

Ⅲ. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書

血小板減少による肝線維化増悪の分子機序

研究代表者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨：C型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 治療において血小板数の低下は非奏効に強く関与する因子である。血小板低下は肝線維化の進展とともに Peg-IFN 投与の減量とも関連しており、このことが非奏効に関連する一因になっている。また、血小板数の低下は出血傾向を助長し、C型肝炎からの肝がんの発生に際して、RFA などの内科的治療を行う際の障害になっている。このように血小板数の低下は肝疾患診療上の重要な問題であるが、血小板減少そのものが肝疾患の病態形成にどのような影響を与えるかは十分に理解されていない。昨年度、我々は血小板の寿命を制御する分子である Bcl-xL を血小板特異的にノックアウトし、血小板減少が胆汁鬱耐性肝障害モデルにおいて、肝線維化を有意に増強することを明らかにした。そのメカニズムとして、血小板が肝星細胞との接触により活性化され HGF を産生することにより、星細胞の I 型コラーゲン産生を抑制することを明らかにした。本年度は血小板減少マウスにおける HGF/c-Met 経路の動態を解析し、HGF の投与が血小板減少による肝線維化の増悪を抑止するかどうかを検討した。血小板減少マウスでは同腹対照マウスに比し、肝障害時の血清 HGF 濃度が有意に低値であり、血小板由来 HGF のインパクトの大きさが示唆された。HGF による治療実験を行ったところ、血小板減少マウスの肝線維化は同腹対照マウスのレベルまで改善した。血小板減少時の肝線維化増悪における HGF/c-Met 経路の生体レベルでの重要性が示された。

共同研究者

小玉 尚宏 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

慢性肝炎/肝硬変は肝線維化を病態の中心とする疾患であり、進展すると肝不全や肝細胞がんなどの致死的な疾患を引き起こす。

そこで、その進行を阻止することは重要な課題であるが、その為には肝線維化の病態を解明することが必要である。肝線維化は、肝臓での慢性的な炎症や肝細胞死などによって惹起される肝星細胞・線維芽細胞の活性化と、それに引き続くコラーゲンなどの細胞外マトリックス産生の亢進がその病態

の中心と考えられているが、いまだ不明な点も多い。一方、慢性肝炎/肝硬変では、病態の進行に伴い血小板が減少し、肝線維化と血小板数は非常に密接な負の相関関係にあることが知られている。この血小板減少は、門脈圧亢進に伴う二次性脾機能亢進症により脾臓における血小板破壊が亢進することや、肝臓での TPO (Thrombopoietin) 産生低下に起因しており、つまり肝線維化が進行した結果であると考えられている。しかし逆に、血小板減少が肝線維化に影響を与えるかどうかについての詳細な検討は行われていない。近年、血小板はその生理学的な凝固・止血機能のみならず、組織修復、血管新生など多彩な機能を有していることが明らかにされており、肝臓領域においても炎症や再生に関与することが報告されているが、肝線維化に対する血小板の作用は明らかにされていない。血小板減少の肝線維化に対する影響、また血小板自体の肝線維化に対する役割を検討することは、肝線維化の病態の理解、並びに肝線維化進展抑制の為の新規治療を検討する上で重要であると考えられる。

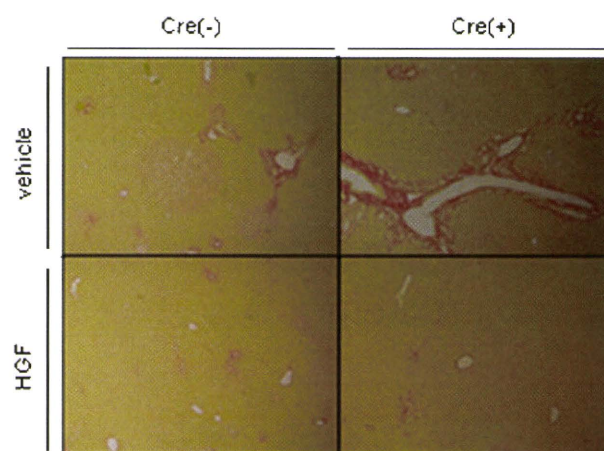
昨年度、我々は血小板の寿命を制御する分子である Bcl-xL を血小板特異的にノックアウトし、血小板減少が胆汁鬱耐性肝障害モデルにおいて、肝線維化を有意に増強するところを明らかにした。そのメカニズムとして、血小板が肝星細胞と接触により活性化され HGF を産生することにより、星細胞の I 型コラーゲン産生を抑制することを明らかにした。本年度は血小板減少マウスにおける HGF/c-Met 経路の動態を解析し、HGF の投与が血小板減少による肝線維化の増悪を抑止するかどうかを検討した。

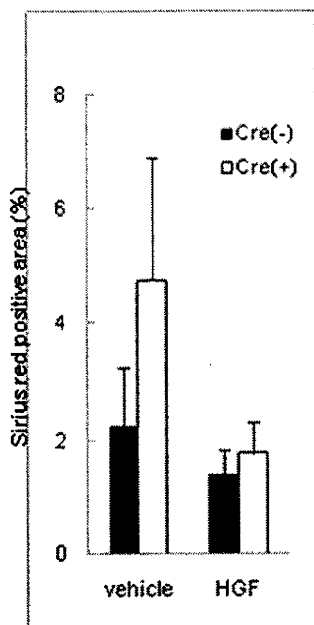
B. 研究方法

Pf4-Cre bcl-x fl/fl マウスと bcl-x fl/fl マウスを交配し、前者を血小板減少マウス、後者を同腹対照マウスとして実験に使用した。血小板減少マウスと対照マウスに総胆管結紮術 (以下 BDL) を施行し、10 日後に犠死させ、試料を採取した。また、治療実験としてヒト HGF あるいは vehicle を連日腹腔内に投与した。

C. 研究成果

野生型マウスでは BDL 後血清 HGF 値が有意に増加したが、血小板減少マウスではこの上昇がみられなかった。また、野生型マウスでは BDL 後に肝臓内 c-Met の活性化がみられたが、血小板減少ではみられなかった。血小板減少マウスに対する HGF の連日投与により BDL 後の肝線維化の増悪は対照マウスのレベルにまで改善した (下図)。





D. 考察と結論

血小板には、活性化により HGF を放出し、肝星細胞の I 型コラーゲン産生を抑制するという、新規の抗線維化作用が存在することが明らかとなった。このメカニズムは生体レベルでも働いていることが示された。

E. 研究発表

論文発表

1. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52: 698-704, 2010.
2. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A,

Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 138: 2487-2498, 2010.

3. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. *Hepatology* 51: 1264-1273, 2010.
4. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52: 1310-1321, 2010.

学会発表

AASLD2010

The Liver Meeting 2010

Oct 29~Nov 2, 2010 Boston Hynes Convention Center

519. ABT-737, a Bcl-xL inhibitor, enhances the anti-tumor effect of sorafenib against hepatocellular carcinoma. . H. Hikita; T. Takehara; S. Shimizu; T. Kodama; W. Li; M. Shigekawa; A. Hosui; T. Miyagi; H. Ishida; T. Tatsumi; T. Kanto; N. Hiramatsu; N. Hayashi

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究（竹原班）
C型慢性肝炎における宿主遺伝子多型と抗ウイルス効果

研究分担者 泉 並木 武蔵野赤十字病院副院長

研究要旨：C型慢性肝炎に対してペグインターフェロン（PEGIFN）とリバビリン（RBV）併用が標準治療となっている。宿主遺伝子多型が治療効果に関与するため、解析した。IL28Bのminor alleleでは治療中にHCV RNAが陰性化しない無反応例が54%であるが、SVRが16%にみられた。IL28BがMajor alleleの症例ではSVRが54%であった。IL28BがMinor alleleであってもSVRが得られた例ではHCV RNA陰性化が遅延する例が多いが、72週間の延長治療によって13例がSVRとなり、このうち56%がITPAのalleleがminorで貧血になりにくい例であった。ITPAがminor alleleの場合はリバビリンの投与量が十分確保できるため、SVRが得られると考えられる。これらの宿主要因を加味して治療戦略を考えることが重要である。

A. 研究目的

Genotype 1b型のC型慢性肝炎ではペグインターフェロン（PEGIFN）とリバビリン（RBV）併用での抗ウイルス効果が宿主遺伝子多型と関連することが報告されている。また、RBVによる貧血とITPA遺伝子多型が関連することが判明している。しかし、実際のわが国の患者で両者の遺伝子多型が治療効果とどのように関連しているのかについては明らかにされていない。われわれの施設で実際に治療を受けた症例で、宿主遺伝子多型の影響について解析した。

B. 研究方法

当院で2004年以降にPEGIFNとRBV併用によって治療を受けたGenotype 1b型かつ高HCV RNA量のC型慢性肝炎で、宿主遺伝子であるIL28Bの多型を測定しえた865例を対象にした。IL28Bはrs12979860とrs8099917の両者を測定した。ITPA遺伝子多型はrs1127354を測定し、CCをmajor allele、CAまたはAAをminor alleleと分類した。全例genotype 1b型かつ高HCV RNA量の症例で、治療前のHCVコア70と91変異、およびISDR変異を直接塩基配列決定法によって測定した。治療はペグインターフェロン（PEGIFN） α 2aと2bのいずれかを週1回投与し、リバビリン（RBV）は体重換算で規定の投与量を投与した。治療開始12週目までにHCV RNAが陰性化した例は48週間、それ以降24週目までにHCV RNAが陰性化した例では72週間の治療を行い、24週目でHCV RNAが陰性化しない例を無反応（null response ; NR）と判定した。治療中にHCV RNAが、一度陰性化した再燃した例をrelapseとし、治療終了6カ月後までHCV RNAが陰性になっていた例をsustained virological response (SVR)と判定した。全例治療開始前に肝生検を行い、新犬山分類で肝組織所見を評価した。

（倫理面への配慮）

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護

等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した（新GCPに遵守）。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

PEGIFN α 2bとRBV併用治療で、409例の治療効果判定が行えており、SVRがintention-to-treat (ITT)で41%、perprotocol (PPS)で65%であった。治療中HCV RNAが陰性化しないNVRが13%、一度HCV RNAが陰性化するが再燃するrelapse例が22%であった。治療前のIL28Bの遺伝子多型を解析した。C型慢性肝炎全体で、re 8099917がmajor alleleのTTであったのが73.1%、minor alleleのTGが25.3%、GGが1.6%であった。これを欧米で測定されているrs12979860と比較すると、それぞれの一致率が98%であり、いずれを測定しても大きな違いがなかった。それぞれのalleleと治療効果の関連を検討したところ、major alleleの症例ではSVRが54%にみられていたが、relapseが39%、NVRが7%であった。一方、minor alleleの症例ではSVRは16%であり、relapseは28%、NVRが54%であった。Genotype 2aと2b型ではmajor alleleの症例ではSVRが83%、relapseが15%、NVRが2%であり、minor alleleの症例ではSVRが75%、relapseが17%、NVRが8%であり、IL28Bの遺伝子多型と治療効果の関連性は乏しかった。一方、RBVによる貧血に関連するITPA遺伝子多型であるrs1127354の頻度を測定したところ、major alleleであるCCが70.2%であり、minor alleleはそれぞれCAが27.1%、AAが2.7%であった。ITPA遺伝子型と治療中にヘモグロビン値が10 g/dl未満の貧血を併発する率を解析したところ、CCのalleleの症例では53%が貧血になったのに対して、CAの例が18%、AAの症例では0%であった。Genotype 1b型かつ高HCV RNA量例について治療中のHCV RNA陰性化時

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
研究分担報告書

期とIL28Bの遺伝子多型の関連を検討した。4週目にHCVRNAが陰性化するrapid virological response (RVR)はIL28Bがmajor alleleだと8%であるが、minor alleleだと1%であり、12週目までにHCVRNAが陰性化するearly virological response (EVR)は、IL28Bがmajor alleleの例で38%であったが、minor alleleの例では7%にすぎなかった。24週目までにHCVRNAが陰性化するlate virological response (LVR)はminor alleleの症例の18%にみられたが、この例では72週間の延長治療を行うことによって、58%にSVRが得られた。IL28Bがminor alleleで72週間の延長治療によってSVRが得られた例では、9例中8例がITPAがminor alleleであり、貧血になりにくいいためRBVが十分投与できた症例であった。ITPA遺伝子多型と、再燃率の関連を検討したところ、major alleleのCCの症例では82%であったのに対し、CAやAAのminor alleleの症例では33%であった。

D. 考察

我が国では、genotype 1bかつ高HCVRNA量の難治性C型慢性肝炎が7割を占め、治療抵抗性であることが問題となっている。高い発癌率を改善するために治療効果を改善することが重要である。最近、宿主の遺伝子であるIL28Bの遺伝子多型が、PEGIFN α とRBV併用療法の効果と関連することが認められ、治療前に測定して治療戦略をたてるのが求められている。さらに、RBVによる溶血性貧血にかかわるITPA遺伝子多型が発見され、これらの宿主遺伝子多型と治療戦略の関わりを解析することの意味付けが重要となっている。

今回の解析ではIL28Bの遺伝子多型は、従来の報告どおりminor alleleではNVRが多く、難治であることが認められた。しかし、IL28Bがminorの症例でもSVRが得られる例が16%に得られた。その条件としてHCVRNAの陰性化が治療開始12週目以降に遅延しても、72週間の延長治療を行うことによって半数以上にSVRが得られることが証明された。24週目までにHCVRNAが陰性化しない例では、それ以上治療期間を延長してもSVRが得られない。

さらに、IL28Bがminor alleleで12週目以降にHCVRNAの陰性化が得られた例では、72週間の期間延長治療を行うとSVRが得られることが多いが、その症例はITPAの遺伝子多型がminor alleleであることが多かった。したがって、ITPAがminor alleleの例では、HCVRNAの陰性化が得られた場合に72週間の治療を行うべきであると考えられた。ITPA遺伝子がminor alleleであった場合には、RBVによる貧血になりにくいいため、RBVの投与量を確保できるためSVR率が向上すると考えられた。これらの宿主遺伝子情報をもとに、難治性C型慢性肝炎の治療戦略をたてていくことが重要と考えられる。

E. 結論

難治性C型慢性肝炎におけるPEGIFN α とRBV併用の治療効果には宿主遺伝子であるIL28Bと、ITPA多型が関係する。今後はこれらの宿主遺伝子情報を考慮にいたれた治療戦略をたてるのが治療効果改善や副作用防止のために重要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1)Asahina Y, Izumi N.et al. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. Hepatology 2010;52:518-27.
- (2)Kurosaki M, Izumi N, et al. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. J Hepatol 2010 in press.
- (3) Kurosaki M, Izumi N. et al. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C is a significant risk factor for developing hepatocellular carcinoma independent of age, sex, obesity, fibrosis stage and response to interferon therapy. Hepatol Res 2010;40:870-7.

2. 学会発表

1. 朝比奈靖浩他. 第46回日本肝臓学会総会シンポジウム、平成22年5月27日、山形。
2. 黒崎雅之他. 第46回日本肝臓学会総会ワークショップ 山形。
3. 朝比奈靖浩他. 第14回日本肝臓学会大会パネルディスカッション 平成22年10月15日 横浜。
4. 黒崎雅之他. 第14回日本肝臓学会大会 平成22年10月14日 横浜。
5. 加藤知爾他. 第37回日本肝臓学会総会シンポジウム 平成22年12月4日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
今回の研究については予定なし。

C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究

研究分担者 伊藤義人 京都府立医科大学医学研究科消化器内科学准教授

研究要旨：

1) ペグインターフェロン・リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法の簡便な治療前効果予測式の検証：昨年度の研究で48週間のPEG-IFN/RBV併用療法を受けた1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者230例において簡便な治療前治療効果予測式として男性 2点+HCV RNA 量 <1000 KIU/mL 3点+ \geq 血小板15万 1点+年齢<60歳 1点を作成し著効 (SVR) 率を検討した。0～1点23.8% (10/42)、2～4点48.1% (63/131)、5～7点70.2% (40/57)であった。今回、108例でこの予測式の妥当性を検証したところ、SVR率が0～1点7.1% (1/14)、2～4点38.6% (22/57)、5～7点70.3% (26/37)と妥当性が示され、それぞれ、低反応群、中等度反応群、中等度～高度反応群と考えられた。また、ISDRとコアのアミノ酸変異と加味した男性 3点+低HCV RNA 量 3点+血小板高値 1点+低年齢 1点+ISDRアミノ酸変異2個以上 2点+コア70のアミノ酸変異野生型 2点とする治療前治療効果予測式を作成するとSVR率は0～3点4.8% (1/21)、4～7点40% (27/62)、8～12点84% (21/25)であり、さらに精度の高い簡便な予知式が作成されたものと考えられた。

2) 血清ALT持続正常C型慢性肝炎の10年以上の経過と治療成績：わが国における血清ALT持続正常C型慢性肝炎患者の10年以上の長期予後とその治療成績について検討した。44例のALT持続正常C型慢性肝炎患者を13.3 [10.1-18.3]年間経過観察したところ、5/44例 (11.4%)はALT値持続正常値を続け、28/44例 (11.4%)は一過性ALT値異常、11/44例 (25.0%)は持続的な肝機能異常が出現した。抗ウイルス療法のSVR率はGroup 1で50% (3/6)、Group 2で100% (7/7)であった。

A. 研究目的

1. ペグインターフェロン・リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法の簡便な治療前効果予測式の検証：わが国では、Group 1高ウイルス量のC型慢性肝炎患者数が多い。また、C型慢性肝炎患者は最近では高齢化しており、難治例に対する安全で経済的・効率的な治療指針の樹立が必要である。また、肝臓専門医以外の一般内科医が利用しやすい簡便な治療前の効果予測式で著効が期待さ

れる例・難治例を選別することが潜在的な要治療患者の拾い上げに貢献すると考えられる。我々は約600例の過去のペグインターフェロン・リバビリン (PEG-IFN/RBV) 併用療法の治療成績をもとに、性別、肝組織の線維化、HCV RNA 量、HCV core やISDRの変異がPEG-IFN/RBV 併用療法の治療成績に密接に関わることを明らかにしてきた。今回、簡便な治療指針の樹立のため、一般血液・生化学検査のみ、またはそれにウイルス側 (core、ISDRの変異) の因子を加味した

PEG-IFN/RBV併用療法の簡便な治療前効果予測式を作成し、その妥当性を検証した。

2. 血清ALT持続正常C型慢性肝炎の10年以上の経過と治療成績：血清ALT持続正常C型慢性肝炎患者の治療の要否については以前より議論されていたところであるが、米国肝臓学会や我が国の肝臓学会の治療ガイドラインにおいては、血清ALT値にとらわれず治療適応を個別に評価することが提唱されている。一方、わが国における血清ALT持続正常C型慢性肝炎患者の10年以上の長期予後は治療指針の樹立に寄与すると考えられるも、その点に関する報告は少なく、今回その予後と治療成績について検討した。

B. 研究方法

1. ペグインターフェロン・リバビリン(PEG-IFN/RBV)併用療法の簡便な治療前効果予測式の検証：京都府立医大消化器内科と関連施設で48週間のPEG-IFN/RBV併用療法を受け、すでに治療効果判定が終了した1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者約230例を対象とし、著効(SVR)例と非SVR例に分類し、単変量・多変量解析をもとに治療前治療効果予測式を作成した。今回、別の108例で予測式の妥当性を検証する。さらに、C型肝炎ウイルスのISDR・Core70の変異の有無を加えた治療前治療効果予測式の有用性を検討する。

2. 血清ALT持続正常C型慢性肝炎の10年以上の経過と治療成績：血清ALT値持続正常C型慢性肝炎患者44例に関して10年以上の長期予後と抗ウイルス療法の治療成績を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は京都府立医科大学医学倫理委員会の承認を得ており、被検者からは文書によ

る同意を得ている。

C. 研究結果

1. PEG-IFN/RBV併用療法の簡便な治療前効

果予測式の作成：昨年度の研究で、48週間のPEG-IFN/RBV併用療法を受けた1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者約230例の血液・生化学検査結果を用いて単変量解析で有意差の得られた項目に対して多変量解析を行い、簡便な治療前治療効果(SVR)予測式として男性2点+HCV RNA量<1000 KIU/mL 3点+血小板15万1点+年齢<60歳1点を作成しSVR率を検討したところ0~1点23.8%(10/42)、2~4点48.1%(63/131)、5~7点70.2%(40/57)であり、それぞれ、低反応群、中等度反応群、中等度~高度反応群と考えられた。今回、108例でこの予測式の妥当性を検証したところ、1点以下7.1%(1/14)、2~4点38.6%(22/57)、5~7点70.3%(26/37)であり、それぞれ、低反応群、中等度反応群、中等度~高度反応群と考えられ、予測式の妥当性が示された。また、HCVのISDRとコアのアミノ酸変異と加味し、単変量解析で有意差の得られた項目に対して多変量解析を行い、男性3点+低HCV RNA量3点+血小板高値1点+低年齢1点+ISDRアミノ酸変異2個以上2点+コア70のアミノ酸変異野生型2点とする治療前治療効果予測式を作成した。SVR率は0~3点4.8%(1/21)、4~7点40%(27/62)、8~12点84%(21/25)であり、さらに精度の高い簡便な予知式が作成されたものと考えられた。

1. 血清ALT持続正常C型慢性肝炎の10年以上の経過と治療成績：44例のALT持続正常C型慢性肝炎患者を13.3[10.1-18.3]年間経

過観察した。5/44例(11.4%)はALT値持続正常値を続け、28/44例(63.6%)は一過性ALT値異常、11/44例(25.0%)は持続的な肝機能異常が出現した。また、登録時に血清ALT値が20 IU/L以上であった症例では早期にALT値異常となる傾向にあった。血清ALT値異常を認めた症例に対する抗ウイルス療法のSVR率はGroup 1で50% (3/6)、Group 2で100% (7/7)であった。

D. 考察

C型慢性肝炎患者の高齢化に伴い、安全で経済的・効率的な治療指針の樹立が必要である。そのためには、治療前に効果予測を行い、著効例・難治例を選別することが重要である。また、肝臓専門医以外の一般内科医が利用しやすい簡便な治療前の効果予測式で著効が期待される例・難治例を選別することは潜在的な要治療患者の拾い上げに貢献するものと考えられる。我々は、今回、過去のPEG-IFN/RBV併用療法の治療成績をもとに作成したSVR予測スコアを検証し、その有用性を示した。また、C型肝炎ウイルスのISDR・Core70の変異の有無を加えた治療前治療効果予測式が、さらに有用であることを示した。最近、IL28BのSNIPsがPEG-IFN/RBV併用療法の無効例の予測に有用であるとの報告があり、今後、さらに優れた治療前効果予測式が作成可能となるものと考えられる。5年間の経過観察を行った血清ALT持続正常C型慢性肝炎に関する我々の以前の検討で5年間ALT値持続正常であったものは14%であった。今回10年以上の経過観察をし得た症例のうちALT値持続正常であった症例は11%で5年間の経過観察を行った場合の成績と大きな差はみられなかった。しかし、登録時に血清ALT値が20 IU/L以上であった症例は早期にALT高値になる傾向があるため

治療が勧められる。米国肝臓学会の治療ガイドラインで血清ALT値にとらわれず治療適応を個別に評価することが提唱されているが、血清ALT持続正常のC型慢性肝炎の約90%にALT異常がみられることより今後積極的に治療に踏み込むことが重要と考えられる。

E. 結論

1. PEG-IFN/RBV併用療法を受けた1b高ウイルス量のC型慢性肝炎患者のSVR予測スコアを作成しその有用性を示した。
2. 血清ALT持続正常のC型慢性肝炎患者は10年間の経過観察で約90%にALT異常がみられることより、特にALT値が20 IU/L以上の症例では今後積極的に治療を行うことが勧められる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, Tsuji K, Endo M, Nakajima T, Minami M, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 45:95-104, 2010.
- 2) Park H, Ishigami A, Shima T, Mizuno M, Maruyama N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. J Hepatic senescence marker protein-30 is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 45: 426-34, 2010.

- 3) Tsuji K, Yasui K, Gen Y, Endo M, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 198 : 118-25, 2010.
- 4) Nakajima T, Nakashima T, Okada Y, Jo M, Nishikawa T, Mitsumoto Y, Katagishi T, Kimura H, Itoh Y, Kagaea K, Yoshikawa T. Nuclear size measurement is a simple method for the assessment of hepatocellular aging in non-alcoholic fatty liver disease: comparison with telomere-specific quantitative FISH and p21 immunohistochemistry. *Pathol Int.* 60 : 175-183, 2010.
- 5) Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu A, Hayashi N, Kudo M. Management of hepatitis C; Report of the consensus meeting at the 45th annual meeting of Japan Society of Hepatology (2009). *Hepatol Res* 40: 347-368, 2010.
- 6) Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Fujii H, Okanoue T, Yoshikawa T. Blockade of interleukin-6 signaling enhances hepatic steatosis but improves liver injury in methionine choline deficient diet-fed mice. *Lab Invest* 90: 1169-1178, 2010.
- 7) Fujii H, Itoh Y, Ohnishi N, Sakamoto M, Ohkawara T, Yamaguchi K, Minami M, Sawa Y, Ohkawara Y, and Yoshikawa T. Relapse of Hepatitis C in a Peginterferon alpha2b plus Ribavirin-Treated Sustained Virological Responder. *Hepatol Res* 40: 654-660, 2010.
- 8) Sumida Y, Yonei Y, Kanemasa K, Hara T, Inada Y, Sakai K, Imai S, Hibino S, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Itoh Y, Naito Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Lower circulating levels of dehydroepiandrosterone, independent of insulin resistance, is an important determinant of severity of nonalcoholic steatohepatitis in Japanese patients. *Hepatol Res* 2010 4 : 901-10
- 9) Yasui K, Sumida Y, Mori Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Kanemasa K, Matsubara H, Okanoue T, Yoshikawa T. Nonalcoholic steatohepatitis and increased risk of kidney disease. *Metabolism.* 2010 Sep 1. [Epub ahead of print]
- 10) Park H, Hasegawa G, Shima T, Fukui M, Nakamura N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Kitawaki J, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. The fatty acid composition of plasma cholesteryl esters and estimated desaturase activities in patients with nonalcoholic fatty liver

- disease and the effect of long-term ezetimibe therapy on these levels. *Clin Chim Acta*. 411: 1735-40, 2010.
- 11) Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2010 Jul 24. [Epub ahead of print]
- 12) Gen Y, Yasui K, Zen Y, Zen K, Dohi O, Endo M, Tsuji K, Wakabayashi N, Itoh Y, Naito Y, Taniwaki M, Nakanuma Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Gen SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 202: 82-93, 2010.
- 13) Sumida Y, Kanemasa K, Inada Y, Hara T, Saikai K, Imai s, Yoshinda N, Yadsui K, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Impact of amino acid substitutions in the Hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and glucose tolerance in non-cirrhotic patients without overt diabetes. *J Gastroenterol Hepatol* 2010 Nov 3 (Epub ahead of print)
- 14) Itoh Y, Nishimura T, Hashimoto H, Yamaguchi K, Niimi T, Yokomizo C, Fujii H, Mimami M, Yasui K, Mitsuyoshi H, Okanoue T, Takehara T, Hiasa Y, Onji M, and Yoshikawa T. A Simple and Convenient Formula to Predict the Response to Peginterferon alpha2b and Ribavirin Combination Therapy in Genotype 1 Chronic Hepatitis C Patients with High Viral Loads. *Hepatol Res* (in press)
- 15) Yamaguchi K, Itoh Y, Yokomizo C, Nishimura T, Niimi T, Umemura A, Fujii H, Okanoue T, Yoshikawa T. Blockade of IL-6 Signaling Exacerbates Liver Injury and Suppresses Anti-Apoptotic Gene Expression in Methionine Choline Deficient Diet-Fed db/db Mice. *Lab Invest* (in press).
- 16) Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajimal Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Nishimura-Sakurai, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Masashi Mizokami M, Watanabe M and the Ochanomizu-Liver Conference Study Group. Association of IL28B variants with response to pegylated- interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Med Virol* (in press)
- 17) Takasaka T, Itoh Y, Kaneko H, and Ikegaya H. Detection of hepatitis C virus and antibodies in postmortem blood and bloodstains. *J Clin Microbiobiol* (in press)

2. 学会発表

- 1) 西村 健、伊藤義人、横溝千尋、新美敏久、橋本宏明、山口寛二、光吉博則、安居

幸一郎、南 祐仁、岩井真樹、吉川敏一。
Genotype2型高ウイルス量のC型慢性肝炎に
対する Peg-IFN/Ribavirin 併用療法の治療
抵抗因子ならびに適切な治療期間の検討
第 95 回日本消化器病学会総会 2010 年 4 月
22 日 (新潟)

2) 西村 健、伊藤義人、山口寛二、横溝千
尋、新見敏久、光吉博則、安居幸一郎、南
祐仁、岩井真樹、吉川敏一。Genotype 1b 高
ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する
Peg-IFN/Ribavirin 併用療法における cEVR
最適な治療機関に関する検討。第 46 回日本
肝臓学会総会 2010 年 5 月 28 日 (山形)。

3) 西村 健、伊藤義人、山口寛二、横溝千
尋、新見敏久、光吉博則、安居幸一郎、南
祐仁、岩井真樹、岡上 武、吉川敏一。血
清 ALT 持続正常の C 型慢性肝炎の 10 年以
上の経過。第 14 回日本肝臓学会大会 2010 年
10 月 14 日 (横浜)。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書（平成 22 年度）

研究分担課題：C 型慢性肝炎症例における肝臓の低栄養状態とインターフェロン応答・不応答の解析

研究分担者 金子周一 金沢大学大学院恒常性制御学 教授

研究要旨：C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与し、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子が重要な働きを演じている。肝臓の低栄養状態の指標である Fischer 比の低下はインターフェロン治療抵抗性と有意に関連した因子であった。肝における網羅的遺伝子発現解析から Fischer 比の低下は肝の mTOR シグナル低下と関連することが実証された。培養細胞の検討では低アミノ酸状態では mTORC1 の下流である pS6K の発現の低下と同時に pSTAT1 の発現低下が認められた。HCV 感染クローンを用いた検討では低アミノ酸状態では HCV の複製亢進が起こり BCAA 添加により HCV の複製は抑制された。また ISG の一つである Mx の発現は BCAA 添加により誘導された。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与している。近年 IL28B の遺伝子多型が Peg-IFN+Rib 併用療法の治療反応性を決定する重要な宿主因子であることが報告された。しかしながら、それ以外にも年齢、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子をはじめ、ISDR やコア領域変異を代表とするウイルス側因子も治療抵抗性に寄与していると考えられる。本研究では、特に肝臓の低栄養状態の観点からインターフェロン応答・不応答の解析を行った。

B. 研究方法

ペグイントロン+レボトル併用療法を行った 168 例を対象とし、全症例において、血中アミノグラム解析を行い各種臨床パラメーターと併せ解析した。95 症例において肝組織の遺伝子発現を affymetrix gene chip により解析した。Huh7 細胞及び HCV 感染クローン(G1a 由来)を用いて低アミノ酸状態における IFN シグナルを解析した。

C. 研究結果

168 例の治療効果の内訳は SVR70 例、TR55 例、NR43 例であった。多変量解析の結果、線維化進展 (Odds=5.91, $p=0.0018$)、IL28B マイナー (Odds=20.0, $p<0.001$)、肝組織 ISGs (Odds=4.60, $p=0.021$)、Fischer 比 (Odds=8.07, $p=0.014$)、ISDR 変異 (Odds=4.23, $p=0.016$) が有意因子として抽出された。Fischer 比の低下はインターフェロン治療抵抗性と有意に関連した因子であった。

肝における網羅的遺伝子発現解析結果から BCAA 代謝に関わる BCAT1 の発現は Fischer 比と有意に逆相関

を示した。また BCAT1 を誘導する c-myc との発現に有意な正の相関を認めた。mTORC1 下流の S6K により転写レベルで負の制御を受ける PDCD4 は BCAT1 と正の相関を認めた。以上より、慢性 C 型慢性肝炎組織では c-myc の発現と共に BCAT1 の誘導が起こり BCAA の低下、mTORC1 シグナルの低下が起こっていると考えられた。

培養細胞 Huh7 において低アミノ酸状態ではリン酸化 mTOR の発現低下、mTORC1 下流の pS6K の発現低下を認めると同時に pSTAT1 の発現低下が認められた。HCV 感染クローンを用いた検討では低アミノ酸状態では HCV の複製亢進が起こり、BCAA 添加により HCV の複製は抑制された。また ISG の一つである Mx の発現は BCAA 添加により誘導された。

D. 考察

C 型慢性肝炎の治療抵抗性には様々な因子が関与し、肝線維化、脂肪化、インスリン抵抗性などの宿主因子が重要な働きを演じている。なかでも肝線維化の進行に伴い治療抵抗性が増強することは、異なるゲノタイプでも共通して認められ、その機序に関して十分に解明されてこなかった。肝線維化の進行に伴う治療抵抗性のメカニズムには血流、薬物の delivery など様々な因子が関連する可能性があるが、今回、肝の栄養状態に注目して解析を行った。血中アミノグラムの解析から Fischer 比の低下が治療抵抗性と密接に関連することが明らかとなり、BCAA の低下が重要な因子であった。近年、mTOR シグナルがインターフェロン応答に重要な役割をすることが明らかにされている (Nature. 2008 Mar 20;452(7185):323-8)。肝線維化進行例では mTOR シグナルの減弱が起こり、インターフェロン応答の低下が起

こっていると推察される。培養細胞を用いた検討では低アミノ酸状態では mTOR シグナル及び下流の pS6K の発現低下を認めると同時に pSTAT1 の発現低下が認められた。また HCV 感染クローンをを用いた検討により BCAA により ISG を誘導し HCV の複製が抑制された。以上より、肝の栄養状態を改善することによりインターフェロン応答を改善し、治療成績の向上に繋がることが示唆された。

E. 結論

肝の低栄養状態では mTORC1 を介したインターフェロン応答の低下が起こっており、BCAA によりインターフェロン応答の回復が認められた。今後、肝の低栄養状態とインターフェロン抑制系である SOCS3 シグナルとの関連性を検討する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M and Kaneko S. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. (in press)
2. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol*. (in press)
3. Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. (in press)
4. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010 Nov 3;12(5):483-95.
5. Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2010 Nov;53(5):817-26. Epub 2010 Jul 15.
6. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis*. 2010 Jul 1;202(1):75-85.
7. Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4687-97.
8. Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Sep 10;400(1):7-15.
9. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):499-509.
10. Ootsuji H, Honda M, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M. Altered hepatic gene expression profiles associated with myocardial ischemia. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 ;3(1):68-77.
11. Hodo Y, Hashimoto S, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics*. 2010 ;95(4):217-23.
12. Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular

carcinoma. *Liver Int.* 2010;30(3):438-46.

13. Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2010;59(3):634-43.

2.学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし

HCV 陽性肝移植におけるステロイドフリー免疫抑制法と preemptive
抗ウイルス療法の意義に関する研究

研究分担者 永野浩昭 大阪大学大学院 消化器外科学 准教授

研究要旨

HCV 陽性症例に対する肝移植後の HCV 肝炎再発に対して、術後免疫抑制としてステロイドを使用しないステロイドフリー免疫抑制法と術後早期から低用量より開始する preemptive インターフェロン+リバビリン療法 (Low dose interferon ribavirin (LDIR) therapy) を導入し、HCV 肝炎の再発予防を行ってきた。その結果、低用量 preemptive 抗ウイルス療法は肝移植後 HCV 肝炎再発予防に有効であり、さらにステロイドフリー免疫抑制法を併用することでより効果的であることが示された。

A. 研究背景、目的
(背景)

HCV陽性症例に対する肝移植後のHCV肝炎再発は必発であり、他の原疾患による肝移植と比較して成績不良である。われわれは術後免疫抑制としてステロイドを使用しないステロイドフリー免疫抑制法と術後早期から低用量より開始するpreemptiveインターフェロン+リバビリン療法 (Low dose interferon ribavirin (LDIR) therapy) を導入し、HCV肝炎の再発予防を行ってきた。そこで、LDIR併用療法のHCV肝炎再発予防効果と安全性を検討する。

B. 研究方法

1999年より2008年の間に行われた成人間生体肝移植85例中、HCV肝炎陽性31例のうちで、ABO不適合肝移植症例、HBVとの混合感染症例、ステロイドを術中1gのみ使用した症例を除く28例を対象とした。抗ウイルス治療は、術後肝機能が安定し次第速やかに低用量(ペグインターフェロン α -2b 0.5 μ g/kg/week+ribavirin 400mg/day)より開始し、副作用に応じて増減を行い、HCVRNAが陰性化してから48週間投与を行った。免疫抑制剤はステロイドを全く使用しないステロイドフリー群(F群、n=17)とステロイドを漸減し3か月で終了するステロイド群(S群、n=11)を用いた。HCV肝炎再発の診断は、肝機能異常、HCVRNA陽性、および組織学的にA2あるいはF2以上と定義した。

C. 研究結果

LDIRは14例(50%)に施行しえた。LDIRが施行できなかった原因は、HCV早期再発6

例(21.4%)、早期グラフト損失4例(14.3%)、その他(血小板減少、腎機能障害など)4例(14.3%)であった。LDIR治療導入率は、免疫抑制法別ではF群:70.6%、S群:18.2%とF群で高かった。28例中HCV肝炎再発を8例(29.6%)で、SVRは9例(33.3%)に認められた。HCV肝炎再発危険因子は、LDIR施行(P=0.001)、S群(P=0.026)、急性拒絶反応(P<0.001)であった。

D. 考察

HCV陽性症例に対する肝移植後のHCV肝炎再発に対する低用量preemptive抗ウイルス療法は、安全かつ有効性が期待できるが、今後は既存治療に抵抗性を示す症例についての検討が必要になる。その点より、提供者・移植者のIL28B SNPに関する検討にくわえて、ITPA遺伝子、またこれらに關与する分子生物学的な検討が今後の課題となる。

E. 結論

低用量 preemptive 抗ウイルス療法は肝移植後 HCV 肝炎再発予防に有効であり、さらにステロイドフリー免疫抑制法を併用することでより効果的である。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Marubashi S, Nagano H, Yamanouchi E, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Maeda N, Tomoda K, Hikita H, Tsutsui S, Doki Y, Mori M. Salvage cystic duct anastomosis using a

- magnetic compression technique for incomplete bile duct reconstruction in living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* 2010; 16(1):33-37.
2. Marubashi S, Nagano H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Monden M, Doki Y, Mori M. Evaluation of a new immunoassay for therapeutic drug monitoring of tacrolimus in adult liver transplant recipients. *Journal of Clinical Pharmacology.* 2010;50(6): 705-709.
 3. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Hama N, Asaoka T, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Doki Y, Mori M. GBP2 mRNA in peripheral blood leukocytes of liver transplant recipients as a marker for acute cellular rejection. *Transplant Immunol.* 2010; 23(4):390-396.
 4. Okuyama M, Nagano H, Kobayashi S, He L, Ota H, Shimizu J, Takeda Y, Marubashi S, Eguchi H, Tanemura M, Dono K, Sakon M, Umeshita K, Gotoh M, Monden M. ROLE of the liver in determining allo-immune response in-vitro following donor-specific spleen cells injection. *Transplant Immunol.* 2010; 22(3-4): 150-156.
 5. Tomimaru Y, Nagano H, Eguchi H, Kobayashi S, Marubashi S, Wada H, Tanemura M, Umeshita K, Hiramatsu H, Takehara T, Doki Y, Mori M. Effects of preceding interferon therapy on outcome after surgery for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J of Surg Oncol.* 2010; 102: 308-314.
 6. Ohmura Y, Tanemura M, Kawaguchi N, Machida T, Tanida T, Deguchi T, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Eguchi H, Takeda Y, Matsuura N, Ito T, Nagano H, Doki Y, Mori M. Combined-transplantation of pancreatic islets and adipose tissue-derived stem cells enhances the survival and insulin-function of islet grafts in diabetic mice. *Transplantation.* 2010 ;90(12): 1366-1373.
 7. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Takeda Y, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Successful adult ABO incompatible living donor liver transplantation: Experience with double infusion through the hepatic artery and portal vein. *Hepatogastroenterol.* (in press)
 8. Marubashi S, Dono K, Nagano H, Asaoka T, Hama N, Kobayashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Monden M. Efficacy of Minimal Dosage of Calcineurin Inhibitor for Living Donor Liver Transplant Recipients with Preoperative Renal Dysfunction. *Hepatogastroenterol* (in press).
 9. 永野浩昭、丸橋 繁、小林省吾、江口英利、武田 裕、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森 正樹、特集:肝移植の画像診断－生体ドナーの安全とレシピエントの予後向上を目指して 生体ドナーに必要な術前画像診断 肝胆膵画像、12(1); 25-32: 2010.
2. 学会発表
1. Marubashi S., Nagano H., Wada H., Kobayashi S., Eguchi H., Takeda Y., Tanemura M., Umeshita K., Doki Y., Mori M. Improvement of donor hepatectomy for living donor liver transplantation : 10 year single center experience of 124 cases. *American Transplant Congress.* 2010.5.1-5.4.(San Diego)
 2. Marubashi S., Wada H., Kobayashi S., Eguchi H., Takeda Y., Tanemura M., Umeshita K., Doki Y., Mori M., Nagano H. Evaluation of immune monitoring with Cylex ImmuKnow assay in liver transplantation. *XXIII international congress of the transplantation society.*2010.8.15-8.19(Canada)
 3. 永野浩昭、丸橋繁、小林省吾、江口英利、武田裕、種村匡弘、和田浩志、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹: 成人生体肝移植における自己門脈および中肝静脈をもちいた肝静脈再建に関する工夫: 第22回 日本肝胆膵外科学会・学術集会、2010.5.26-5.28(仙台)
 4. 永野浩昭、丸橋繁、和田浩志、小林省吾、江口英利、種村匡弘、小川馨、梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹: 教室における成人生体肝移植施行例の短期成績: 第72回 日本臨床外科学会総会、2010.11.21-11.23(横浜)
 5. 小林省吾、永野浩昭、和田浩志、江口英利、武田裕、種村匡弘、中川雄公、大須賀章倫、平松直樹、薬師神崇、別所一彦、上野豪久、小川馨、梅下浩司、土岐

祐一郎、森正樹:劇症肝炎ワーキングの
取り組みと肝移植の成績:第46回 日本
腹部救急医学会総会、2010.3.18-3.19
(富山)

3.その他
特になし。

6. 丸橋繁、永野浩昭、和田浩志、小林省吾、
江口英利、武田裕、種村匡弘、梅下浩
司、土岐祐一郎、森正樹:生体部分肝移
植における胆道再建の工夫:第22回
日本肝胆膵外科学会・学術集会、
2010.5.26-5.28(仙台)
7. 丸橋繁、永野浩昭、森正樹:C型肝炎に
対する肝移植:ステロイドフリー免疫抑制
法と preemptive 抗ウイルス療法の意義:
第46回 日本肝臓学会総会、第22回
日本肝胆膵外科学会・学術集会、
2010.5.26-5.28(仙台)
8. 丸橋繁、永野浩昭、森正樹:肝移植後晩
期合併症の傾向と対策:JDDW2010、
2010.10.13-10.16(横浜)
9. 小林省吾、丸橋繁、和田浩志、江口英利、
武田裕、種村匡弘、梅下浩司、松原謙
一、土岐祐一郎、森正樹、永野浩昭:肝
移植・拒絶反応診断における分子生物
的検索の可能性と臨床応用:第46回
日本移植学会総会、2010.10.20-10.22
(京都)
10. 桂宣輝、和田浩志、小林省吾、丸橋繁、
江口英利、武田裕、種村匡弘、小川馨、
梅下浩司、土岐祐一郎、森正樹、永野
浩昭:肝移植術直後の免疫抑制剤として
のタクロリムス水和物除放性カプセルの
使用経験:第46回 日本移植学会総会、
2010.10.20-10.22(京都)
11. 和田浩志、丸橋繁、小林省吾、江口英
利、武田裕、種村匡弘、小川馨、梅下浩
司、土岐祐一郎、森正樹、平松直樹、考
藤達哉、竹原徹郎、永野浩昭:肝移植後
の HCV 肝炎再発予防を目的としたステ
ロイドフリー免疫抑制法と preemptive 抗
ウイルス療法の意義:第46回 日本移植
学会総会、2010.10.20-10.22(京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1.特許取得
特になし。
- 2.実用新案登録
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
研究分担報告書

C型肝炎難治症例の病態解明と抗ウイルス治療に関する研究

研究分担者 坂本 直哉 東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座 准教授

研究要旨：我々はC型肝炎難治症例の病態解明のため、HCV複製増殖に関連する遺伝子および分子間ネットワークの網羅的解析、およびHCVコア蛋白変異株培養系を用いた増殖動態、インターフェロン感受性の解析をおこない以下の知見を得た。(1) HCV-JFH-1 (G2a) 株非構造領域とGT 2b ウイルス構造領域を用いたキメラウイルス感染培養系を構築し、IFN感受性の解析を行ったところ、JFH1株はTMDH2b/JFHキメラウイルスよりもIFN抵抗性であり、IFNシグナルに不応性であった。JFH1感染細胞では、SOCS3およびそれを強力に誘導するIL-6の発現が増強していた。(2) Core70/91変異HCV-JFH1クローンではウイルス蛋白の細胞内への蓄積傾向が見られ、インターフェロン応答能が低下していた。今後、genotype 1bなど他のインターフェロン抵抗株へ解析対象を広げ増殖動態、インターフェロン抵抗性の分子機構などについて解析を進める。

A. 研究目的

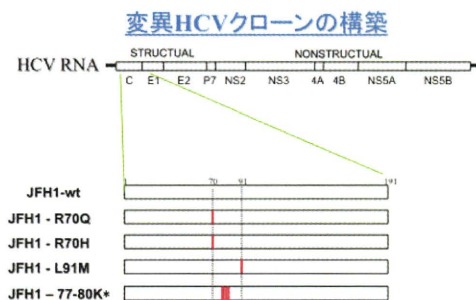
現在、世界では1億7千万人のHCV感染者がいると推定されている。HCV感染は肝硬変、肝癌の発生の主要な原因疾患であり効率的な治療法の確立が求められている。現在までに、多くの抗HCV薬の開発がさかんに行われているがIFNは今なお、抗HCV薬のkey drugである。しかしながら最も成績のいいペグインターフェロン (IFN) と抗ウイルス薬のリバビリン (RBV) 併用療法においても難治性のgenotype I 症例においては、完治率は約50%と十分な成績ではない。その為、現在IFN治療の成績を規定する因子のin-vitroにおける検討が必要とされている。

本研究で我々は、独自に開発したHCV培養増殖系を用い、抗ウイルス薬感受性に関わる宿主蛋白の探索、機能解析を進め、新たな抗ウイルス療法を開発することを目的として研究を遂行している。本年度我々は、(1)異なるHCV株間のIFN感受性の差異の発現機構、および(2)HCVコア領域のアミノ酸70番および91番変異のPEG-IFN・Ribavirin治療抵抗性発現の分子機構、およびコア70/91変異がHCV増殖・粒子形成・interferon(IFN)感受性に与える影響を検討した。

B. 研究方法

(1) 急性C型肝炎genotype 2b患者の急性期血清からRT-PCRを用いて、コンセンサス

シーケンスを有する全長genotype 2b-cDNAを構築した。構築した全長genotype2bHCVの構造遺伝子部位とJFH1株の非構造遺伝子を有するキメラウイルスを構築した(図1A)。構築したgenotype2b/JFH1キメラウイルスとJFH1のIFN感受性の比較検討を行いその差異を規定する因子の検討を行った。(2) HCV-JFH1プラスミドpJFH1full1 (HCV-wild)にin-vitro mutagenesisによりcore aa70 (R70Q, R70H)、aa91 (L91M)変異をそれぞれ導入した。合成HCV-RNAをHuh7細胞に導入し、培養上清中のコア抗原および上清・細胞内のHCV-RNA・コア蛋白を測定した。HCV-core野生株、変異株をそれぞれ細胞に導入し、種々の濃度のIFN- α を添加しコア抗原およびHCV-RNAを測定した。また種々のインターフェロン誘導遺伝子 (ISG)、SOCS、およびERストレス関連蛋白を検出・比較した。



C. 研究結果

(1) genotype2b HCV 株の構造遺伝子部位と JFH1株の非構造遺伝子部位からキメラクローンは培養細胞内での増殖、培養上清への感染性ウイルスの分泌、更に培養上清を naïve huh751 細