである。繊維芽細胞より産生される macrophage 活性化因子そのものの同定を行い、この因子の肝硬変の病態に占める役割を病理学的、免疫学的に明らかにすることが今後の研究課題である。

劇症肝炎では必ずしも肝細胞は再生不全の状態にあるわけではないことが分かった。また劇症肝炎肝における再生結節は TGF $\alpha$ -EGFR の系により増殖刺激を受けていると考えられた。劇症肝炎肝では HGF は肝細胞よりもむしろ偽胆管様細胞に作用していると推定された。このことよりマウスの劇症肝炎モデルの HGF による救済のように、臨床において HGF の投与が肝移植が必要であるような劇症肝炎患者に有効であるかどうかは疑問がある。しかしながら偽胆管様細胞は肝臓の幹細胞ではないかという報告もあり、また今回の研究でも偽胆管様細胞は劇症肝炎肝における一番の増殖画分であり、今後偽胆管様細胞の果たしている役割に関してもさらに研究を進める必要があると思われた。

ET-1 が移植肝バイアピリティの指標として有用であることを示す臨床的データおよび動物実験の結果が得られたが、このことを確認するには 1) ET-1 アンタゴニスト BQ123 の投与によって移植成績、2) ET-1, BQ123 の肝内および肝外の局在を明らかにし、ET-1 が移植肝に及ぼす作用などの課題を検討する必要がある。

これまでも欧米を中心に肝移植後の EBV DNA 定量もしくは半定量法の重要性が報告されてきた。real time 定量 PCR 装置を用いた非侵襲的、簡便、正確、迅速な EBV DNA 定量法である。コントロール例では術前は 76 コピー、術後は 206 コピーが最高であった。我々は個々のコピー数も重要であるが相対的な変化をとらえることがより重要であると考えている。PTLD や EBVD の急性期、OKT3 などの強力な免疫抑制療法を必要とする場合には週に 2 回、EBV DNA 量をモニターし、免疫抑制療法や抗ウイルス療法を調節することで良好な結果を得てきた。PTLD を除く EBVD は全例移植後一年以内に発症していたため、EBVD の high-risk 患者をとらえるためには移植後一年間は EBV DNA 量を

以内に発症していたため、EBVD の high-risk 患者をとらえるためには移植後一年間は EBV DNA 量をモニターする必要がある。EBV DNA コピー数からみた EBVD に対する暫定的な治療方針を示す。まず EBVD を疑わせる症状が出現したり強力な免疫抑制療法が必要になった場合に連続モニターを開始する。10<sup>2</sup> コピー以下の場合には 10-20mg/kg/day のアシクロビル経口投与を開始する。10<sup>2</sup> コピーを越えたならアシクロビルの投与量を増量し免疫抑制剤減量を開始する。10<sup>3</sup> コピーを越えたときには肝機能に注意しながら免疫抑制剤をできるだけ減量し 30-60mg/kg/day のアシクロビル静脈内投与を開始する。38℃以上の高熱やリンパ節腫脹をみとめる場合はタクロリムスは直ちに中止し、アシクロビルに加えて 10mg/kg/day のガンシクロビルまたはピダラビンの投与を開始する。EBV 高力価免疫グロブリンも 5 日間投与する。このプロトコールに沿って管理する事で PTLD の発症を見ていない。EBV DNA コピー数が多いほど PTLD の危険性が高まるとされているが、EBV による腫瘍化のメカニズムとして悪性化に関連したある分子発現の報告もありさらに検討を要する。

EBVD を発症した患者に関しては免疫抑制剤を減量する方針で治療を行い 4 例については結果としては軽快し、長期にわたって免疫抑制剤を中止できている。一方、EBVD を伴いながら拒絶反応を有する症例では、免疫抑制剤は減量できず、注意深い管理を要している。長期経過例についてタクロリムスのトラフ値と EBV DNA コピー数との間には正の相関が見られた。今後は免疫抑制の適正量を把握するために EBV 特異的 cytotoxic T cell とドナー特異的 cytotoxic T cell による評価が必要となろう。

## 5. 結論

1). JAG1 遺伝子とアラジール症候群の phenotype との関係では DSL region の 5'側を欠きかつ Sporadic な例に重症例が認められた。JAG1 遺伝子の mutant の変異部位により hepatocyte growth factor 発現量に相違が認められ、Notch との関連でしらべると Notch2 と HGF の発現が関連していることが示された。

2). 胆道閉鎖症の JAG1 遺伝子異常の検索では、92 例中 9 例に異常が認められ、すべて sporadic で missense mutation であり、このうち 7 例はすでに移植例であった。JAG1 遺伝子異常は予後不良例に偏位していた。新生児肝炎においても、45 例中 9 例に missense mutation を見出した。

3). JAG1 遺伝子の変異と肝炎発症に関連している基礎医学的結果として肝細胞樹立株において JAG1 は NFκB の活性化を抑制すること。繊維芽細胞の産生するマクロファージ活性化因子は JAG1 蛋白、JAG1 遺伝子によってこの因子の産生は抑制されること。の二つの事実が確認された。以上の臨床的、基礎的機序より JAG1 遺伝子およびその蛋白は肝炎の発症・進展に関与していると考えられた。胎生期には HGF を介して、生後は NFκB がマクロファージ活性化因子の産生抑制を介して肝炎の発症・進展に JAG1 は関与していると考えられる。

4). 劇症肝炎の肝臓組織の解析では TUNEL, Ki67 labeling index 両者とも正常肝に比し有意に高く、増殖因子やそのレセプター、アポトーシス関連蛋白の発現を免疫染色、ウエスタンブロッティングなどで検討した結果、Apoptosis 関連蛋白では今回の研究では抑制因子、促進因子両者とも正常肝に比し発現が高かった。

5). 移植肝のバイアビリティは直接移植成績に影響を与える因子である。血清 ET-1 は移植肝バイアビリティの指標となる可能性を示す結果を得た。

6). 免疫抑制剤投与患者の EBVD の治療基準を設定した。real time PCR 法による EBV DNA コピー数の定量は肝移植後 EBVD のモニタリングおよび治療に有用であった。今後は EBV による腫瘍化メカニズムの解明や EBV 特異的 cytotoxic T cell の検討が必要と考えられた。

## 6.研究発表

1.Miwa S, Hashikura Y, Mita A, Kubota T, Chisuwa H, Nakazawa Y, Ikegami T, Terada M, Miyagawa S, Kawasaki S. Living-related liver transplantation for patients with fulminant and subfulminant hepatic failure. Hepatology. 1999 Dec; 30(6):1521-6

2.Tadashi Matsukura, Akiko Yoki, Hiroto Egawa, Toyochiro Kudo, Shinji Uemoto, Tetsuya Kiuchi, Mayumi Kawashima, Yoshihiro Hirata, Hirokazu Tanaka, Kiyoko Kagajo, Koichi Tanaka. Significance of Serial Quantitative Real-Time PCR Monitoring of EBV Genome Load in Recipients of Living Donor Liver Transplantation. Transplantation 投稿中



3. Toyoichiro Kudo, Hiroto Egawa, Kiyotaka Kuzushima, Hiroshi Kimura, Tsuneo Morishima, Satoshi Ichiyama. Diagnostic Analyses of Epstein-Barr Virus Infection. *Clinical Chemistry and laboratory Medicine* 投稿中
4. Sakurai J, Ohata J, Saito K, Miyajima H, Hirano T, Kohsaka T, Enomoto S, Okumura K, Azuma M. Blockade of CTLA-4 signals inhibits Th2-mediated murine chronic graft-versus-host disease by an enhanced expansion of regulatory CD8+ T cells. *J Immunol* 164:664-669, 2000
5. Oki S, Otsuki N, Kohsaka T, Azuma M. Stat6 activation and Th2 cell differentiation driven by CD28 signals. *Eur J Immunol*, 30(5):1416-24, 2000
6. Yuan ZR, Kohsaka T, Kobayashi N. Linkage analysis and identification of deletion in Alagille syndrome gene. *Acta Paediatr Jpn.* 39: 647-52, 1999
7. Kohsaka Takao, Zeng-rong Yuan, Shu-xia Guo, Manabu Tagawa, Akio Nakamura, Miwako Nakano, Hideo Kawasasaki, Yukihiro Inomata, Koichi Tanaka, Jun Miyauchi. The significance of human jagged1 mutations detected in severe cases of extrahepatic biliary atresia. *Hum Mol Genet* 投稿中
8. Zeng-Rong Yuan, Takao Kohsaka, Mariko Okaniwa, Ikuo Nagata, Yusaku Tazawa, Mitsuhiro Ito, Hideo Kawarazaki, Yukihiro Inomata, Manabu Tagawa, Dong Kyu Jin, Noboru Kobayashi. Absence of DSL domain of the human jagged1 gene is associated with severity of the liver disease in Alagille syndrome. *Clinical Genetics* in press

Table 1. Serum endothelin levels at 3 hours after orthotopic living donor liver transplantation in dogs.

	n	3時間でのET-1 (pg/ml)
24時間以内死亡群	3	4.6 ± 0.59
24時間以上生存群	8	1.6 ± 0.55 (p < 0.05)

Table 2. Serum endothelin levels at 3 hours after orthotopic living donor liver transplantation in monkeys.

	n	3時間でのET-1 (pg/ml)
24時間以内死亡群	4	4.95 ± 0.40
24時間以上生存群	4	1.75 ± 0.46 (p < 0.05)

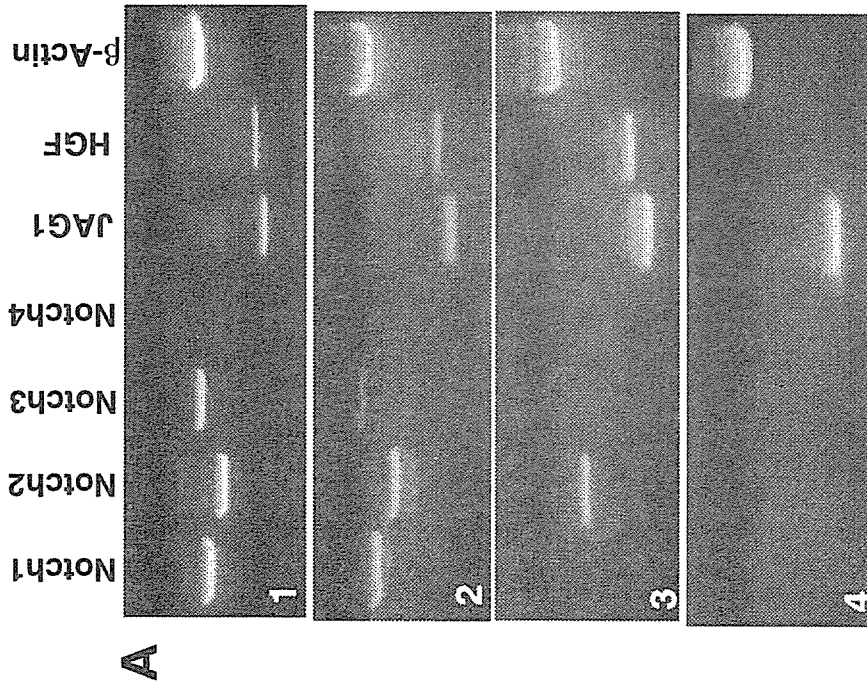
Table 3. Serum endothelin levels at months after Kasai procedure in successful or unsuccessful bile drained patients.

	n	ET-1 (pg/ml)
肝門空腸吻合成功例	12	2.0 ± 0.6
肝門空腸吻合失敗例	3	3.6 ± 0.3

Table 4. Serum endothelin levels before and after living liver donor liver transplantation in biliary atresia patients.

	n	ET-1 (pg/ml)
肝移植前	4	3.4 ± 0.3
肝移植後	4	1.9 ± 0.3

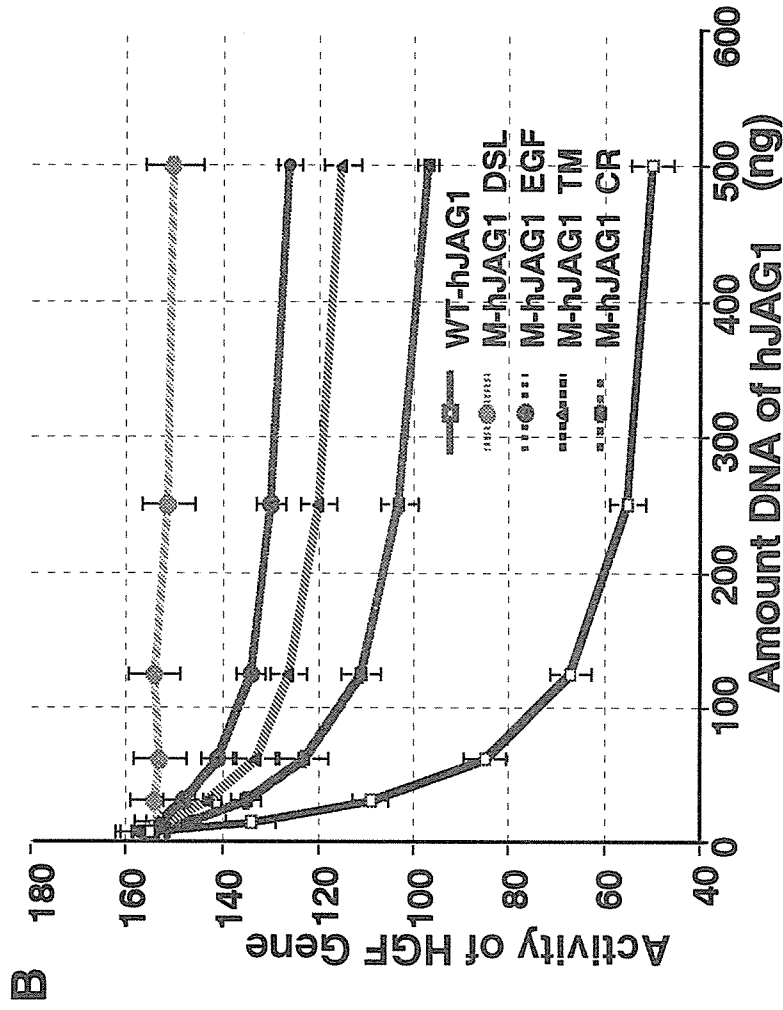
(p < 0.05)



**Figure 1a**

**The correlation between HGF expression alteration at mRNA Level and Notch.**

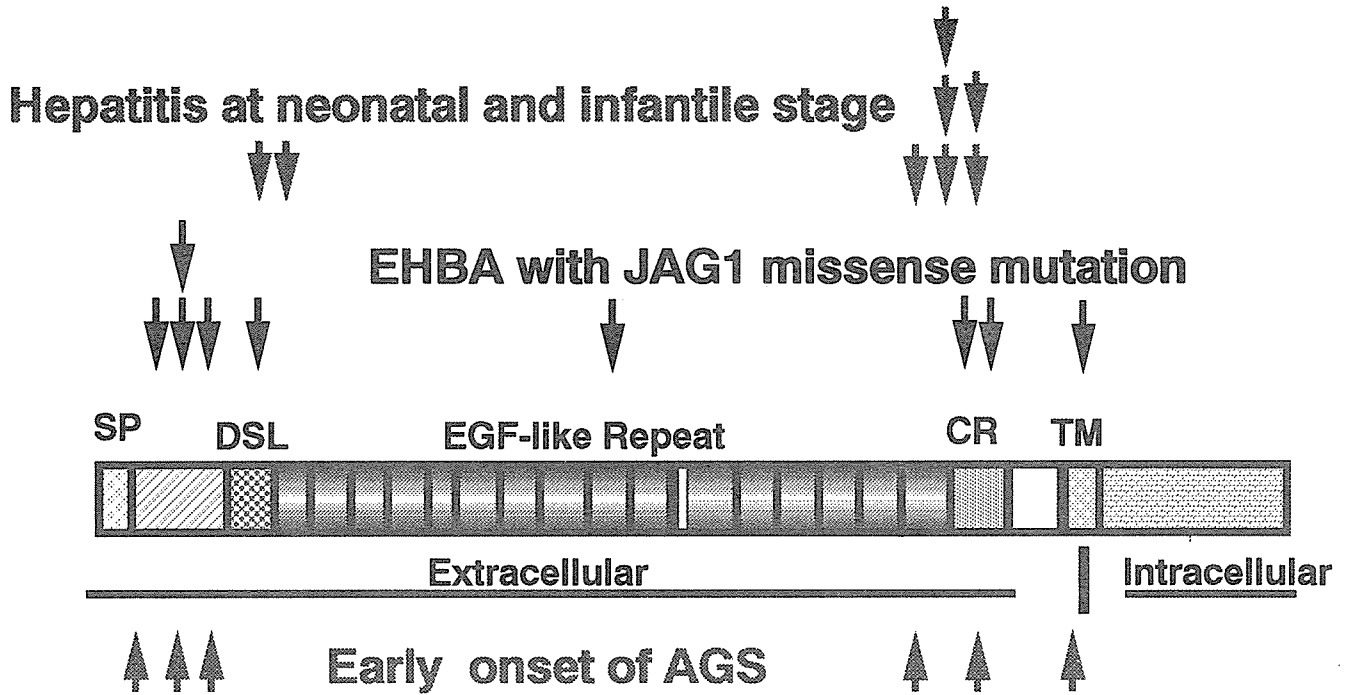
The MRC-5 cells were co-cultured with different transfected COS-7 cell and endogenous HGF expression in MRC-5 cell was detected by semiquantitative RT-PCR. The results showed HGF expressions at mRNA level were paralleled with Notch 2 expression(4).



**Figure 1b**

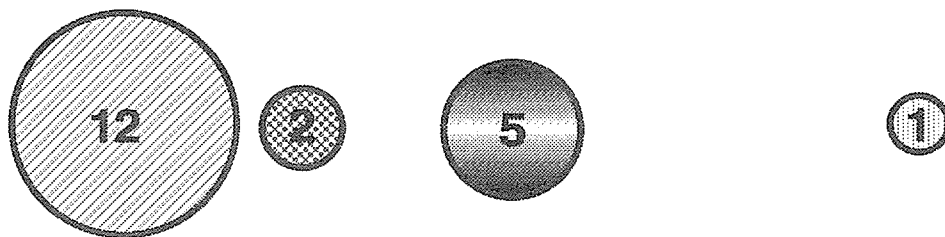
**The HGF luciferase activities are associated with the dosages and mutant types of hJAG1 gene**

The activities revealed a logarithmic response except for one mutant hJAG1 with DSL domain deletion. A sharp response of the HGF activity was induced by applying the hJAG1 DNA within 100 ng and reached to a near saturated condition of the HGF activity.



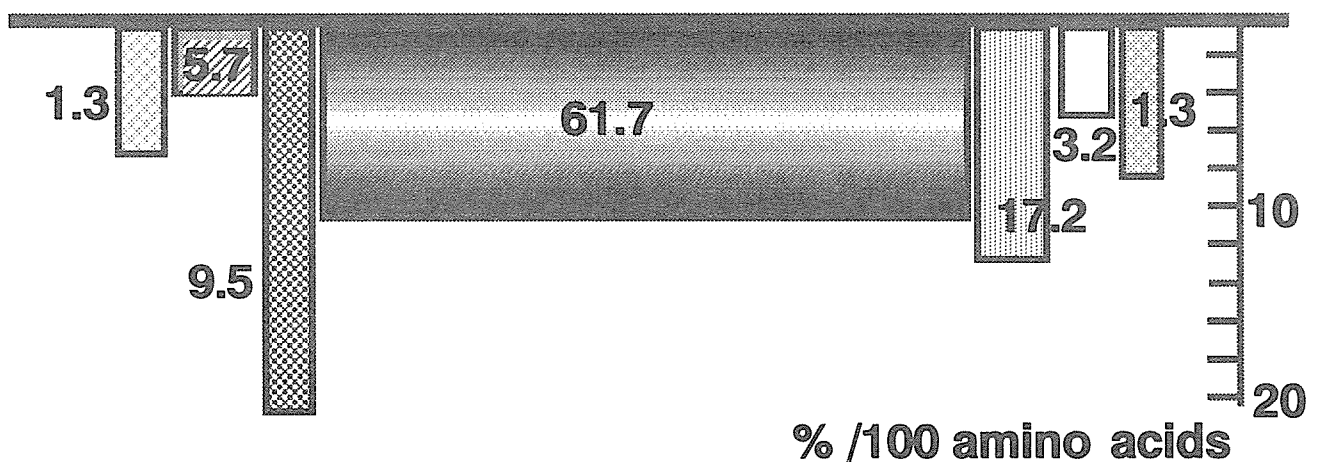
**Figure 2a**

The comparison of the mutation locus in EHBA with the JAG1 mutation and that of AGS. The arrows show the mutational loci of the EHBA cases with JAG1 mutation



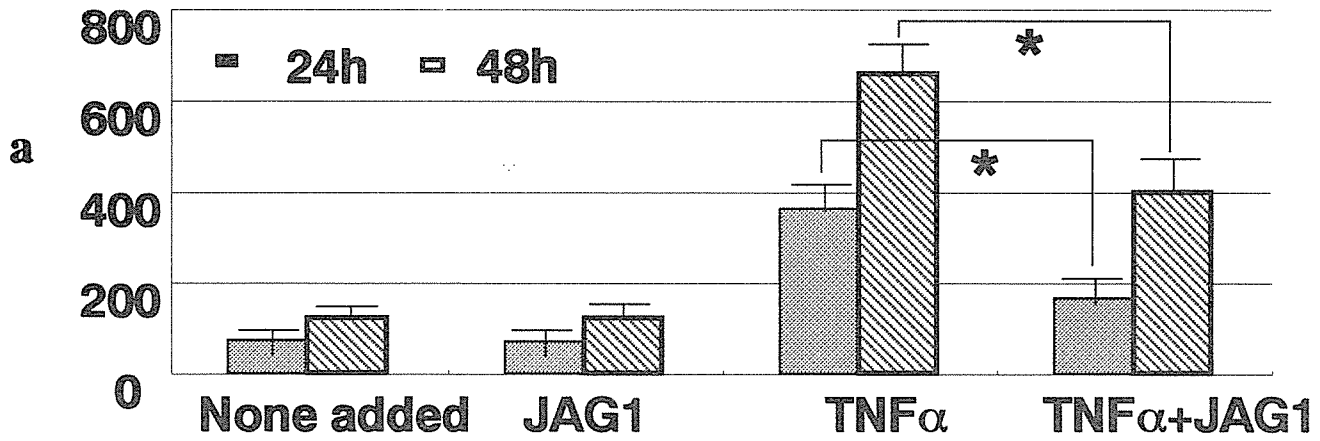
**Figure 2b**

**Number of AGS patients with missense mutation**

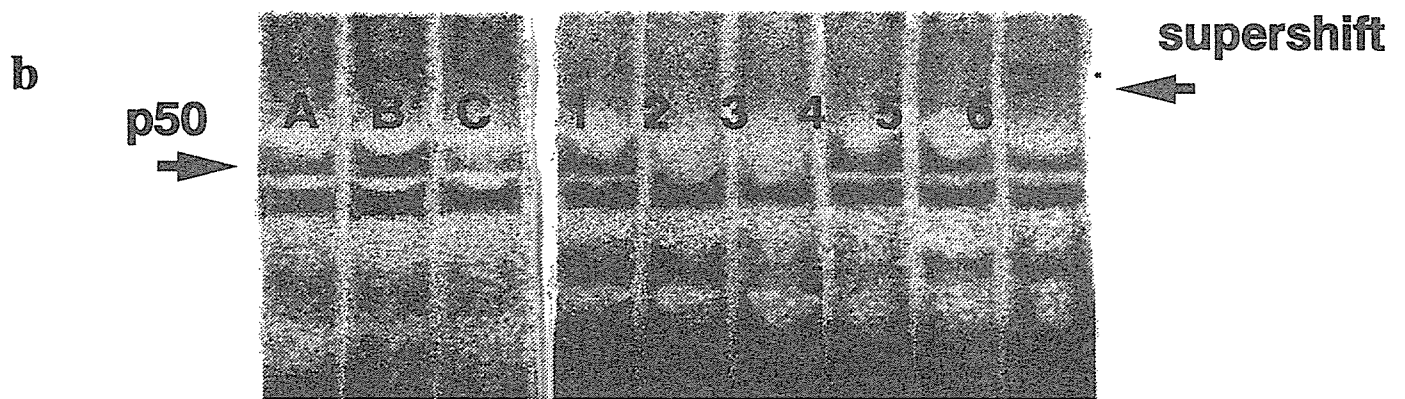


**Figure 2c**

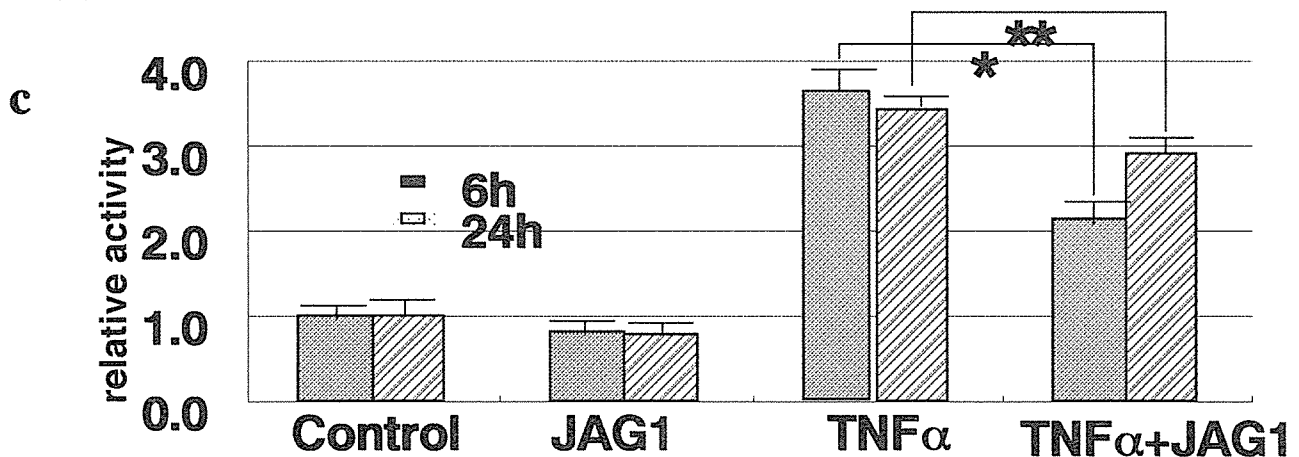
The ratio of AGS patients with other than missense mutation according to the location of JAG1



Huh7 cells were incubated for 24 (closed bar) and 48 hours (open dotted bar) without stimulation, with TNF-  $\alpha$  (500 pg/ml) and with TNF-  $\alpha$  +JAG1 (500 pg/ml + 0.5 $\mu$ g/ml) from left to right, respectively. \* Student t test significant difference,  $P < 0.01$



The electromobility shift assay (EMSA) of TNF-  $\alpha$  induced pattern for NF-kB binding in nuclear extracts from Huh7 cells. The left arrow indicates an NF-kB, p50 specific binding complex. The electromobility shift assay (EMSA) of the control sample without any stimulation shows some quantitative p50 specific binding complex (A). The increased band was observed when cell was stimulated with TNF-  $\alpha$  (500 pg/ml) (B), and decreased with the addition of JAG1 (0.5  $\mu$ g/ml) (C).



The promoter activity of IL-8 enhanced by TNF-  $\alpha$  (500 pg/ml) was significantly repressed by JAG1 (0.1  $\mu$ g/ml) at 6h. (closed bar) (\* $P < 0.01$ ) and 24h. (open dotted bar) (\*\* $p < 0.05$ ) with Student t-test.

**Figure 3**

**Human jagged 1 protein suppresses IL-8 production under stimulation of TNF- $\alpha$  in Huh7 cells with ELISA assay(a), Gel shift assay(b) and luciferase assay(c)**

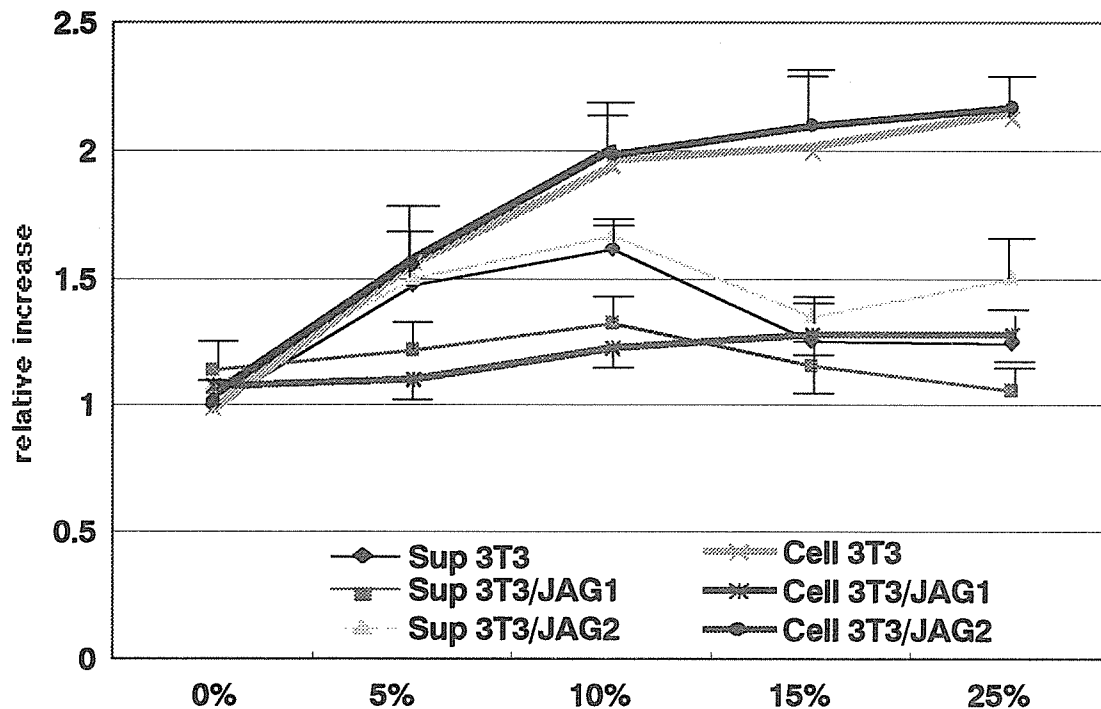


Figure 4a

The different dose dependent increase of cell proliferation (MTT) according to coculture with cells and supernatant

Sup; Cultured supernatant applied 5-25% of volume, Cell; the ratio of 3T3 to THP-1 cell and measured THP-1 cell proliferation. The data shows cell to cell interaction effects more efficiently than fluid phase reaction.

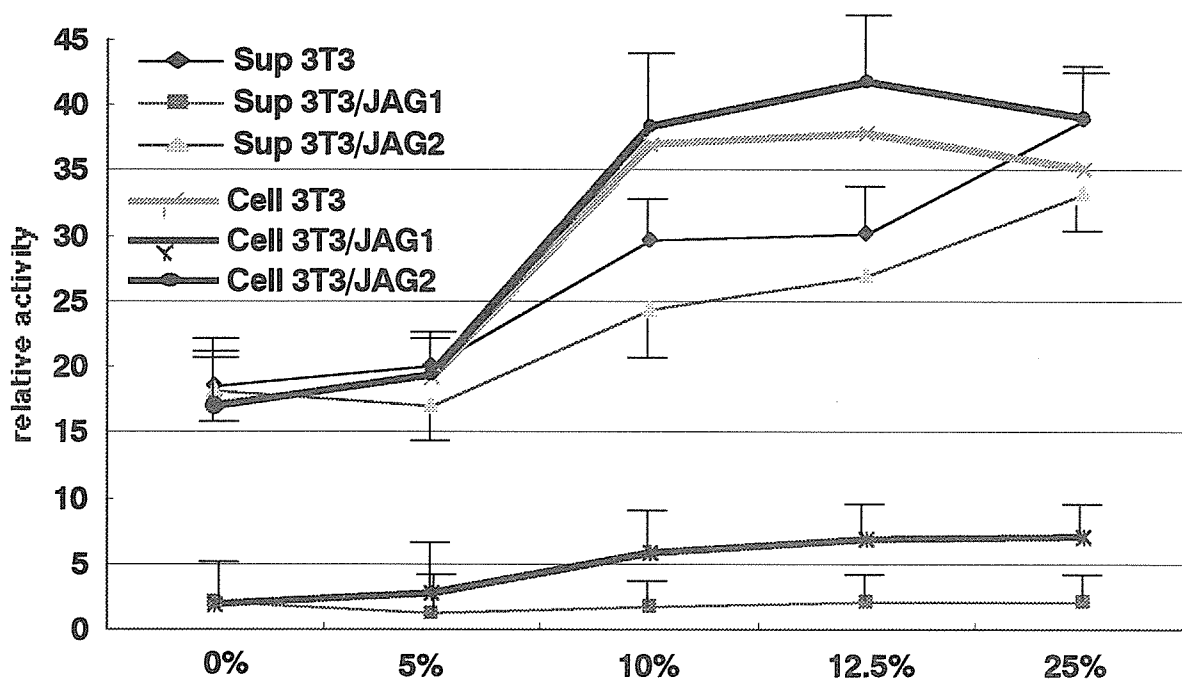


Figure 4b

The different IL-8 production by THP-1 according to JAG1 protein concentration and the ratio of 3T3 cell with or without JAG gene

Sup; Cultured supernatant applied 5-25% of volume, Cell; the ratio of 3 T3 to THP-1 cell.

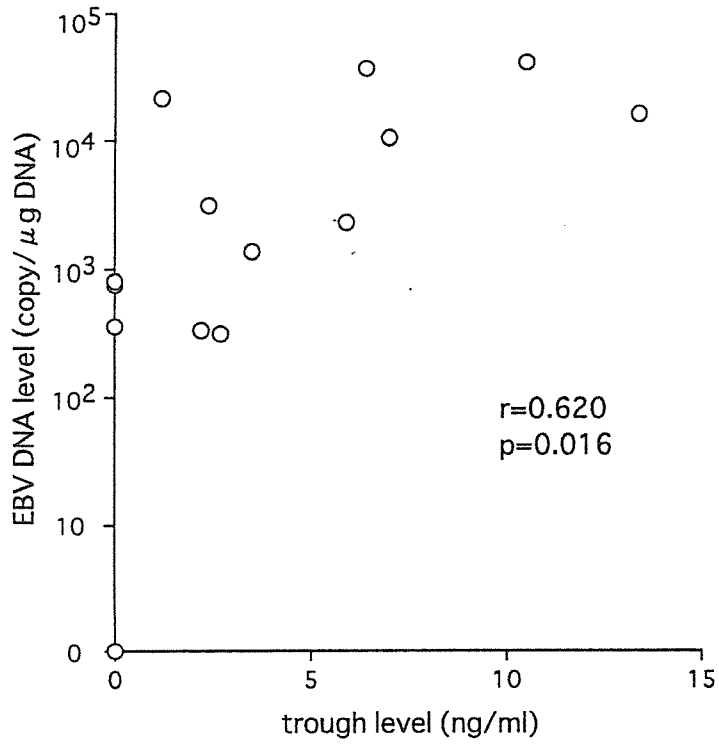


FIGURE 5.  
Correlation between trough levels of tacrolimus and the highest EBV DNA levels among long-term follow-up patients.

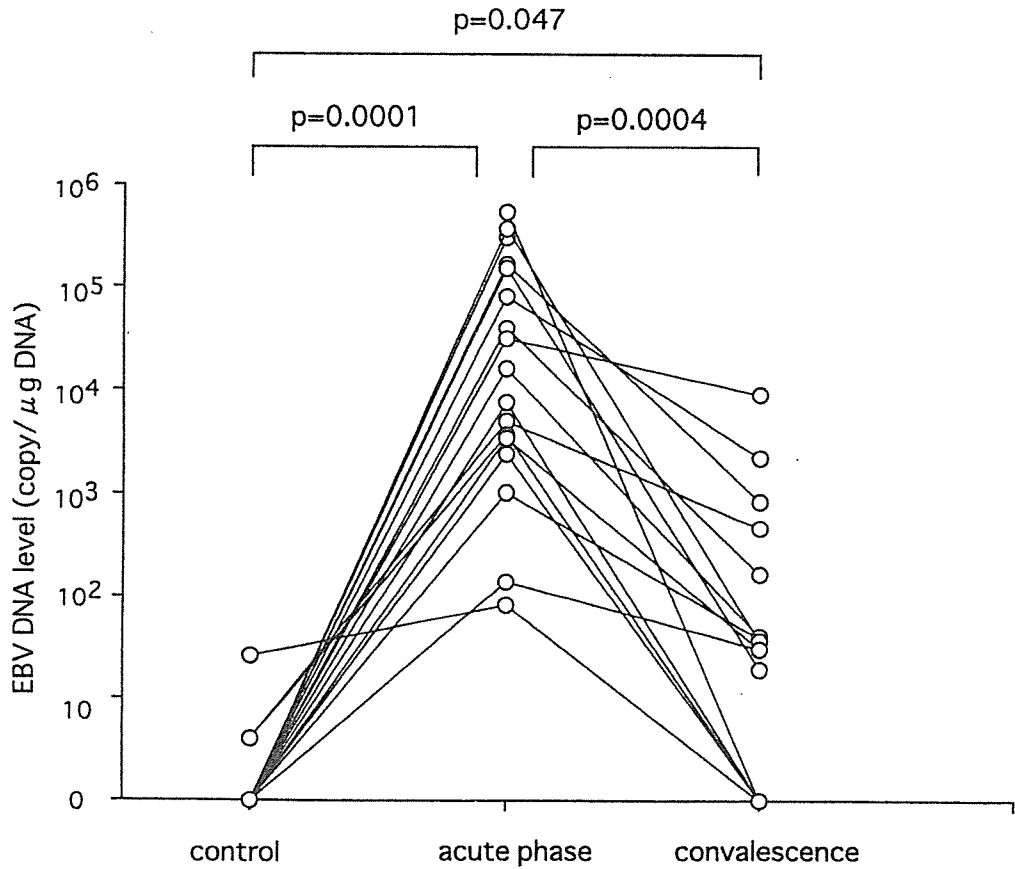


FIGURE 6.  
Comparison of EBV DNA levels during the control, acute, and convalescence phase of patients with acute EBVD.

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社