

Fig. 4. Differential expression of TRAIL receptors in normal liver tissue and HCC tissue. (A) Immunohistochemical expression of TRAIL-DR4, -DR5, -DcR1, and -DcR2 in normal liver tissue (a), tumor site of well-differentiated HCCs (b), moderately differentiated HCCs (c), and poorly differentiated HCCs (d). Magnification  $\times 400$ . Immunopathological findings shown are representative of 3 individual samples in each categorized HCCs. (B) Surface expression of TRAIL receptors on the surface of HepG2 was analyzed by FCM. Dotted lines represent negative control staining with isotype-matched MAbs. HepG2 expressed high TRAIL-DR4 and -DR5 but no TRAIL-DcR1 and DcR2, resembling poorly differentiated HCCs. TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand; HCC, hepatocellular carcinoma; FCM, flow cytometric; MAb, monoclonal antibody; TNF, tumor necrosis factor.

( $64.8\% \pm 8.2\%$ ,  $56.1\% \pm 8.9\%$ , and  $34.6\% \pm 7.5\%$ , respectively) (Fig. 5B). By magnetic sorting, NK and non-NK cells were isolated from donor LMNCs and PB-MCs and resulting populations were then analyzed for cytotoxicity against HepG2. As expected, the non-NK cell fraction did not mediate cytotoxicity. The higher cytotoxicity of NK cells isolated from LMNCs was observed than that of NK cells from PBMCs (Fig. 5C). Addition of neutralizing anti-TRAIL MAb partially reduced the cytotoxicity of IL-2-stimulated donor NK cells toward HepG2 cells ( $24.2\% \pm 9.1\%$  reduction at E:T = 8:1, data not shown), indicating that TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity was involved. Despite strong cytotoxicity of IL-2-stimulated donor liver NK cells, the cytotoxicities of those cells toward 1-haplotype identical allogeneic recipient- and autologous donor-derived lymphoblasts were

negligible, indicating their capacity to distinguish tumor cells from normal cells (Fig. 5D).

To determine whether liver non-NK cells are responsible for the increased anti-tumor activity of liver NK cells, we performed additional experiments mixing PB NK and non-NK cells isolated from either LMNCs or PBMCs. Before IL-2 stimulation, NK and non-NK cells were isolated from donor LMNCs and same donor PB-MCs. Then, for subsequent cytotoxic assays, PB NK cells were cultured with either liver non-NK or PB non-NK cells at the same ratio in the presence of IL-2. Even when PB NK cells were cultured with liver non-NK cells in the presence of IL-2, PB NK cells expressed little TRAIL (Fig. 6A). No difference in cytotoxicity against HepG2 was observed between a mixture of PB non-NK and PB NK cells and one of liver non-NK and PB NK cells (Fig. 6B).

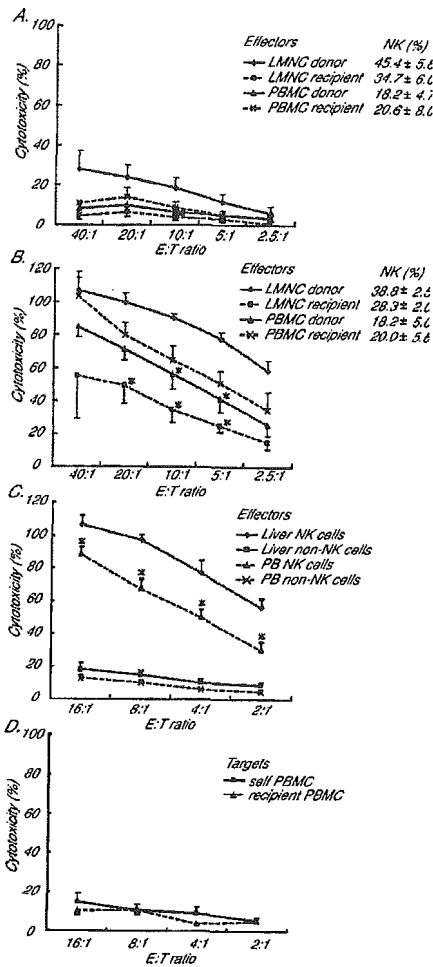


Fig. 5. IL-2-stimulated donor liver NK cells show vigorous cytotoxicity against HepG2. NK cytotoxic activities of indicated effectors against indicated target cells were analyzed by <sup>51</sup>Cr release assay. All data are represented as the mean ± SEM of assays, each set up in triplicate. Statistical analyses were performed using ANOVA (\*P < .05). (A) NK cytotoxic activities of freshly isolated LMNCs and PBMCs obtained from liver transplant donors and recipients against HepG2 target cells (n = 4 each). Percentages of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells in LMNCs or PBMCs obtained from 4 adult healthy donors and 4 corresponding recipients with cirrhosis are shown in the upper right corner (mean ± SEM). (B) NK cytotoxic activities of IL-2-stimulated LMNCs and PBMCs obtained from liver transplant donors and recipients against HepG2 target cells. LMNCs and PBMCs were cultivated for 4 days in the presence of IL-2 before the cytotoxicity assay (n = 4 each). Percentages of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells in LMNCs or PBMCs obtained from 4 adult healthy donors and 4 corresponding recipients with cirrhosis are shown in the upper right corner (mean ± SEM). (C) NK cytotoxic activities of NK and non-NK cells isolated from IL-2-stimulated donor LMNCs and PBMCs against HepG2 target cells (n = 4 and 5, respectively). (D) NK cytotoxic activities of NK cells isolated from IL-2-stimulated donor LMNCs against autologous and allogeneic lymphoblasts, which had been prepared from PBMCs of donors and corresponding recipients by cultivating with PHA for 4 days (n = 4). IL-2, interleukin-2; NK, natural killer; LMNC, liver mononuclear cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

These findings are consistent with a model whereby donor LMNCs have greater NK activity because NK cells from LMNCs are more functional on a per cell basis than those from PBMCs, and that liver non-NK cells are not

responsible for such altered function of liver NK cells in our experimental system.

### Discussion

The role of liver transplantation in patients with HCC has evolved over the past 2 decades, and transplantation has become one of the few curative treatment modalities for patients with unresectable HCC.<sup>35,36</sup> LDLT has become an acceptable therapy for patients with HCC in response to the pervasive shortage of deceased donor livers. In addition, waiting time for HCC patients to receive a deceased donor has decreased significantly, and the number of patients dropping out from the waiting list has decreased because of a decrease of advanced-stage disease. As a result, this may decrease the progression of disease so

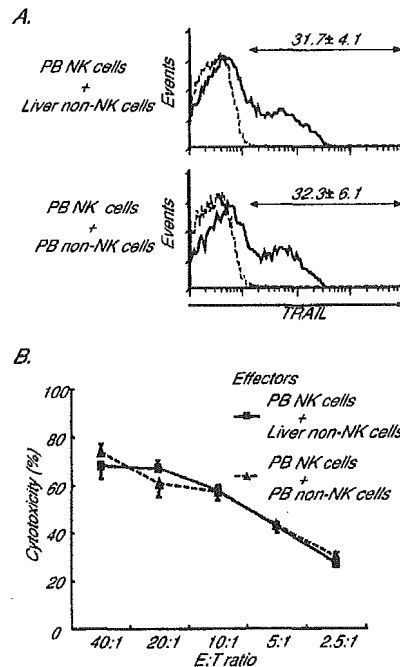


Fig. 6. Liver non-NK cells are not responsible for the increased anti-tumor activity of NK cells. Before IL-2 stimulation, NK and non-NK cells were isolated from donor LMNCs and same donor PBMCs. Then, NK cells from PBMCs were cultured with either liver non-NK or peripheral blood (PB) non-NK cells at the same ratio (3: 7) in the presence of IL-2 for subsequent NK cytotoxic assays. (A) Histograms represent the log fluorescence intensities obtained on staining for TRAIL after gating on the CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells subsets obtained from each group. Dotted lines represent negative control staining with isotype-matched MAb. The numbers indicate the percentages of cells in each group that were positive for TRAIL expression (mean ± SEM, n = 3 each). Histogram profiles shown are representative of 3 independent experiments. (B) NK cytotoxic activities of IL-2-stimulated PB NK cells cultured with either liver non-NK or PB non-NK cells against HepG2 target cells. Data are represented as the mean ± SD of triplicate samples and similar results were obtained in 3 independent experiments. IL-2, interleukin-2; NK, natural killer; LMNC, liver mononuclear cell; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

that the recurrence rate should be lower than for recipients who wait for an organ from a deceased donor.<sup>37</sup> When liver transplantation is performed as a therapy for HCC, recurrent HCC is nevertheless one of the most fatal complications. The management for the prevention of organ rejection requires the use of postoperative immunosuppressive therapy; however, immunosuppressants increase the incidence of recurrence or metastasis of cancer and induce cancer progression. The immunosuppressive regimen currently used after liver transplantation, consisting of tacrolimus/cyclosporine and methylprednisolone, reduces adaptive components of cellular immunity (predominantly T cell-mediated immune responses), while maintaining innate components of cellular immunity.<sup>3,38,39</sup> Because immune surveillance against tumors is mediated by both innate and adoptive components of cellular immunity, augmentation of NK cell responses to tumors, which have been thought to play a central role in innate immunity against tumors, might be a promising immunotherapy approach. Several therapeutic cytokines including IL-2 and IFNs primarily act through NK cells, and many studies have shown that activation of NK cell differentiation and function leads to a more efficient elimination of tumor growth<sup>5-9</sup>; however, the systemic administration of those cytokines is likely associated with an acceleration of alloimmune responses leading to liver allograft rejection. Hence, the adoptive transfer of cytokine-modulated NK cells might be a reasonable approach in preventing recurrence of HCC after liver transplantation, while minimizing effects on alloimmune responses.

NK cells in the blood stream are ready to kill any cell.<sup>1,2</sup> Healthy cells are spared by their MHC class I molecules, which bind to corresponding inhibitory receptors on NK cells so that only cells with altered or lacking MHC class I molecules, a mechanism to escape recognition by MHC-restricted CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, are killed because of missing inhibitory mechanisms.<sup>32,33,40,41</sup> The cytotoxic activities of NK cells are controlled by a variety of receptors including CD94/NKG2 and KIRs (CD158a/CD158b), which bind to respective MHC class I molecules on target cells. NK cells can discriminate not only between different class I molecules but also between certain allotypes that differ in single amino acid substitutions at positions 77 and 80 in the 1 domain of the 2 HLA-C groups.<sup>42,43</sup> This process can contribute to detection of transformed cells because downregulation of selected allotypes is an event often occurring in the progression of some tumor types. The group of inhibitory receptors is reported to have higher affinity of ligand binding than the activating group, and thus the inhibitory receptors may play a more dominant role in regulating the

cytotoxic activities of NK cells.<sup>44</sup> HCC cell lines, such as HepG2 and HuH-7, have been reported to lose or decrease the expression of HLA-B and -C alleles on the cell surface.<sup>23,45</sup> The only requirement for NK cell receptor repertoire development appears to be that every NK cell express at least one inhibitory receptor specific for autologous HLA class I, thereby ensuring tolerance against healthy cells sharing 1-haplotype MHC molecules.<sup>46,47</sup>

In the current study, we have determined functional properties of liver NK cells extracted from donor and recipient liver perfusates in clinical LDLT. Liver NK cells have never been used for the adoptive transfer to mount anti-tumor activity, because of the limited availability of liver NK cells in a clinical setting. In liver transplantation, *ex vivo* perfusion of the liver through the portal vein should inevitably be done for flushing blood from the liver graft before implantation to avoid intragraft coagulation. We have demonstrated that liver perfusates, which usually are thrown away, contain large amounts of NK cells. Donor liver NK cells showed the most vigorous cytotoxicity against a HCC cell line after *in vitro* IL-2 stimulation, when compared with donor and recipient PB NK cells and recipient liver NK cells. The higher anti-tumor activity of liver NK cells than PB NK cells has been well demonstrated in mice, although mechanisms underlying this fact remain unclear.<sup>15,16</sup> The consistent results were observed in healthy donors, but not in recipients with cirrhosis. The cytotoxicity of PB NK cells against HepG2 per se did not differ between donors and recipients, but that of liver NK cells from livers with cirrhosis were significantly impaired, regardless of the presence or absence of IL-2 stimulation.

Previously published data redefine NK cells as potent constitutive immune effectors, which are able to use not only the perforin-mediated secretory/necrotic mechanism to kill rare leukemia cell targets, but also a powerful TNF family ligand-mediated nonsecretory apoptotic mechanism to destroy most solid tumor cell targets.<sup>34</sup> TRAIL is highly expressed on most NK cells after stimulation with IL-2, IFNs, or IL-15 in mice.<sup>9,19,48</sup> Neutralization of TRAIL additively enhanced liver metastasis in perforin-deficient mice but not in IFN- $\gamma$ -deficient mice.<sup>9</sup> These findings clearly place perforin and TRAIL as the 2 key cytotoxic effector pathways used by NK cells. From the current study in human, we now appreciate that freshly isolated liver NK cells barely express a detectable level of TRAIL on their surface, but a remarkable level of TRAIL expression can be induced, preferentially on liver NK cells, by stimulation with IL-2. Taken together with the finding that poorly differentiated HCCs highly express the death-inducing TRAIL receptors (DR 4 and DR5), which contain cytoplasmic death domains and signal ap-

optosis, as well as HepG2, adoptive transfer of IL-2-stimulated NK cells extracted from donor liver grafts are likely to mount an anti-tumor response without causing toxicity against recipient intact tissue, at least in 1-haplotype identical combination. If this approach were to be used in clinical applications, it should be taken into account that T cells contaminants in donor LMNCs might cause graft-versus-host responses after adoptive transfer to the corresponding recipient. Hence, we confirmed that *in vitro* treatment with muromonab-CD3 (Janssen-Cilag, The Netherlands) leads to complete ligation of MAbs on CD3<sup>+</sup> T and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT cells in IL-2-stimulated LMNCs (data not shown). Such MAbs-binding cells should be opsonized *in vivo* after adoptive transplantation. Furthermore, this treatment did not attenuate cytotoxic activity of IL-2-stimulated donor LMNCs against HepG2 (data not shown).

The mean yield of NK cells from donor liver perfusates was  $0.5 \pm 0.1 \times 10^6$  cells/g liver-weight in this study. Because graft weight and graft-to-recipient body weight ratio ranged from 262 to 900 g (mean weight,  $579 \pm 132$  g) and from 0.51% to 1.42% (mean ratio,  $0.97\% \pm 0.17\%$ ), respectively, a maximum of 100 to  $250 \times 10^6$  NK cells can be used for the adoptive transfer even without further treatment to promote their proliferation. The optimal dose of liver NK cells needs to be elucidated to bring this approach closer to clinical application.

In conclusion, liver NK cells inductively express TRAIL. IL-2-stimulated donor liver NK cells have the vigorous cytotoxicity against HCC.

**Acknowledgment:** The authors thank Drs. Daisuke Tokita, Takashi Onoe, Kentaro Ide, Wendy Zhou, Masayuki Shishida, Yasuhiro Fudaba, Hirotaka Tashiro, and Toshiyuki Itamoto for their advice and encouragement, and Yuka Tanaka and Yuko Ishida for their expert technical assistance.

## References

- Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-376.
- Yokoyama WM. Natural killer cells. In: Paul EW, ed. *Fundamental Immunology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999:575-603.
- Müller JS, Soignier Y, Panoskatsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, et al. Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005;105:3051-3057.
- Klingemann HG, Martinson J. *Ex vivo* expansion of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 2004;6:15-22.
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987;316:889-897.
- Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, et al. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* 1993;178:1223-1230.
- Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 2001;7:94-100.
- Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000;191:771-780.
- Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrot RH, Sedger LM, Kayagaki N, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 2001;193:661-670.
- Talmadge JE, Phillips H, Schindler J, Tribble H, Pennington R. Systematic preclinical study on the therapeutic properties of recombinant human interleukin 2 for the treatment of metastatic disease. *Cancer Res* 1987;47:5725-5732.
- Leung W, Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* 2004;172:644-650.
- Meller B, Frohn C, Brand JM, Lauer I, Schelper LF, von Hof K, et al. Monitoring of a new approach of immunotherapy with allogeneic (111)In-labelled NK cells in patients with renal cell carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004;31:403-407.
- Takahashi M, Ogasawara K, Takeda K, Hashimoto W, Sakihara H, Kumagai K, et al. LPS induces NK1.1 + alpha beta T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. *J Immunol* 1996;156:2436-2442.
- Crispe IN, Mehal WZ. Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today* 1996;17:522-525.
- Seki S, Habu Y, Kawamura T, Takeda K, Dobashi H, Ohkawa T, et al. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag<sup>+</sup> T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 2000;174:35-46.
- Ochi M, Ohdan H, Mitsuta H, Onoe T, Tokita D, Hara H, et al. Liver NK cells expressing TRAIL are toxic against self hepatocytes in mice. *HEPATOLOGY* 2004;39:1321-1331.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 1999;5:157-163.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-682.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687-12690.
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-113.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-821.
- Ohdan H, Mizunuma K, Tashiro H, Tokita D, Hara H, Onoe T, et al. Intraoperative near-infrared spectroscopy for evaluating hepatic venous outflow in living-donor right lobe liver. *Transplantation* 2003;76:791-797.
- Kurokohchi K, Carrington M, Mann DL, Simonis TB, Alexander-Miller MA, Feinstone SM, et al. Expression of HLA class I molecules and the transporter associated with antigen processing in hepatocellular carcinoma. *HEPATOLOGY* 1996;23:1181-1188.
- Strater J, Hinz U, Walczak H, Mechttersheimer G, Koretz K, Herfarth C, et al. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in colon carcinoma: TRAIL-R1 is an independent prognostic parameter. *Clin Cancer Res* 2002;8:3734-3740.
- 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* 2000;32:962-969.
- Doherty DG, Norris S, Madrigal-Esteban L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, et al. The human liver contains multiple populations of NK

- cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 1999;163:2314-2321.
27. Yuen MF, Norris S. Expression of inhibitory receptors in natural killer (CD3(-)CD56(+)) cells and CD3(+)CD56(+) cells in the peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Immunol* 2001;101:264-269.
  28. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001;97:3146-3151.
  29. Jacobs R, Stoll M, Stratmann G, Leo R, Link H, Schmidt RE. CD16-CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* 1992;79:3239-3244.
  30. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998;391:795-799.
  31. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 1998;187:813-818.
  32. Moretta A, Vitale M, Sivori S, Bottino C, Morelli L, Augugliaro R, et al. Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules: evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J Exp Med* 1994;180:545-555.
  33. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675-678.
  34. Vujanovic NL, Nagashima S, Herberman RB, Whiteside TL. Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J Immunol* 1996;157:1117-1126.
  35. Wiesner RH, Freeman RB, Mulligan DC. Liver transplantation for hepatocellular cancer: the impact of the MELD allocation policy. *Gastroenterology* 2004;127:S261-267.
  36. Kulik L, Abecassis M. Living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S277-282.
  37. Axelrod D, Koffron A, Kulik L, Al-Saden P, Mulcahy M, Baker T, et al. Living donor liver transplant for malignancy. *Transplantation* 2005;79:363-366.
  38. Hirata M, Kita Y, Saito S, Nishimura M, Ito M, Mizuta K, et al. Increase in natural killer cell activity following living-related liver transplantation. *Transpl Int* 1998;11(Suppl. 1):S185-S188.
  39. Harada N, Shimada M, Okano S, Suehiro T, Soejima Y, Tomita Y, et al. IL-12 gene therapy is an effective therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. *J Immunol* 2004;173:6635-6644.
  40. Alami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today* 2000;21:447-455.
  41. Falk CS, Mach M, Schendel DJ, Weiss EH, Hilgert I, Hahn G. NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11-mediated HLA class I down-regulation. *J Immunol* 2002;169:3257-3266.
  42. Colonna M, Moretta A, Vely F, Vivier E. A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function. *Immunol Today* 2000;21:428-431.
  43. Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998;161:571-577.
  44. Lopez-Botet M, Bellon T. Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I. *Curr Opin Immunol* 1999;11:301-307.
  45. Matsui M, Machida S, Tomiyama H, Takiguchi M, Akatsuka T. Introduction of tapasin gene restores surface expression of HLA class I molecules, but not antigen presentation of an HIV envelope peptide in a hepatoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:508-517.
  46. Shilling HG, McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2003;101:3730-3740.
  47. Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Liener-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, et al. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 1997;7:739-751.
  48. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, et al. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 1999;163:1906-1913.

## 生体肝移植における免疫抑制療法\*

広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学  
大段 秀樹 浅原 利正

\* Development of a logical immunosuppressive regimen in living donor liver transplantation

キーワード：生体肝移植，免疫抑制，拒絶反応，免疫寛容

要旨：近年の優れた免疫抑制剤の開発は肝移植成績の向上に大きく寄与してきた。生体部分肝移植における免疫抑制プロトコールはカルシニューリンインヒビターとステロイドの併用が中心で、脳死肝移植のものと変わらない。良好な移植成績の一方で、慢性拒絶反応の問題や非特異的免疫抑制に起因する感染症や悪性腫瘍の問題が重要視されている。肝移植医療のさらなる発展には、正常な生体防御能を保ちつつ移植抗原に対する免疫応答のみを抑制し得るプロトコールの確立が重要であろう。本稿では、生体部分肝移植における免疫抑制療法の現状を概説し、一部の施設で行われている積極的な免疫抑制剤の減量・離脱の試みを取り上げた。また、われわれの免疫監視下での免疫調節の試みと、さらには免疫寛容誘導法の確立へ向けて足掛かりとなり得る肝類洞内皮細胞の免疫調節機構に関する研究成果の概要を紹介した。

## 免疫抑制療法の現状

肝移植に用いられる免疫抑制剤には (1) シクロスポリン (CYA)、タクロリムス (TAC) などのカルシニューリンインヒビター、(2) アザチオプリン (AZ) やミコフェノール酸モフェチル (MMF) などの代謝拮抗剤、(3) メチルプレドニゾロン (MPLS) やプレドニゾロン (PLS) などのステロイド、(4) ムロモナブ-CD3 (OKT3) やバシリキシマブなどの抗リンパ球抗体などがある。各施設によって薬剤の選択や用法・用量、目標血中濃度に多少の違いはあるが、肝移植後の免疫抑制療法としては、(1) TAC とステロイドの 2 剤併用、(2) CYA とステロイドの併用に、必要に応じて AZ または MMF を追加する方法、が一般的である。当科のプロトコールを図 1 に示す。

C 型ウイルス性肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の 1 つであるが、移植後に C 型肝炎の

再発が高率に起こり、また肝炎の進行も移植患者以外と比較すると急速であることがわかっている<sup>1~3)</sup>。この C 型肝炎の再発には肝移植後の免疫抑制剤投与が大きく影響していると考えられているものの、その原因究明や予防法は依然確立されておらず、脳死肝移植および生体肝移植における世界的な研究課題となっている。ステロイドの投与によって C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖が促進される可能性が報告されていることから、当科ではステロイド投与早期中止あるいはステロイド非投与プロトコールを採用している。

拒絶反応は術後 2 週~2 か月後に好発する。免疫抑制療法のプロトコールによって異なるが、発生率は 30~50% と報告されている<sup>4,5)</sup>。血液化学検査で T-bil、肝トランスアミナーゼ、胆道系酵素の上昇がみられるが、いずれも特異的ではない。ウイルス性肝炎、薬剤性肝炎などの鑑別を要するが、肝生検でも確定診断が困難であることも経

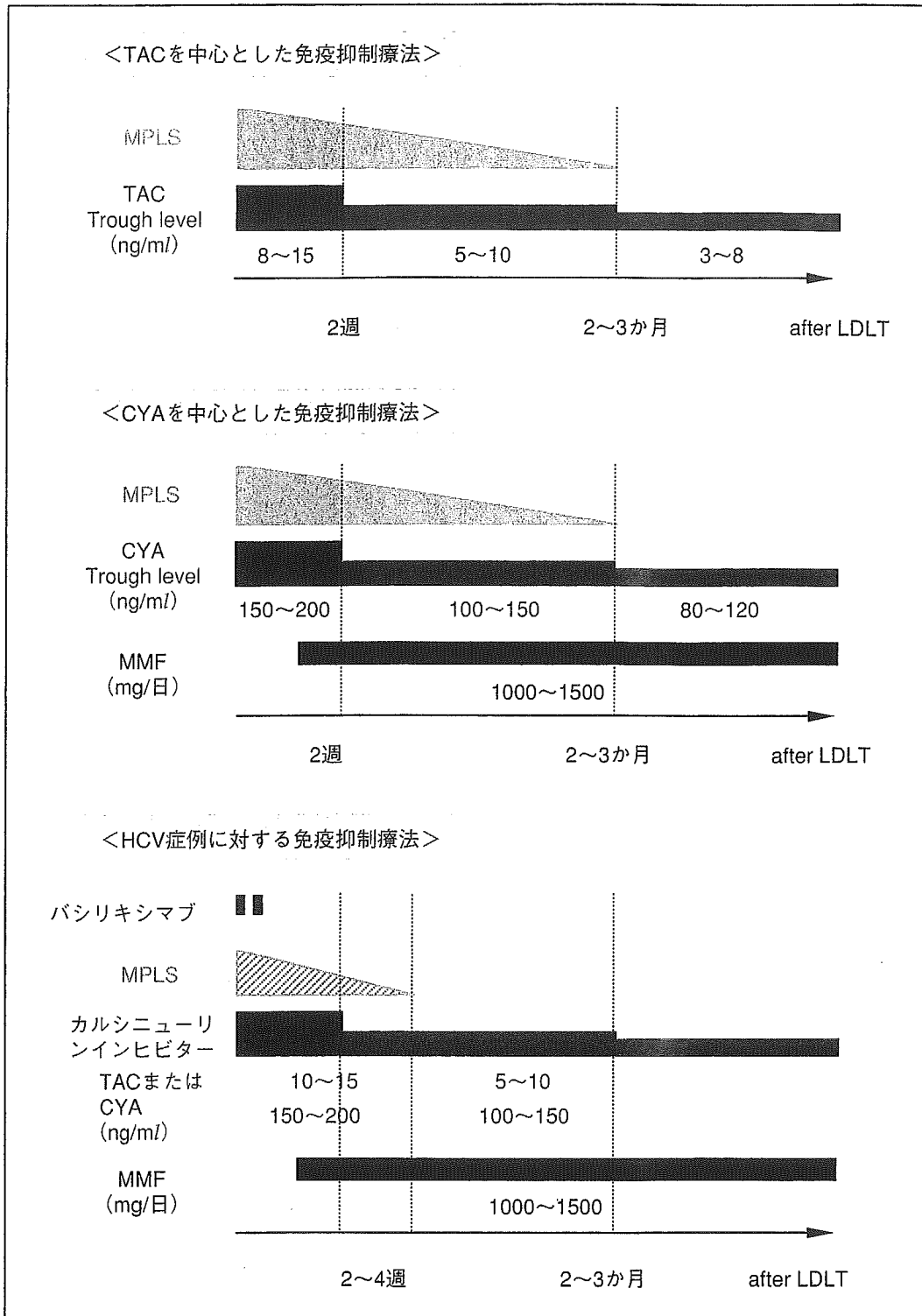


図1 広島大学病院における生体肝移植後免疫抑制プロトコール

験される。急性拒絶の治療では MPLS のパルス療法を行う。無効例では OKT3 やデオキシスパーガリンを使用することもある。



### 免疫抑制剤の減量・離脱の試み

上述のように、優れた免疫抑制剤の開発とそれ

らを用いるプロトコールの確立は肝移植成績の向上に大きく寄与してきた。しかし、免疫抑制剤に依存する治療では、非特異的免疫抑制に起因する感染症や悪性腫瘍の発生が問題となる。これに対して、免疫抑制剤に伴う不利益を回避する意図のもと、一部の施設では肝移植後の積極的な免疫抑

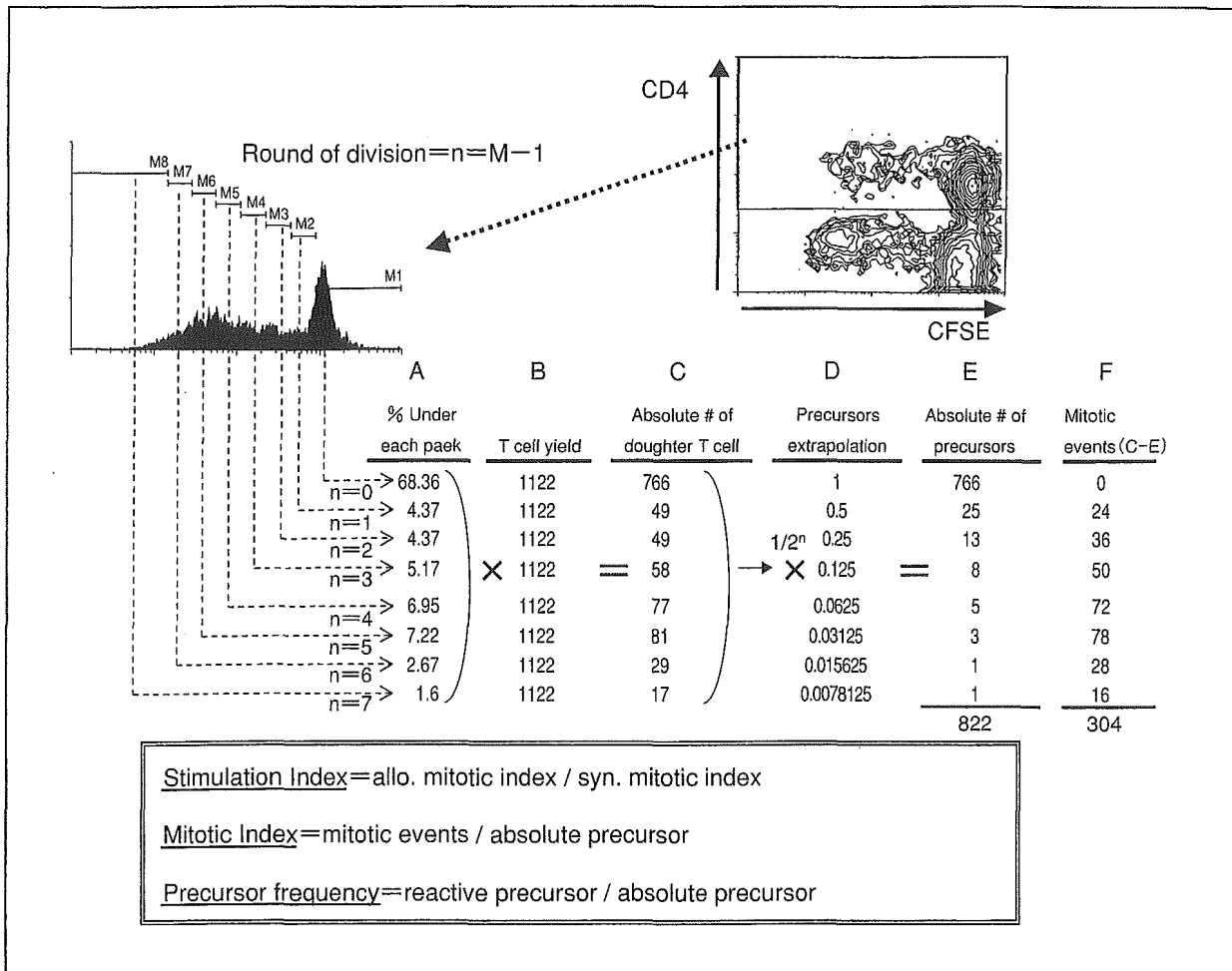


図 2 a CFSE-MLR の定量的解析法と拒絶判定法

制剤の減量・離脱が試みられている<sup>6,7)</sup>。京都大学では上述のような従来の初期免疫抑制プロトコルを用いて、生体肝移植後2年以上が経過し、肝機能が良好で、1年以内に拒絶反応のエピソードがないレシピエントを対象にして、徐々に免疫抑制剤を減量し離脱が試みられた。その結果、38%が完全離脱が可能であり、25%に拒絶反応が生じたが、容易に治療が可能であったと報告されている<sup>6)</sup>。ピッツバーグ大学では、初期免疫抑制プロトコルに抗リンパ球グロブリンの単回投与とTACを用い(ほかの免疫抑制剤は拒絶治療時以外使用しない)、移植後3か月以降に積極的に離脱を目指した減量プロトコルを実践している。術後1年において約80%のレシピエントに減量の継続が可能であったと報告している<sup>7)</sup>。これらの先駆的試みは、肝移植レシピエントのQOLの改善を目指すうえで非常に重要な意義を持つものと

考えられる。

### ■ ■ ■ 免疫監視下免疫抑制療法の実践

肝移植後の免疫抑制療法プロトコルは臨床経験に基づいて確立されてきた。患者個々における免疫応答の客観的な指標に対応して調整されているわけではない。特にHCV性肝硬変患者に対する肝移植では、拒絶反応の予防および治療目的で使用される免疫抑制剤がHCVの複製を増長し、HCV肝炎の移植後再発が高率に起こるため、必要最小限の免疫抑制療法を実施することが肝要である。信頼性のある免疫監視法の確立が求められるゆえんである。われわれはcarboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したmixed lymphocyte reaction assay (以後、CFSE-MLRと略す)を臨床導入している<sup>8,9)</sup>。CFSE色素



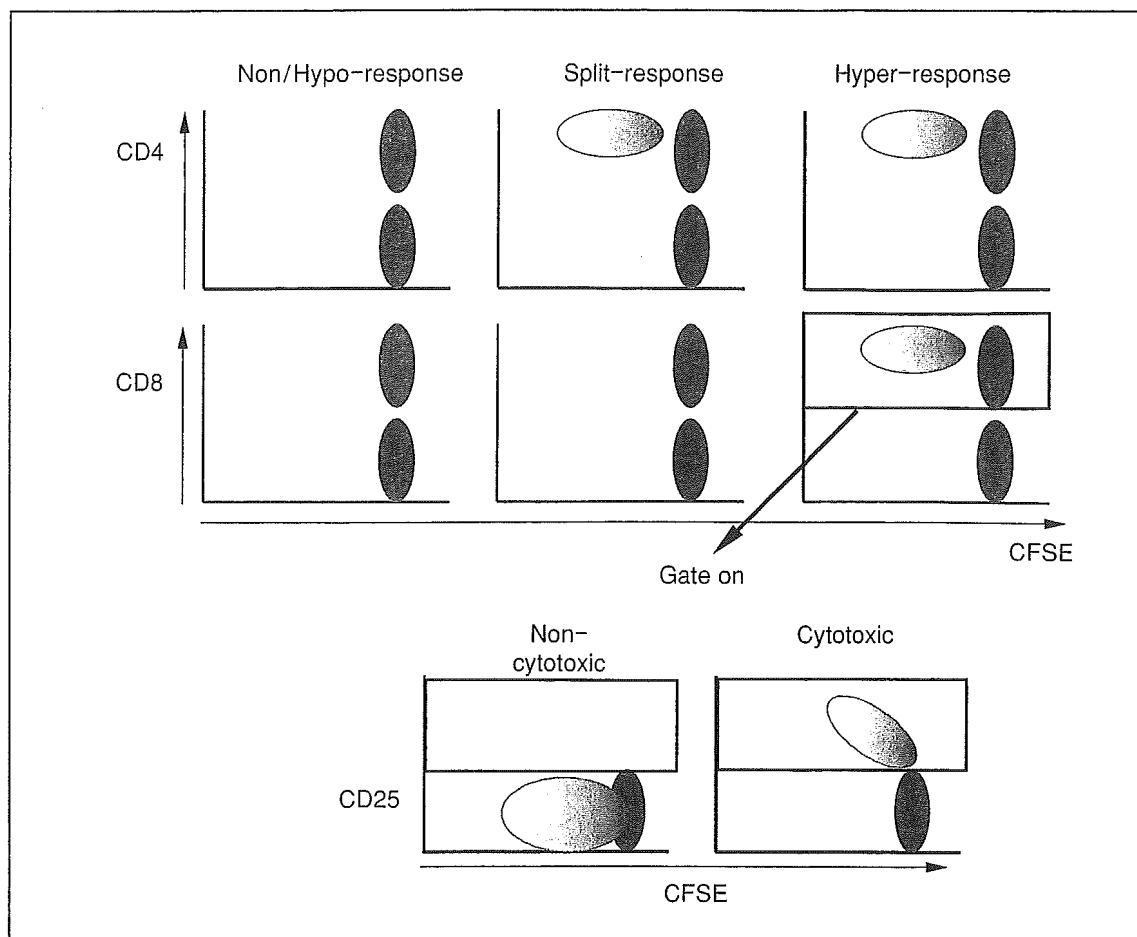


図 2b CFSE-MLR の定量的解析法と拒絶判定法

a: ドナーの末梢血リンパ球を承諾の上採取して stimulator として使用した。また、健常ボランティアの末梢血リンパ球を third party stimulator として使用した。レシピエントの末梢血生リンパ球を CFSE 染色し one-way MLR を施行した。MLR の解析には FCM を用い、FL-1 で CFSE の減衰による細胞分裂・増殖を、FL-2 と FL-4 で反応性 T 細胞のフェノタイプ (CD4, CD8, CD25) を評価し、FL-3 で PI 染色による生細胞抽出を行った。本法では、CD4 と CD8 T 細胞別に stimulation index (SI) の算出と CD25 表出の定量評価が可能である。

b: 横軸は CFSE, 縦軸は CD4, あるいは CD8 の表出強度を示す。CD4, CD8 がともに分裂増殖を示さない場合、CFSE intensity の低下は認めず、アロ反応性に乏しい状態で、免疫抑制状態は適正あるいは過剰と判断する。つぎに、CD4 は分裂増殖するが、CD8 は反応していないとき、潜在的感作状態であることが示唆される。また、CD4, CD8 ともに分裂増殖を示すとき、現在進行中あるいは今後起こり得る拒絶反応を示唆する。同時に CD8T 細胞の CD25 の表出を解析すると、ドナーに対し特異的に反応しているものは CD25 を表出し、非特異的に反応しているものは CD25 の表出を認めない。われわれは、CD25 (IL-2R) 抗体陽性 CD8T 細胞のみに細胞障害性を認めることを確認しているの、これが拒絶反応の特異的指標となり得ると考えられる。

は細胞障害性がなく細胞内蛋白を染色し、細胞分裂回数に比例して色素が半減化する性質を有し、反応性リンパ球の表面分子や活性化マーカーと同時に FCM を用いて解析できるため、反応性 T 細胞の precursor frequency, mitotic index や stimulation index の算出、定量化が可能である (図 2)<sup>10,11)</sup>。

当科において CFSE-MLR で免疫監視を行った

生体肝移植症例の 34 例 (C 型肝炎 14 例) のうち、術後 1 年以内に血液化学検査で肝機能異常を認め、急性拒絶反応を疑った症例は 14 例 (C 型肝炎は 6 例) であった。肝生検において急性拒絶反応の診断が得られたのは、11 例 (C 型肝炎は 5 例) であった。これに対して CFSE-MLR において、抗ドナー応答の亢進を認めたのは、4 例 (C 型肝炎は 3 例) のみであった。これらの症例はすべて

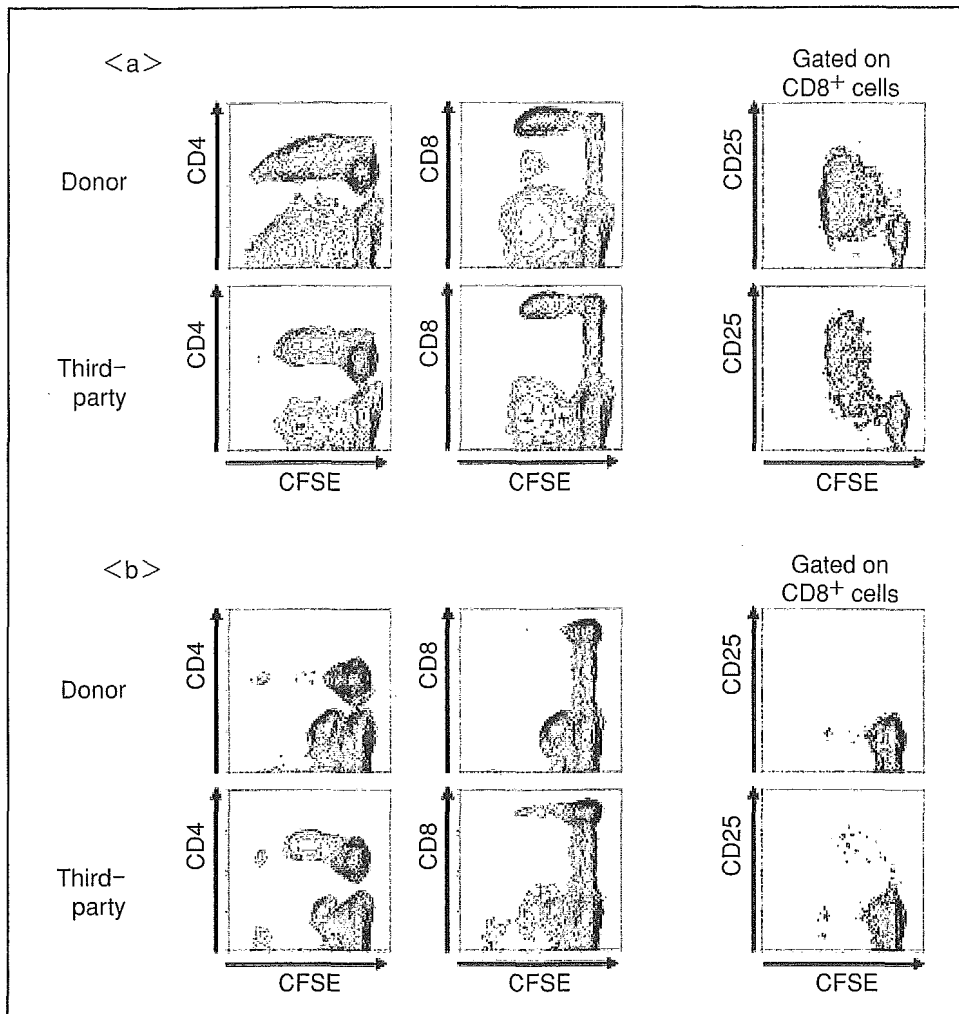


図3 CFSE-MLRによる抗ドナー免疫応答の評価

分裂  $CD8^+CD25^+$ T 細胞が細胞障害性を有する。a: 抗サードパーティ反応に比べて  $CD4^+$ T 細胞と  $CD8^+$ T 細胞ともに強い抗ドナー免疫応答を認め、抗ドナー反応性分裂  $CD8^+$ T 細胞に CD25 の表出を認めた。拒絶反応と判定した。b: 抗サードパーティ反応に比べて抗ドナー免疫応答は弱く、抗ドナー反応性分裂  $CD8^+$ T 細胞に CD25 の表出を欠く。拒絶は否定した。

抗ドナー反応性 CD8T 細胞の CD25 の表出率が 50%以上を示した (図 3)。しかしながら、CFSE-MLR で抗ドナー応答の亢進を認めず、抗ドナー反応性 CD8T 細胞の CD25 の表出率が 50%未満の症例は、前区域枝のうっ血、薬剤性肝障害、ウイルス性肝炎の再発、自己免疫性肝炎の再発が疑われた (10 例)。特に、C 型肝炎再発症例においては免疫抑制療法を減量することで肝機能の改善を認める症例を経験した (2 例)。

最近、肝移植後の C 型肝炎の再発によって早期に肝硬変に至り、非 C 型肝炎例と比較して長期予後が有意に不良であるという報告が国内外からされている。また、HCV 陰性患者では術後急性拒絶

反応は予後と関連しないのに対し、HCV 陽性の移植患者における急性拒絶反応は予後不良因子とされている。HCV 肝炎合併例では、免疫抑制療法がウイルスの増勢を助長するためと理解されている<sup>1-3)</sup>。したがって、急性拒絶反応と C 型肝炎再発、あるいはそのほかの原因とを的確に鑑別し、必要最低限の免疫抑制療法を行うため、個々の患者の免疫状態を把握することが重要となる。しかし、肝生検において C 型肝炎の再発と急性拒絶反応の組織学的な鑑別がしばしば困難である<sup>12)</sup>。したがって、術後肝機能異常を認めた場合には、肝生検で肝臓内の形態学的病態を確認するとともに、CFSE-MLR によってドナーに対する免疫応

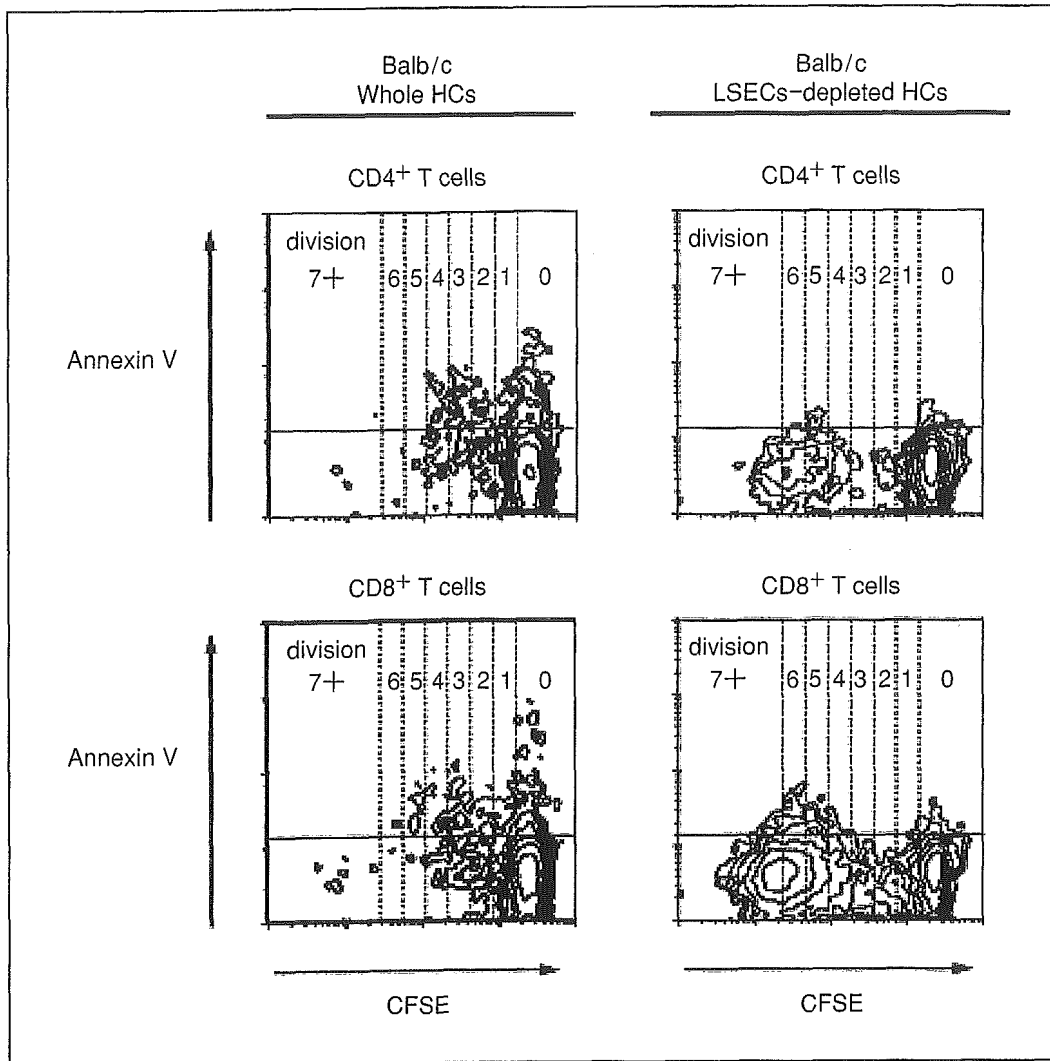


図4 肝類洞内皮細胞によるアロ反応性 T 細胞へのアポトーシスの誘導

Balb/c マウスの肝臓構築細胞 (HCs) を stimulator に, B6 の脾リンパ球を responder に用い, CFSE-MLR assay によってアロ反応性の  $CD4^+$  および  $CD8^+$  T 細胞の増殖指数と存在比率を解析した. 肝構築細胞のすべてを stimulator として CFSE-MLR をした場合, すなわち類洞内皮細胞 (LSEC) の存在下で混合培養した異系 T 細胞はわずかながら分裂を認めたが, その分裂 T 細胞はすべてアネキシン V 陽性で, 分裂初期にアポトーシスに陥ることがわかった. LSEC を反応系から除去すると激しい T 細胞の分裂・増殖を認めた.

答を把握することが有用であると考えている.



### 肝類洞内皮細胞の免疫調節機構

肝臓は免疫寛容獲得にかかわる臓器として知られるが, なぜ同種異系移植肝は拒絶されにくいのか, 説得力のある検証はいまだなされていない. この命題を解明することは, 肝臓移植後の恒久的な免疫抑制剤の使用を避け得るプロトコールの確立につながることを期待される.

われわれはマウスを用い, 肝臓の構築細胞を分離・精製してそれぞれの免疫原性を解析した結

果, 非実質細胞群から抽出した類洞内皮細胞が寛容誘導特性を有することが明らかとなった<sup>13)</sup>.

$CD105$  分子をマーカーとして分離した類洞内皮細胞のフェノタイプを解析すると, MHC クラス II, 共刺激分子 (CB80 と  $CD86$ ), 細胞死誘導分子 (FasL) を発現していた. ドナーマウス (Balb/c) の肝臓構築細胞を stimulator に, レシピエントマウス (B6) の脾リンパ球を responder に用い, CFSE-labeling 法を用いた MLR assay によってアロ反応性の  $CD4^+$  および  $CD8^+$  T 細胞の増殖指数と存在比率を解析した. 肝構築細胞のすべてを

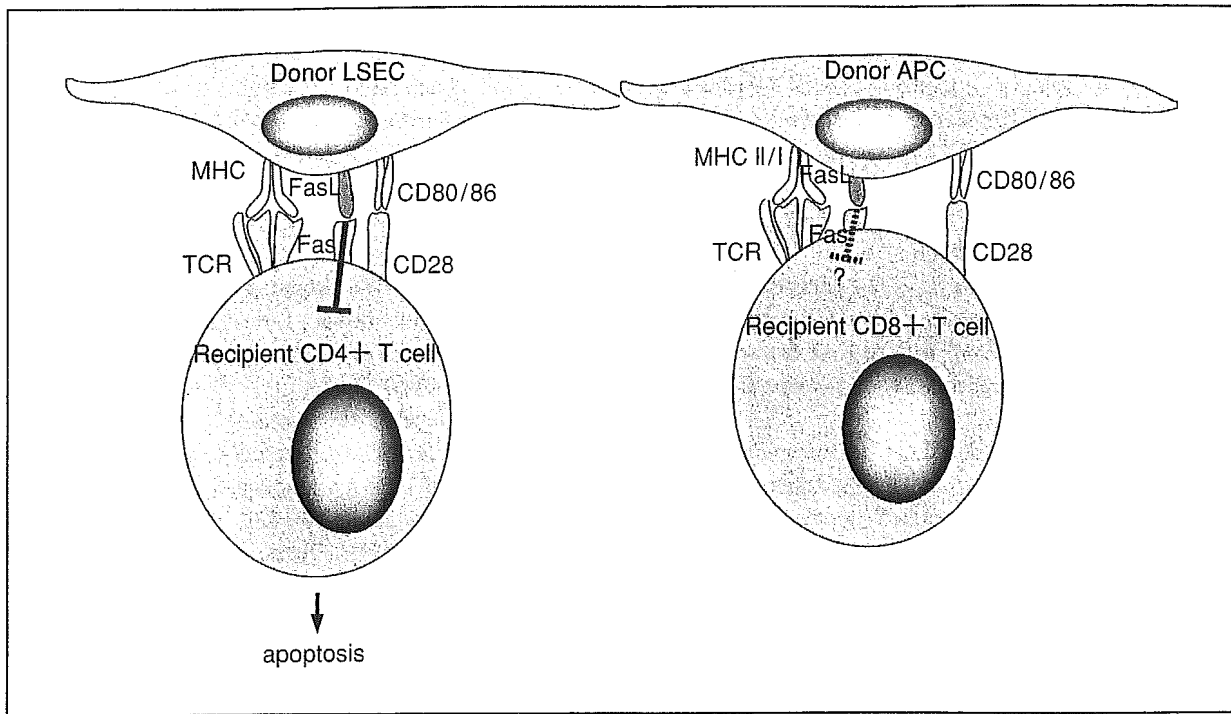


図5 肝類洞内皮細胞からアロ抗原を認識した CD4<sup>+</sup>T 細胞の Fas/FasL 経路を介してのアポトーシス  
 CD8<sup>+</sup>T 細胞は Fas/FasL 以外の経路も関与する可能性がある。

stimulator として MLR をした場合、同種異系の組み合わせでも T 細胞の分裂を認めなかった。ところが、類洞内皮細胞を反応系から除去すると激しい T 細胞の分裂・増殖を認め、類洞内皮細胞が T 細胞性アロ応答を抑制していることが判明した。また、類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系 T 細胞はわずかながら分裂を認めたが、その分裂 T 細胞はすべてアネキシン V 陽性で、分裂初期にアポトーシスに陥ることがわかった (図 4)。FasL-knockout マウスの (Balb/c) 類洞内皮細胞の存在下で混合培養した異系 T 細胞には激しい分裂・増殖を認め、類洞内皮細胞上に表出する FasL の寛容誘導への関与が証明された (図 5)<sup>14)</sup>。

ヒト肝類洞内皮細胞のフェノタイプを解析すると、マウスの肝類洞内皮細胞に認められたような MHC クラス II, CB80, CD86, FasL 分子は正常状態では発現しておらず、マウスで確認された上述のようなアロ T 細胞の寛容化機構はヒト肝移植では発動しにくいのではないかと推察される。マウスではアロ移植肝の永久生着に免疫抑制剤を必要としないのに対し、ヒトでは免疫抑制剤の使

用が必須であるゆえんの 1 つではないかと、われわれは考えている。ヒト肝類洞内皮細胞に人為的に MHC クラス II, CB80, CD86, FasL 分子を発現させる安全な方法が確立できれば、マウスにおいて観察されるような肝移植後のドナー特異的免疫寛容が臨床肝移植においても誘導できるのではないかと考え、研究を継続している。

## 文 献

- 1) Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, et al: Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 21: S30-34, 1995
- 2) Rosen HR, Shackleton CR, Higa L, et al: Use of OKT3 is associated with early and severe recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 92: 1453-1457, 1997
- 3) Charlton M, Seaberg E: Impact of immunosuppression and acute rejection on recurrence of hepatitis C: results of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. *Liver Transpl Surg* 5: S107-S114, 1999
- 4) Minamiguchi S, Sakurai T, Fujita S, et al: Living related liver transplantation: histopathologic analysis of graft dysfunction in 304 patients. *Hum Pathol* 30: 1479-1487, 1999
- 5) Sugawara Y, Makuuchi M, Kaneko J, et al: Risk factors

- for acute rejection in living donor liver transplantation. *Clin Transplant* **17** : 347-352, 2003
- 6) Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, et al : Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* **72** : 449-454, 2001
  - 7) Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, et al : Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* **361** : 1502-1510, 2003
  - 8) Hara H, Ohdan H, Tashiro H, et al : Differential diagnosis between graft-versus-host disease and hemophagocytic syndrome after living-related liver transplantation by mixed lymphocyte reaction assay. *J Invest Surg* **17** : 197-202, 2004
  - 9) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, et al : Low incidence of acute rejection after living-donor liver transplantation : immunologic analyses by mixed lymphocyte reaction using a carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester labeling technique. *Transplantation* **79** : 1262-1267, 2005
  - 10) Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA : Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* **100** : 3173-3183, 1997
  - 11) Tanaka Y, Ohdan H, Onoe T, et al : Multiparameter flow cytometric approach for simultaneous evaluation of proliferation and cytokine-secreting activity in T cells responding to allo-stimulation. *Immunol Invest* **33** : 309-324, 2004
  - 12) Demetris AJ, Eghtesad B, Marcos A, et al : Recurrent hepatitis C in liver allografts : prospective assessment of diagnostic accuracy, identification of pitfalls, and observations about pathogenesis. *Am J Surg Pathol* **28** : 658-669, 2004
  - 13) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, et al : Liver sinusoidal endothelial cells have a capacity for inducing nonresponsiveness of T cells across major histocompatibility complex barriers. *Transpl Int* **18** : 206-214, 2005
  - 14) Onoe T, Ohdan H, Tokita D, et al : Liver sinusoidal endothelial cells tolerate T Cells across MHC barriers in mice. *J Immunol* **175** : 139-146, 2005
- (OHDAN Hideki, et al 広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座外科学 : ☎ 734-8551 広島市南区霞 1-2-3)

## HCV 再感染は肝移植の予後を左右するか

市田 隆文\* 嶋田 裕慈\* 森 広樹\*  
 渋谷 智義\* 石川 雅邦\* 小川 薫\*

索引用語：C型肝炎ウイルス，肝炎の再発，肝移植，免疫抑制剤

### 1 はじめに

従来から，C型肝炎ウイルス（HCV）陽性レシピエントの肝移植後の病態は極めて良好で，非HCVレシピエントと比較してその生存率，グラフト生着率とも遜色ないとされていた<sup>1-5)</sup>。ところが1995年頃を境にHCV陽性レシピエントが肝移植後，比較的早期に肝硬変に進展し，非代償性肝硬変となり，その長期予後に深刻な影響を与えることが判明してきた。事実，筆者も厚生省の班会議報告で邦人脳死HCVレシピエントの予後は再感染を認めるものの，生命の危機に瀕するものではないと報告してきた<sup>6,7)</sup>。なぜ，このようにHCV陽性レシピエントの長期予後が変化してきたのか。

わが国では生体肝移植を始めて，やっと成人例の長期生存例が12年を迎えようとしている<sup>8)</sup>。この生体肝移植に関しては，当初は成績至上主義の観点から非ウイルス性肝疾患に限定されていたが，昨年1月の生体肝移植の保険適応の拡大から，最近ではウイルス

肝炎に起因する肝疾患に対する生体肝移植が急速に増加傾向にある。

そして，HCV関連の問題が表面化し，陽性レシピエントが再び非可逆的肝疾患に到達する前に，何らかのprophylaxisあるいはpost transplant treatmentのstrategyを確立することが急務となってきた。本稿では，様相が変わってきたHCV陽性肝移植レシピエントの再感染が肝移植の予後を左右するぐらい深刻な問題になりつつあることに言及し，筆者たちの考えを述べることとする。

### 2 肝移植後のHCV再感染

HCV陽性レシピエントは非HCVレシピエントに比して，生存率が低下することがはじめてスペインのグループから報告された<sup>9,10)</sup>。その要因が主にHCVの再感染に起因するとし<sup>11)</sup>，その後の検討でHCV陽性レシピエントの生存率が低下しているという事実<sup>12)</sup>が明らかになってきた。これは多くの施設で追試され，例外的な施設<sup>13)</sup>を除くと，現在ではHCV陽性レシピエントの大半は肝移植

Takafumi ICHIDA et al : Does hepatitis C viral re-infection have exerted the prognosis of liver transplantation?

\*順天堂大学医学部消化器内科（順天堂伊豆長岡病院）[〒410-2295 静岡県田方郡伊豆長岡町長岡 1129]

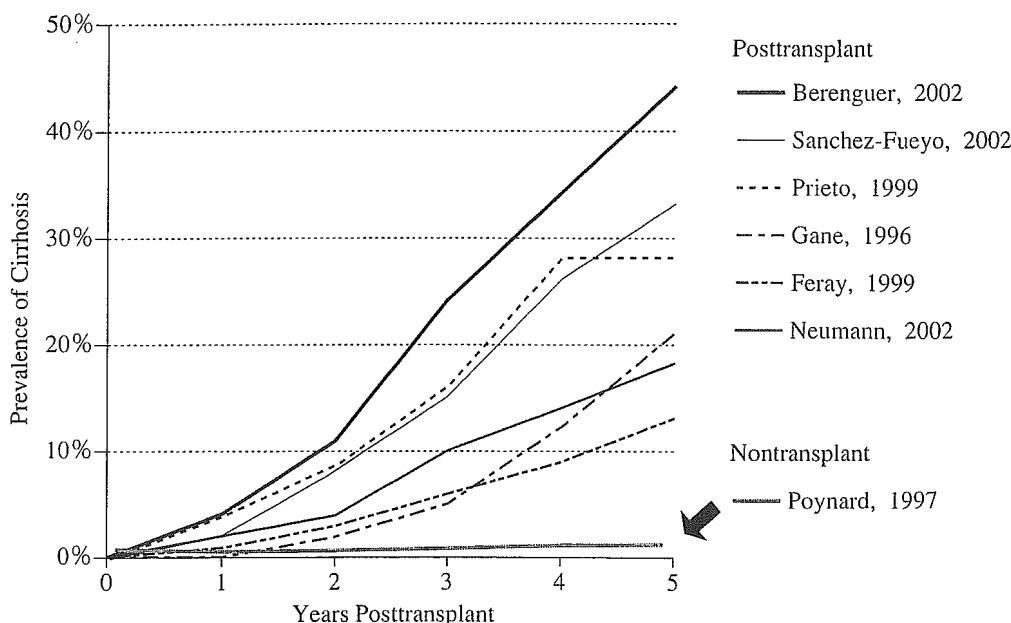


図1 Cumulative probability of developing HCV-graft cirrhosis

後の HCV 再感染を認め、大多数の患者で組織学的に肝炎の徴候を呈する<sup>14, 15)</sup>。その後、免疫抑制、高力価のウイルス量という環境の元に比較的短期間に肝硬変へ進展することが周知の事実のようになってきた。

### 3 HCV の再感染時期

HCV は肝移植術中には血中から見い出されないが、肝移植手術の数時間後に HCV のダイナミックな複製の開始が知られている<sup>16)</sup>。その後、肝生検標本を経時的に観察すると<sup>17)</sup>、組織学的には 1 週間目に肝炎の所見が見出され<sup>18)</sup>、HCV に関連した apoptosis や再生像がすでに術後 2 週間目<sup>19)</sup> から認められる。そして、HCV 関連抗原は移植後半年以内に約 90 % の肝組織内に観察される<sup>19)</sup>。HCVRNA が組織内で確認された最も早い報告で術後 5 日目という報告もある<sup>20)</sup>。

その病理学的特徴は拒絶反応との鑑別が重要であるが、acidophilic body や piecemeal 壊死などがこの肝炎の特徴的な所見とされている<sup>21, 22)</sup>。

### 4 肝炎の頻度

HCV の再感染と HCV による肝炎発症が明確に区別されずに報告されているが、HCV 陽性慢性肝炎でもほとんど無症状でトランスアミナーゼ値も軽度上昇例が多いために、臨床的に顕著となった HCV 再感染による肝炎といわゆる無症候性 HCV キャリアーの区別はここでは明確ではない。

### 5 HCV レシピエントの予後、臨床経過

HCV 陽性レシピエントの大半は再感染し、5 年間で 8 ~ 25 % は肝硬変へ進展する<sup>23)</sup>、あるいは約 80 % は慢性肝炎に陥り、肝硬変へ進行する<sup>24)</sup>とされている。筆書が以前まとめた海外での邦人脳死レシピエントはほぼ全例慢性肝炎に陥っていた。報告者により差はあるが、HCV の大半は肝移植後、再罹患することは間違いのない事実と考えるべきである。①この中で、感染してもトランスアミナーゼ値の動揺は軽微で、一般に良く見る C 型慢性肝炎と同様の臨床経過をたどる例、②短期間に肝硬変に進展し、早期に非代償性肝

硬変まで進行する例(図1)<sup>2,9,25-28</sup>), ③ HCVの顕著な増殖とともに胆汁うっ滞と進行性の線維症をみる fibrosing cholestatic hepatitis や重症型肝炎の像を呈する例などにその臨床経過は分けられる。そして, ④数パーセントの症例であるが, なんら対処しなくても感染から免れる例もわずかながら存在する<sup>29,30</sup>。

再感染後の病態に関する各種因子の関連性は上述のごとく, HCV が再感染したあとの急激な cholestatic hepatitis や重症型肝炎の発症, もしくは急速な進展様式からの肝硬変への進行例など様々である。これにはウイルス学的要因, 免疫抑制剤という環境下における生体反応の要因などが深く関わり合うとされている。

HCV の HVR1<sup>31</sup>) やそのアミノ酸の diversification の程度<sup>32</sup>), CD40 陽性 CD4T リンパ球の関与<sup>33</sup>), TH2 優位なリンパ球バランス<sup>34</sup>), CD4 はもちろん CD8 陽性 T リンパ球の関与<sup>35</sup>) などが再感染後の重症度との関連性として示唆されている。免疫抑制剤の最初の濃厚な投与が重症度と関連性がある<sup>36</sup>) とか, あるいはアザチオプリンは再感染後の病勢を抑制するとの報告もある<sup>37</sup>。

そして, サイトカイン解析では IL-10 と再発の関連性<sup>38</sup>), その遺伝的解析では TGF- $\beta$  や IFN- $\gamma$  が再発の有無との関連性を示唆した報告もある<sup>39</sup>) が, むしろウイルスの加重や性格が病態と関わるものとされている<sup>40-44</sup>)。そして, そのウイルス的要因として IgM anti-HCV core と重症度との関連性も示唆している。

また, サイトメガロウイルス感染との関連性も示唆される<sup>45,46</sup>) など, さまざまな要因が重症度との関連で報告されている。

しかしながら一方で, CD4 陽性 T リンパ球は無関係<sup>47</sup>), リバビリンをを用いると肝内

のサイトカインの変化があまり生じなかった<sup>48</sup>), さらには HCV の core と NS3 のウイルスペプチドの配列が余り変化しなかった<sup>49</sup>) として, ある種の免疫抑制剤は関連性を示さず<sup>50-52</sup>), ウイルス側の要因や免疫環境は重症度とあまり関与を示さないとの報告もある。そして, 特別な遺伝的な要因も関連性が示されなかった<sup>53-55</sup>) と報告があり, その論拠は入り乱れているし, 明確なものは示されていないようである。

さて, 肝移植後, 肝硬変へ進展する頻度は5年間で 20 ~ 30 %<sup>56,57</sup>) と高率である。あるいは平均 45 カ月の観察で約半数が肝炎の再発を認め, 三分の一が肝硬変へ進展した<sup>58</sup>) とされている。特に, ドナーの年齢 40 歳以下と 50 歳以上で線維化の進展は異なり, 平均 7.7 年で肝硬変へ進展したレシピエントは高齢者の場合はさらに早く 2.2 年の進行度であったとされている<sup>59</sup>)。

いずれにせよ, 移植後, HCV 再感染を生じたレシピエントは肝硬変への進展が極めて早いことが認識され出した<sup>60</sup>)。このことは 1990 年以降, HCV レシピエントの再移植例が増加している事実<sup>25</sup>) と合わせると, その事態の深刻さが理解されるであろう。このようにいったん, HCV に再感染し, 慢性肝炎に陥ったレシピエントは通常慢性肝炎と異なり, 肝硬変への進展が極めて早いことは驚くべき事実である。そして, この肝硬変への急速な進展の原因としてドナーの年齢の高さが示唆されている<sup>59,25</sup>)。しかし, それだけの理由で説明できるほど, 事実は単純ではないと思われる。さらなる事実の積み重ねはもちろん, 免疫抑制剤の種類の変遷, ウイルスの変異など調査することは極めて多い。単純に, 結論を導き出すには早すぎるように思える。



肝移植後のエビデンスとして、組織学的な検索から移植後の慢性肝炎の方が、通常の慢性肝炎と比較すると線維化が進行するという病理組織学的裏付けがある。通常の慢性肝炎と移植後の再発性肝炎を経時的に肝生検してその線維化の進行度を比較検討すると、明らかに移植後の再発性慢性肝炎の方が、年間の線維化進展率が高率であることが判明した<sup>61)</sup>。特に肝内の炎症反応が著明な場合(HAI スコア 9 以上)、早期に肝硬変へ進展すると言われている<sup>62)</sup>。

通常の慢性肝炎ではウイルス抗原を描出する肝細胞を target としたリンパ球による免疫反応が盛んに繰り返され、その結果、炎症が生じ、この壊死と炎症の繰り返しが線維化への進展と考えられている。ところが、なぜ HCV 再感染例は免疫抑制状態で免疫反応が起こりにくい環境なのに病勢が悪化するのか、不思議である。免疫抑制状態では HCV のタイターは非常に高い<sup>63)</sup>。しかし、B 型肝炎ウイルス (HBV) のような副腎皮質ホルモンに感受性のある glucocorticoid response element は HCV には存在しない。副腎皮質ホルモンよりタクロリムスやサイクロスポリンなどの calcineurin 抑制薬が何らかの関連性を有すると考える方が自然である。特に、低ガンマグロブリン血症やヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染している臓器移植のレシピエントでは同じことが惹起されている。しかし、このことは前述のごとく HCV によって誘発された肝疾患の古典的なモデルで細胞性免疫応答と肝障害の関連性を考えると、これはいくぶん逆説的と思わざるを得ないことも事実である。

そうすると、ウイルスに関連した因子とレシピエントに関連した因子の組み合わせが HCV 感染における病勢の進行と関連性を求めざるを得なくなる。

一つの考えとして、免疫学的に無防備なレシピエントが突然大量のウイルスの感染と増殖という負荷を受けることがある。術後早期に感染は成立し、免疫担当細胞と肝細胞の apoptosis が混在し、約 1 カ月でこれらは平衡となる。急性期では胆汁うっ滞性肝炎のように肝内 T 細胞の TH2 へのシフトが関連して慢性化を助長し、何らかの要因を得て線維化は進展し肝硬変へ進行すると考えられている。このような肝内の病理組織学的変化は免疫抑制剤の環境でいかに変化するかということになる。HCV による肝細胞に対する cytopathic な変化と表現されているが、その機構が分からない。Autophagic な自己融解、apoptosis など明確な証明が欲しいところである。以下に、もっとも現在有力と考えられている因子に関して、簡潔に述べる。

#### 1. ドナーの年齢

そこで、これらの原因の一つとして、ドナーの年齢の高齢化が挙げられている。Berenguer らの報告<sup>25)</sup>から、明らかに、ここ数年間のドナーの高齢化が示唆されている。しかし、UNOS のデータベースから、明らかな優位な差は見い出せない。

一つの可能性として、通常の HCV 感染で、若年者の罹患後の状況と、高齢者の罹患後の状況では、明らかに高齢者の方が線維化や肝硬変への進展は急速で、また肝細胞癌の移行も早急であるとされている。この事実を鑑みると、高齢のドナー肝臓への大量の HCV 感染が、線維化の進展に大いに関連があることが推測される。肝臓の老化と HCV 感染が線維化促進に関与すると考えると、肝星細胞が

Key Cell かもしれない。

## 2. 免疫抑制剤

免疫抑制剤の相違による，グラフト肝での HCV の増殖機構が異なることが示唆されている。レプリコン実験などの基礎的研究から，タクロリムスよりサイクロスポリンの方が *in vitro* の系で HCV の増殖抑制が顕著で，その抑制率はインターフェロンとほぼ同等であるとの報告が Watashi らの報告<sup>64)</sup> などから，相次いで成されてきた<sup>65)</sup>。それらを総合すると，*in vitro* ではどうも，サイクロスポリンが HCV の顕著な増殖抑制を導き出していると考えた方が妥当である。

基礎的実験と臨床応用とのギャップで，今まで幾度となく挫折したプロジェクトが多い。サイクロスポリンを肝移植後に用いた歴史は長い。果たして，サイクロスポリンが肝移植後，HCV 感染に関して有効であるかの検証が必要である。

実際に，サイクロスポリンを肝移植後使用することで肝炎進展リスクが低くなったの報告<sup>25,66)</sup>がある。一方，肝移植後の生存率やグラフト生着率に関しては賛否両論あり，Wiesner はタクロリムスの方が優れている<sup>67)</sup>が，Villamil らは LIS2T 研究でサイクロスポリンの方が死亡やグラフト廃絶が少ないとしている<sup>68)</sup>。そして，HCV の再発率に関して，両者間で優位な差異はないとする報告とともに，サイクロスポリンの方が再発率を減じるとする論文が少しずつ増えてきた。

一方，これら再発した HCV 肝炎に対する治療の介入として免疫抑制剤という環境はいかなる影響を与えるのであろうか。Casanova はタクロリムスよりサイクロスポリン投与下の方がインターフェロンとリバビリン併用療法の奏功率が高く，脱落例も少なかったとしている<sup>69)</sup>。さらに，わが国の Inoue らはサ

イクロスポリンとインターフェロンの併用療法で SVR 76.3 % と脅威的な数字を残している<sup>70)</sup>。もちろん，この両者の投与は副作用も多く，さらにわが国に多い Ib, high titer の HCV 感染レシピエントに対して，使用可能かどうか，検証することも必要となる。

## 3. ステロイドパルス

肝移植後，急性拒絶反応はもとより，カルシニューリン抑制剤とともにステロイドを併用する施設が多い。この副腎皮質ホルモンと HCV に関しては，いくつかの考えが報告されている。

HBV のように glucocorticoid response element の存在がないことより，実験系ではこのステロイドは HCV の増殖系を明確に増殖するという証明はないが，臨床的には HCV RNA を増加させるという報告がある<sup>71,72)</sup>。

そして，肝移植医療で，拒絶時に用いられるステロイドパルス療法が HCV 再感染にもっとも関与し，これがリスクファクターであるとしている報告が幾多もある<sup>73)</sup>。

さらに，ステロイドの総投与量と HCV の再発との関連性も示唆され，再発群が非再発群に比して有意にステロイドの総投与量が多いとされている<sup>74)</sup>。そして，総投与量と関連する維持量でも，ステロイドの量が多い方が生存率が低い傾向にあるともされている<sup>75,67)</sup>。

また，そのステロイドの投与期間との関連性について相反する報告があり，一定も見解は得られていないが，いずれにせよ，ステロイドは少なければ少ないほど HCV の再燃防止には都合の良い環境と思われるが，拒絶反応を誘発したり，生存率を低下させては元も子もなくなる。したがって，最低限度のステロイドパルスは必要としても，基本的には維持投与はなくす方向が最適な環境の一つにな

表1 Recurrent Hepatitis C: LDLT Versus Cadaveric Transplantation (文献76) 改変)

	症例数	肝炎再燃率 (%)		再発までの期間 (月)		ALT 上昇 (%)		重症例	
		LDLT	CAD	LDLT	CAD	LDLT	CAD	LDLT	CAD
Gaglio et al (2002) <sup>77)</sup>	18	80	58	4.2	5.5	—	—	17	12
Ghobrial et al (2002) <sup>78)</sup>	9	86	30	4.8	—	—	—	—	—
Trotter et al (2001) <sup>76)</sup>	41	—	—	3.5	6.7	12.3	60	14	—

LDLT：生体肝移植，CAD：脳死肝移植

るように思えるが，これもまだまだエビデンスを得る努力が必要となる因子である。

#### 4. 生体ドナー

生体肝移植の方が HCV 感染後の病態悪化や病状の進展が顕著であると報告された<sup>76~79)</sup> (表1)。HCV 再感染やその時期が早まること，さらには重症型肝炎が多いことが示唆された。その要因としては IRES (Internal Ribosomal Entry Site) の活性化，再生肝細胞内での HCV の濃縮，再生増殖肝細胞が LDL レセプターの upregulation を介して HCV の進入を促進する，いわゆる endocytosis の活性化が関与するなどの理由が考えられている。

したがって，アメリカでは急性拒絶反応が少なく，若年者で，肝移植前の病態が比較的軽症で，アフリカ系アメリカ人ではなく，さらに，肝移植前に HCV を除去あるいは軽減させるなどの条件が生体肝移植後の HCV の再感染を少なくする因子としている。一方で，生体肝移植では HLA の合致率が高く，さらに再生肝細胞というこの二点が生体肝移植後の HCV 再燃に不利に働くとの認識を有しているようである。

必ずしも，彼らの有利，不利な条件がわが国において，そのまま当てはまるようではないと思われる。比較的高齢者を抱えるわが国の HCV レシピエントで，生体肝移植が現時点ですべてである状況で，今なすべきことは，

①ステロイドとの関連性(パルス，総投与量，総維持量，ステロイド未使用)，②右葉グラフトと左葉グラフトとの差(再生関連)，③免疫抑制剤の種類の違い，④肝生検による線維化の進展度，⑤線維化マーカーに推移，⑥ HCV ウイルスの変異など，研究しなければならないことは沢山ある。

## 7 HCV 再感染に対する治療 (post transplant treatment)

### 1. 成績

この肝移植後の抗ウイルス療法として，ウイルス排除が目的であるが，一般に考えられている Biochemical Responder が肝移植後の臨床に意味が有るのか否か，難しいところである。すなわち，壊死，炎症反応を抑制して，線維化進展抑制を目標にして臨床的意義がもたされるのか，そして，一般的な慢性肝炎にとられるような肝細胞癌抑止を目標にすべき対象なのかも明確ではない。現時点では，ウイルス排除に固執した方が，臨床的意義が深いと考える。なぜならば，免疫抑制剤，さらには肝細胞の再生という基盤での抗炎症作用が，はたして抗線維化に繋がるか，甚だ疑問点が多いからである。

2000 年前は，インターフェロンの単独投与が行われたが，期待された効果は得られず，むしろ拒絶反応を誘発するとして多くの施設では施行されなかった。しかし，2000 年以

表2 2000年以降の post transplant treatment の成績

報告者 (文献)	症例	IFN 量 (回数)	リバビリン	期間	ETVR	SVR	脱落/減量
Samuel (80)	28	2b/3M/ (3x/w)	1,000	12M	21 %		16/28
Bizollon (81)	54	?/3M/ (3x/w)	?	6M		26 %	
Shakil (82)	38	?/3M (3x/w)	800	12M		18 %	16/38
Lavezzo (83)	57	2b/3M/ (3x/w)	800	6M	23 %	17 %	51 %
Kornberg (84)	15	2b/3M/ (3x/w)	600	12M	64 %	88 %	2/15
Narayanan (85)	26	2b/3M/ (3x/w)	1,000	12M	35 %	23 %	13/26
Wiesner (86)	9	2b/3M (3x/w)	600	12M	11 %	?	8/9
Alberti (87)	18	?3M (3x/w)	600	12M	44 %	27 %	?
Ahmad (88)	20	2b/3-5 (3x/w)	600	12M	20 %		5/20
De Vera (89)	32	?/1.5-3M (3x/w)	400	12M	9 %		13/32
Coltler (90)	12	2a/3M (3x/w)	—	12M	50 %	?	7/8

降, HCV レシピエントの急速な病状悪化から, 盛んに抗ウイルス療法の臨床試験が試みられてきた(表2)<sup>80~90)</sup>. すべて欧米の報告であるため, 感染時期の相違, ウイルスのサブタイプの違い, 人種間の相違など一概に本邦での慢性肝炎や肝移植後の慢性肝炎に対する治療結果と比較検討することは困難である. そこで得られつつある結論は, インターフェロン単独療法よりインターフェロンとリバビリン併用療法の方がウイルス排除やトランスアミナーゼ値の正常化率は高率である. しかし, 半数以上のレシピエントで併用療法の中止か薬剤投与量の減量などで, 当初の目的を達せられずに治療を断念する症例が圧倒的に多いということである.

わが国でも, Sugawara がインターフェロン治療を行い, 50 %弱の SVR を得られたと報告している. これらの大半は Genotype I の高ウイルス量であることから, この治療効果は注目に値する<sup>91)</sup>.

今, 考えられているのは, ①肝移植後, 3~6 カ月以内にインターフェロンとリバビリン併用療法を速やかに開始する. ②可能な限りステロイドは離脱状況が望ましい. ③そして, 副作用の点からインターフェロン用量, 投与間隔, リバビリン用量は適宜漸減して,

少なくとも半年, 可能であれば 48 週間継続投与が望ましい. ④脱落例に対しては, 通常の慢性肝炎治療に即してトランスアミナーゼ値を正常化させるなどの, 抗炎症療法を継続せざるを得ないと思われる. 適切な薬剤として強力ネオミノファーゲン C と UDCA 辺りが妥当であろうか. その場合, 線維化の進展抑制が目標となるであろうが, 臨床的事実は一つもないのが現状である, などである. 特に, 肝移植後, 何時, 抗ウイルス療法を開始するかが, 一つの問題点である. 肝移植後のプロトコル肝生検の妥当性は別として, 術後 3~6 カ月, 1 年, 1.5 年後に肝生検を施行して, F1/A1 以上の変化が見られた段階で抗ウイルス療法 (ペグインターフェロンとリバビリン) を開始するのが世界の趨勢になりつつあるようである.

## 2. なぜ, 治療完遂できないのか

骨髄抑制, 溶血性貧血などの副作用出現頻度が高率なペグインターフェロンとリバビリン併用療法を通常の C 型慢性肝炎に行う場合でも, おおよそ 20 % は減量もしくは投与中断, 中止に追い込まれる. これを多くの薬剤投与とともに, 免疫抑制剤の濃度を高めに設定している状況で, 再生機転が進行形の肝細胞に作用させるのであるから, 副作用が増