

- relates to its rapidly progressive course.
Hum Pathol 2011; 42(9): 1329-1336.
26. Kim SK, Marusawa H, Eso Y, Nishikawa H, Ueda Y, Kita R, Kimura T, Chiba T, Osaki Y, Kudo M. Clinical characteristics of non-B non-C hepatocellular carcinoma: a single-center retrospective study.
Digestion. 2011;84 Suppl 1:43-49.
27. Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama H, Kim ID, Chiba T, Higuchi S, Yokode M, Fukushima M, Shimizu A, Tsubouchi H. Safety and pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor (rh-HGF) in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Translational Med* 9:55:2011.
28. Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H, Saito S, Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, Chiba T. Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy: A single center study. *J Gastroenterol*. 2012; 47(4): 444-451.
29. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat*. 2012; 19(1):32-38.
30. Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of Hepatitis B Virus Quasispecies in Association with Nucleos(t)ide Analogue Treatment Determined by Ultra-Deep Sequencing. *PLoS One*. 2012;7(4):e35052.
31. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. *Hepatol Res*. in press.

[学会発表]

1. 齊藤 俊一、上本伸二他：Association and Dissociation between Portal Venous and Biliary Ramifications. European Society for Surgical Research, 46th Annual Congress, 2011.5, Aachen, Germany.
2. 上本伸二他：肝臓に対する移植の適応とタイミング. 第111回日本外科学会, 2011.5.25, 東京(紙上開催).
3. 海道利実、上本伸二他：再発肝細

- 胞癌に対する肝移植の意義. 第111回日本外科学会, 2011.5.26, 東京(紙上開催).
4. 飯田 拓、上本伸二他 : Outcome of adult liver transplant recipients with preoperative portal vein thrombosis. ILTS2011, 2011.6.22-25, Valencia, Spain.
 5. 小倉靖弘、上本伸二他 : Outcomes and risk factors of liver re-transplantation: single center experiences. ILTS2011, 2011.6.22-25, Valencia, Spain.
 6. 上田佳秀、海道利実、小倉靖弘、森章、小川晃平、吉澤淳、秦浩一郎、八木真太郎、宮川文、羽賀博典、丸澤宏之、千葉勉、上本伸二 : HCV 陽性レシピエントに対する肝移植後の長期予後. 第29回日本肝移植研究会, 2011.7.23, 仙台.
 7. 上本伸二他 : 肝癌集学的治療の中での肝移植の役割. 第47回日本肝癌研究会, 2011.7.28-29, 静岡.
 8. 小倉靖弘、上本伸二他 : LDLT Strategies and Procedures at Kyoto University. CAST2011, 2011.9.25-28, Seoul, Korea.
 9. 小倉靖弘、上本伸二他 : Complications of liver transplantation recipient. CAST2011, 2011.9.25-28, Seoul, Korea.
 10. 富山浩司、上本伸二他 : 生体肝移植における MELD スコアと予後の検討. 第47回日本移植学会, 2011.10.6, 東京.
 11. 上田佳秀、海道利実、小倉靖弘、小川晃平、吉澤淳、秦浩一郎、八木真太郎、江川裕人、千葉勉、上本伸二 : 肝移植における肝臓内科医の役割. 第47回日本移植学会, 2011.10.6, 東京.
 12. 藤本康弘、上本伸二他 : 肝移植における免疫寛容. 第47回日本移植学会, 2011.10.6, 東京.
 13. 小倉靖弘、上本伸二他 : 当院の血液型不適合成人生体肝移植術の検討. 第47回日本移植学会, 2011.10.6, 東京.
 14. 海道利実、上本伸二他 : Pre- and perioperative risk factors affecting infection after living donor liver transplantation. IASGO2011, 2011.11.11-12, 東京.
 15. 上本伸二他 : Current status of liver transplantation for liver cirrhosis and unsolved problem. IASGO2011, 2011.11.11-12, 東京.
 16. 海道利実、上本伸二他 : Change and innovation in living donor liver transplantation in Kyoto University. 15th International Congress of the Egyptian Hepato-Pancreato-Biliary Society. 2012.2.10, Egypt.
 17. Naoshi Nishida, Takeshi Nagasaka, C.Richard Boland, Tsutomu Chiba,

- Ajay Goel: Characterization of step-wise accumulation of DNA methylation alterations during human hepatocarcinogenesis. 2011 DDW, 2011.5.9, Chicago, USA.
18. 西島規浩、上田佳秀、丸澤宏之 : HBV ゲノム多様性の次世代ゲノムアナライザー解析. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011.6.2, 東京.
19. 上田佳秀、西島規浩、丸澤宏之、上本伸二、千葉 勉 : HBs 抗体エスケープ変異を有する HBV の自然発生頻度と病態形成への関与. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011.6.2, 東京.
20. 西田直生志、福田善弘、千葉 勉 : C 型肝炎関連発癌の初期段階における癌抑制遺伝子の異常メチル化の役割. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011.6.2, 東京.
21. 池田敦之、丸澤宏之、千葉 勉 : 肝癌の発生母地としての肝硬変に潜在する遺伝子異常の次世代ゲノム解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.4, 名古屋.
22. Yoshihide Ueda, Hiroyuki Marusawa, Toshimi Kaido, Yasuhiro Ogura, Kohei Ogawa, Atsushi Yoshizawa, Koichiro Hata, Tsutomu Chiba, Shinji Uemoto: Safety and efficacy of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. The Liver Meeting 2011(AASLD), 2011.11.5, San Francisco, USA.
23. Norihiro Nishijima, Hiroyuki Marsusawa, Yoshihide Ueda, Akihiro Nasu, Ken Takahashi, Yukio Osaki, Shinji Uemoto, Tsutomu Chiba: Preexisting resistant mutants and dynamics of resistant populations of HBV to nucleoside analogues determined by massively-parallel ultra-deep sequencing. The Liver Meeting 2011(AASLD), 2011.11.7, San Francisco, USA.
24. 上田佳秀、千葉 勉、上本伸二 : 肝移植後 C 型肝炎再発対策の現状と今後の展望. 第 39 回日本肝臓学会西部会, 2012.12.9, 岡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
該当なし

移植後ウイルス血漿を呈する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発

研究分担者 下遠野 邦忠 千葉工業大学 附属総合研究所 教授

研究要旨

HCV 感、増殖は宿主因子により正および負に制御されている。これまでに多くの宿主因子がウイルス増殖を制御する事が明らかにされてきた。しかし、それらの中には、細胞増殖を抑制する、あるいは障害を引き起こす結果、ウイルス複製も抑制される因子も存在する。本研究では HCV ゲノム複製を抑制する宿主因子を細胞増殖性の抑制や障害性とは区別して単離する為の方法を開発する事を試みている。つまり、ウイルスゲノムが複製している細胞を殺処理し、外来的に導入した宿主因子の作用によりレプリコンが特異的に排除される細胞のみが増殖可能な系を構築しつつある。この方法により、ウイルスゲノム複製を制御する宿主因子を網羅的に探索できると期待され、肝移植後のウイルス血漿を呈する宿主因子の探索にも利用が考えられる。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス感染による肝疾患増悪の結果肝移植を受けた患者の中には移植後に HCV が再活性化され、慢性肝炎を再発するようになる場合が多い。免疫抑制剤投与によるために、ウイルス増殖が許容される環境に曝されたためと考えられ、血液内のウイルス量が高い状態に維持されるようになる。近年インターフェロン、リバビリン以外にウイルスタンパク質の機能を直接抑制する薬剤が上市されてきており、インターフェロンが使用できない場合でもウイルス血漿を抑える選択肢が増えつつある。しかし、これらの薬剤も副作用の問題があるために、全ての患

者に有効とはいえないのが現状である。

HCV の感染、増殖には種々の宿主因子が関与している。その中でもウイルスの複製を積極的に抑制する宿主因子が明らかになれば、その因子の活性化を通して、ウイルス血漿に対処することができる可能性がある。本研究では、そのような宿主因子を明らかにするために、HCV レプリコン細胞を用いたスクリーニング系の開発を試みた。

この系はまだ開発の途上であるが、次年度の研究期間内には完成が期待される。

B. 研究方法

HCV ゲノム複製を抑制する宿主遺

伝子を探索する方法として以下の実験系を考えた。

HCV ゲノムが自立的に複製する細胞（レプリコン細胞）に、ウイルス複製を許容しない細胞から cDNA ライブラリーを調製して、発現ベクターを用いてレプリコン細胞に導入する。ウイルス複製を抑制する遺伝子が導入された細胞では HCV ゲノムが消滅すると期待される。その結果ウイルスタンパク質も消滅するので、ウイルスのプロテアーゼ活性も失われる。あらかじめ、レプリコン細胞に HCV プロテアーゼ依存的にヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（TK）を発現するようにしておけば、レプリコンの消失と共に TK 活性も失われることになるので、その細胞はガンシクロビル（GCV）耐性になる結果、コロニーとして単離可能になると期待される。その細胞に導入した cDNA 情報を得ることにより、宿主遺伝子を明らかにできる。

以下に実験方法を記す。なお、スクリーニングの方法を図に示した。

(1) 酵母 Gal4 遺伝子とヘルペスウイルスの VP16 を融合させた発現プラスミドの構築。

これらの遺伝子をコードするプラスミドから PCR により融合プラスミドを構築し、hygromycin 耐性遺伝子を入れる。

(2) Gal4-VP16 融合遺伝子と HCV p7 タンパク質のコーディング領域の配列を HCV プロテアーゼ切断配列をコードする塩基配列で繋ぐ。

100 塩基以下からなる HCV p7 タンパク質をコードする領域の上流に HCV NS5A と NS5B の切断部位の配列（約 20 アミノ酸残基相当分の塩基配列）を繋ぎ、それを Gal4-VP16 の下流に繋いだ融合タンパク質発現プラスミドを構築する。puromycin を薬剤耐性因子として導入する。

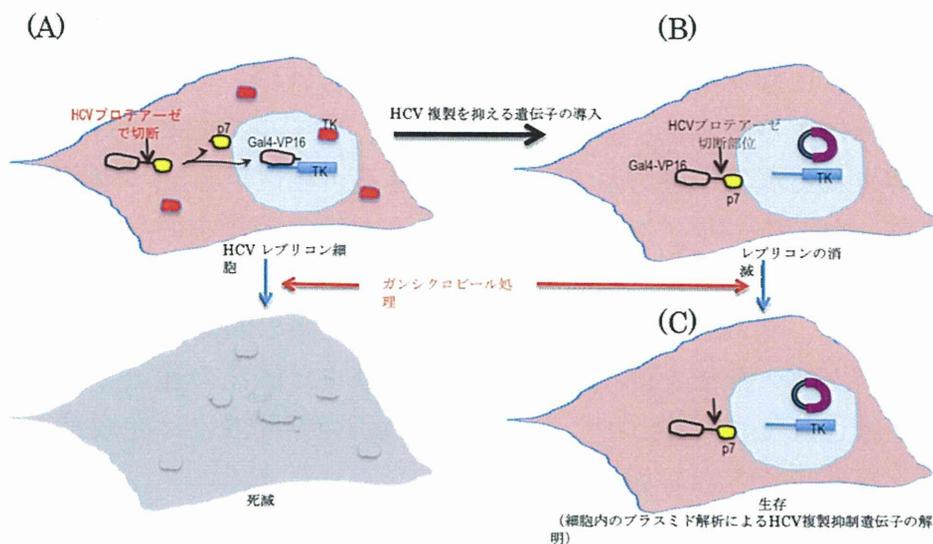


図 HCVゲノム複製を抑制する宿主因子の探索方法

細胞にGal4-VP16-NS5A/B-p7を発現するプラスミドと、Gal4依存的にTKを発現するプラスミドを導入しておく。この細胞にHCVレプリコンを導入するとウイルスプロテアーゼ（NS3）の働きでp7が取り除かれる。その結果、Gal4-VP16は核内に移行してTK遺伝子を活性化する。HCV複製を許容しないかあるいは抑制する細胞の遺伝子をこの細胞に導入する事により、HCV複製活性が止まると、TK遺伝子発現も止まる。細胞をGCVで処理する事により、レプリコンが失われた細胞を特異的に単離する事が可能になる。

(3) Gal4 結合 DNA 配列をプロモーターに導入した TK 発現プラスミドの構築。

HSV TK 遺伝子を持つプラスミドから TK 遺伝子のコーディング領域を PCR でクローニングし、それを Gal4 結合ドメインを4回繰り返すプロモーター配列を持つプラスミドに導入する。

(4) レプリコン細胞への上記プラスミドの導入。

通常のトランスフェクション法で行う。

(5) HCV 複製を許容しないヒト肝臓細胞からの cDNA 発現ベクターの構築。

HepG2 細胞およびヒト肝臓不死化細胞から cDNA を抽出し、常法により cDNA に変換。それをレンチベクター発現系に組み込む。

(6) 発現 cDNA ライブラリーのレプリコンへ細胞への導入と、GCV による細胞の選択 (次年度に予定)

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

C. 研究結果

(1) 酵母 Gal4 遺伝子とヘルペスウイルスの VP16 を融合させた発現プラスミドの構築。

目的どおりのプラスミドの構築が完成した。

(2) Gal4-VP16 融合遺伝子と HCV p7 タンパク質のコーディング領域の配列を HCV プロテアーゼ切断配列をコードする塩基配列で繋ぐ。

目的通り、プラスミドの構築が完成した。

(3) Gal4 結合 DNA 配列をプロモーターに導入した TK 発現プラスミドの構築。

HSV TK 遺伝子を持つプラスミドから TK 遺伝子のコーディング領域を PCR でクローニングし、それを Gal4 結合ドメインを4回繰り返すプロモーター配列を持つプラスミドに導入し、目的のプラスミドを構築した。

(4) 上記プラスミドを導入した細胞を用いた HCV NS3 依存的な活性化の検証実験。

Gal4-VP16-NS5A/B-p7 が NS3 存在下で切断され、Gal4-VP16 依存的に TK 遺伝子が活性化されるかを調べる為に、Gal4 結合ドメインをプロモーターに持つ Luc レポータープラスミドを用いて、NS3 依存的に Luc 活性が発現するかを調べた。

その結果、NS3 発現プラスミドの用量依存的に、Luc 活性が観察された。

また、Gal4-VP16-NS5A/B-p7 の切断が、HCV レプリコン細胞でも観察されるかを、異なる遺伝子型、異なるレプリコン (完全長、サブゲノム型など) 細胞を用いて検証を行った。その結果、遺伝子型の違い、レプリコン構造の違いに関わらず Luc 活性の上昇が観察された。ただし、レプリコン細胞の違いにより、Luc 活性の上昇の程度には違いが見られた。

(5) TK 活性の検証実験

Gal4 結合ドメインをプロモーターに持つ TK 発現プラスミドを導入した細胞では Gal4 非存在下に TK 活性

が産生しない事を GCV 選択により確かめた。

(6) HCV 複製を許容しないヒト肝臓細胞からの cDNA 発現ベクターの構築。

HepG2 細胞およびヒト肝臓不死化細胞から cDNA を抽出し、常法により cDNA を調製した。それをレンチベクターに組み込み cDNA 発現ライブラリーを構築した。

(7) 発現 cDNA ライブラリーのレプリコンへ細胞への導入と、GCV による細胞の選択および評価実験 (次年度に予定)

D. 考察

HCV の産生を制御する宿主因子を制御する事により、ウイルス血漿、慢性肝炎を含む肝疾患の予防をはじめ、治療にも応用する方策が見いだせる可能性がある。そのような観点から、これまでに、沢山の宿主制御因子が見いだされているし、今後も見いだされると期待される。しかし、積極的にそのような宿主因子を探索する方法は限られている。さらにこれまでの方法では細胞障害性を区別する事ができない為に、多くの場合、抗 HCV 作用を示す働きが宿主細胞の増殖を抑制する結果であった場合がある。本研究で行う実験は安定的に細胞の増殖が担保されている条件での抗 HCV 作用を示す宿主因子の探索である事から、その因子を導入する事による細胞自身の障害の懸念を取り除いて解析できる点が有利な点である。さらには、ウイルスゲノム複製を抑制する遺伝子だけでなく、複

製を高める因子の探索にも、本方法が適用できると期待される。

現在、その系の開発途上であり、今後不慮の問題点に遭遇する可能性は否定できないが、これまでのところ目的予想通り系の樹立が進んでいる。

E. 結論

HCV ゲノム複製を正及び負に制御している細胞因子を単離する目的で、レプリコン細胞の NS3 活性を利用したスクリーニング系を構築しつつある。

F. 研究発表

論文発表

1. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for the analysis of HCV life cycle. *Microbiol Immunol.* 56(1): 1-9, 2012
2. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: A necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res.* 163(1): 390-395, 2012
3. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funmi K, Shimotohno K. Lipoprotein components associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion in Virology.* 1(1): 19-26, 2011
4. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV).

- PLoS One. 6(6): e21284, 2011
5. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. PLoS One. 6(5): e19799, 2011
 6. Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F. Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. PLoS One. 6(4): e18285. 2011
 7. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The Progression of Liver Fibrosis Is Related with Overexpression of the miR-199 and 200 Families. PLoS One. 6(1): e16081, 2011.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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 森 正樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学 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

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 (peg インターフェロン α -2b $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{week}$ +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 が施行できなかつた原因は、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%) であつた。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 群で高かつた。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 ($P<0.001$) であつた。

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 SNIP 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. 研究発表

[論文発表]

1. Kim C, Aono S, Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Okumura N, Takao T, Doki Y, Mori M, Nagano H. Significance of Alanine Aminopeptidase N (APN) in Bile in the Diagnosis of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation. *J Surg Res.* 2012; 175(1):138-148.
2. Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Doki Y, Mori M. Donor hepatectomy for living donor liver transplantation: learning steps and surgical outcome. *Dig Dis Sci.* 2011; 56(8):2482-2490.
3. Marubashi S, Nagano H, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in peripheral blood in liver resection for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18(8): 2200-2209.
4. 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.* 2011; 58(106): 503-507.

5. 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.* 2011; 58(106): 508-511.
 6. Marubashi S, Wada H, Kobayashi S, Eguchi H, Tanemura M, Umeshita K, Doki Y, Mori M, Nagano H. Once-Daily Prolonged-Release Tacrolimus in De Novo Liver Transplantation: A Single Center Cohort Study. *Hepatogastroenterol.* 2012; 59(116): 1184-1188.
 7. 永野浩昭、丸橋 繁、小林省吾、和田浩志、江口英利、種村匡弘、土岐祐一郎、森 正樹。脳死肝移植の現状と問題点－これからの脳死移植－ 日消病誌、2011; 108(5): 735-742
- 第 47 回日本肝癌研究会 シンポジウム2 肝細胞癌治療に対する肝移植の Responsibility
平成 23 年 7 月 28 日、29 日(静岡)
 3. 肝細胞癌に対する肝移植における工夫と成績
丸橋 繁、小林省吾、和田浩志、江口英利、川本弘一、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森 正樹、永野浩昭
第 47 回日本肝癌研究会 ビデオフォーラム 3 肝細胞癌の肝移植
平成 23 年 7 月 28 日、29 日(静岡)
 4. 当院における脳死肝移植の経験とこれからの課題
永野浩昭、丸橋 繁、小林省吾、和田浩志、江口英利、種村匡弘、川本弘一、梅下浩司、土岐祐一郎、森 正樹、小川 馨、萩原邦子、上野豪久、近藤宏樹、平松直樹、竹原徹郎、福澤正洋
第 29 回日本肝移植研究会 シンポジウム1 改正臓器移植法 1 年の総括－脳死肝移植の体制強化に向けて－
平成 23 年 7 月 22 日、23 日(仙台)

[学会発表]

1. 肝移植成績向上のための取り組みと将来展望
丸橋 繁、永野浩昭、森 正樹
JDDW2011 ワークショップ9 我が国の肝移植の現状と将来
平成 23 年 10 月 20 日、21 日、22 日、23 日(福岡)
2. 肝細胞癌に対する肝移植の適応条件
丸橋 繁、小林省吾、和田浩志、江口英利、川本弘一、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森 正樹、永野浩昭
第 29 回日本肝移植研究会 シンポジウム2 原疾患の差異により生じているわが国の肝移植の特殊性(PSC, PBC)
平成 23 年 7 月 22 日、23 日(仙台)

6. 原発性胆汁性肝硬変に対する成人間生体肝移植の長期成績と再発治療に関する検討
和田浩志、丸橋 繁、小林省吾、江口英利、川本弘一、種村匡弘、梅下浩司、土岐祐一郎、森 正樹、永野浩昭
第 29 回日本肝移植研究会 シンポジウム3
移植後胆道狭窄に対する治療の長期成績
平成 23 年 7 月 22 日、23 日(仙台)
7. 肝移植適応評価と周術期および長期 follow-up マネジメント効率化への取り組み

丸橋 繁、和田浩志、小林省吾、江口英利、種村匡弘、小川 馨、萩原邦子、梅下浩司、中川雄公、平松直樹、竹原徹郎、土岐祐一郎、森 正樹、永野浩昭
第 29 回日本肝移植研究会 シンポジウム4
理想的な肝移植チームの在り方
平成 23 年 7 月 22 日、23 日(仙台)

**G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)**

該当なし

移植後 C 型肝炎再燃に対する IFN 治療効果とドナー・レシピエント IL28B 遺伝子多型 (SNP) の関連性についての解析

研究分担者 大段 秀樹 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

ウイルス性肝硬変は、肝移植の最も頻度の高い適応疾患であるが移植後ウイルス性再発が予後を悪化させるため、術後のウイルス制御が重要となる。特に C 型肝炎ウイルス (HCV) 性肝炎疾患は、肝移植の適応の基礎疾患として大きな位置を占めるようになったが、ほぼ全例において再感染を認め、peg-IFN + リバビリンに代表される移植後抗ウイルス療法が重要となっている。我々は移植後早期に peg-IFN + リバビリン療法を導入し、ウイルス陰性化後最低 1 年間継続投与する long term IFN 療法をおこなっている。全体の SVR 率は 54.2% と従来の報告と比べ良好であった。また genotype1 型 HCV 感染肝移植症例で、IFN 治療有効性に関連しているとされる *IL-28B* 遺伝子周囲の遺伝子多型 (SNP) をドナーおよびレシピエント因子として多変量解析した結果、“ドナーおよびレシピエント双方の SNP が TT 型” が SVR 率に対する唯一の独立した有意性のある予後因子であり、ドナー TT・レシピエント TT 群の SVR 率が 81.8% と最も高い結果となった。これらの結果は移植前に術後 HCV 治療効果予測が可能であり、臓器の allocation やドナーマッチングに影響を与え、同時に肝炎再燃に対するオーダーメイド化の可能性を示唆する。

A. 研究目的

HCV 性肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の一つであるが、移植後 HCV 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り、その予後を悪化させている。移植後 C 型肝炎再発に対する治療が予後改善のためには重要である所以であり、peg-IFN + RBV を用いた治療が行われているが、未だ標準的治療法は

確立されていない。peg-IFN + RBV 療法に対する反応性が症例によって異なること、特に貧血に代表される有害事象による減量・中止率が高いことが最大の問題点としてあげられる。

最近ゲノム関連解析 (GWAS) により HCV に対する IFN 治療有効性に *IL-28B* 遺伝子、また抗ウイルス剤であるリバビリン (RBV) による貧血が IPTA (inosine triphosphatase) 遺伝子周囲の遺伝子多

型(SNP)関連することが明らかとなっているが、肝移植後では宿主であるレシピエントおよびグラフト因子であるドナーの遺伝子多型双方が影響を与える可能性がある。本研究では当院で行ったHCV 関連肝移植症例について術後の抗ウイルス治療成績を明らかにし、レシピエントおよびドナーにおける *IL-28B* 遺伝子および IPTA 遺伝子周囲の遺伝子多型(SNP)の関連を解析した。

B. 研究方法

2011年4月までのHCV陽性肝移植症例61例を対象。術後早期にpegIFN/RBV療法を開始し、投与期間はHCVRNA陰性化してから最低1年間の継続投与(long term IFN療法)とした。治療中を除く術後IFN療法を行った症例は35例であり、治療完遂したgenotype1症例は20例であった。背景は、年齢中央値58歳、男性:女性=15/5。IFN前HCVRNAは平均6.6LogIU/ml、移植からIFN開始までの期間は平均4ヶ月。pegIFNα+RBVを原則として行い、pegIFNαは週一回、RBVは200mg/日から始め800mg/日へ増量した。

(倫理面への配慮)

本研究は”ヘルシンキ宣言”に基づき、研究対象者に対する人権擁護上の配慮を行い遂行された。またSNP解析を含む遺伝子解析に関してはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針

(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)等該当指針に基づき、所属機関の倫理委員会承認を得た。また全ての研究対象者に対してはインフォームドコンセントを行い、書類での同意を得た。

C. 研究結果

1. 治療成績

long term IFN療法を施行した症例における、全体のSVR率は54.2%(19/35)であった。genotype1型のSVR率は46.4%(13/28)、genotype2型のSVR率は85.7%(6/7)であった。治療完遂はgenotype1型では20例でSVR/nonSVRは12/8例、治療中止は8例でSVR/nonSVRは1/7例であった。Genotype2型では7例全例が治療完遂し、SVR/nonSVRは6/1例であった。

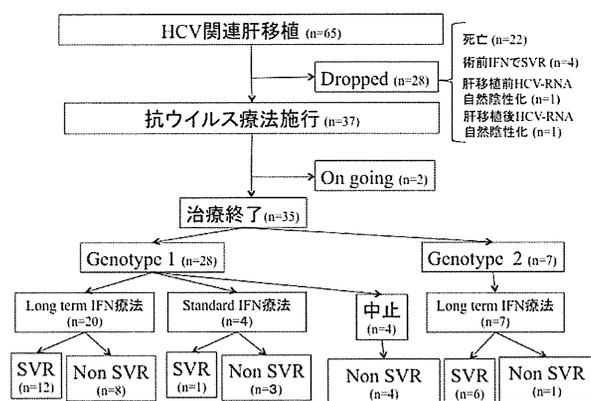


図1. 被験者登録

2. RBV 治療における貧血と IPTA (rs1127354) との関連解析

RBV 開始後 4 週における Hb の減少は CC 群 0.2g/dl (中央値)、CA 群 0.7g/dl と有意差を認めなかった。また治療中の Hb 最低値、治療開始後 3 ヶ月間の RBV アドヒアランスに両群間で差を認めなかった。

3. Genotype1 型症例に対する

pegIFN/RBV 治療における SVR 率と IL28B 遺伝子多型との関連解析

ドナー-IL28B 遺伝子多型 TT 群における SVR 率は 73.3%(11/15)、TG+GG 群の SVR 率は 20% (1/5) であった (P=0.053)。一方、レシピエント IL28B 遺伝子多型 TT 群における SVR 率は 64.2%(9/14)、TG+GG 群の SVR 率は 50% (3/6) と差を認めなかった。ドナーおよびレシピエントの IL28B 遺伝子多型の組み合わせでの比較ではドナー-TT・レシピエント TT 群の SVR 率は 81.8%(9/11)、ドナー-TG+GG・レシピエント any 群の SVR 率は 20%(1/5) と有意な差を認めた (P=0.036)。単変量解析では“ドナー-TT”、“ドナー-TT およびレシピエント TT”、“RBV アドヒアランス 50% 以上”の 3 因子が SVR 率と有意な関連を認めた。これらの因子で多変量解析を行ったところ、“ドナー-TT およびレシピエント TT”が SVR 率に対する

唯一の独立した有意性のある予後因子であった (オッズ比 : 15.0、95%CI1.2-185.1、P=0.035)。

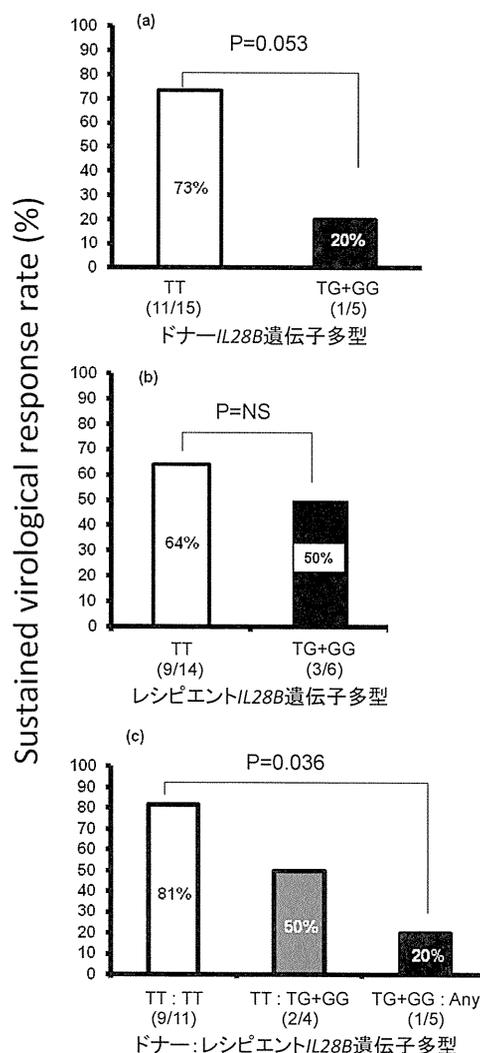


図 2. HCV genotype1 型における IFN 治療後 SVR 率 (a)ドナー IL28B 遺伝子多型、(b) レシピエント IL28B 遺伝子多型、(c) ドナー : レシピエント IL28B 遺伝子多型組み合わせによる SVR 率

D. 考察および結論

C 型肝炎関連疾患に対する肝移植前に術後 HCV 治療効果予測が可能になれば、移植後 HCV 肝炎の再発・進行を有効に制御し、移植後の予後を著しく改善し得る可能性があると考えられる。本研究での解析により、peg-IFN+リバビリン療法の治療有効性に関連している IL-28B 遺伝子周囲の遺伝子多型(SNP)に関してドナーおよびレシピエント双方の SNP が SVR 率に対する唯一の独立した有意性のある予後因子であることが明らかとなった。さらに移植後 C 型肝炎再発治療に関して、レシピエント因子よりドナー因子の寄与が大きいことが示された。この結果は臓器の allocation やドナーマッチングへの影響とともに肝炎再燃に対するオーダーメイド化の必要性を示唆するものであり、今後の移植後 C 型肝炎治療の標準化に大きく影響を与えると考えられる。

E. 研究発表

[論文発表]

1. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H.: Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol.* 2012 Feb;19(2):418-425.
2. Yanai H, Chiba S, Ban T, Nakaima Y, Onoe T, Honda K, Ohdan H., Taniguchi T.: Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jul 12;108(28):11542-11547.
3. Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H.: Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation. *Transplantation.* 2011 Sep 15;92(5):575-580.
4. Kawaoka T, Aikata H, Miyaki D, Murakami E, Azakami T, Takaki S, Nagaoki Y, Hashimoto Y, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H., Chayama K.: Eradication of hepatitis C virus genotype 1 after liver transplantation by interferon therapy before surgery: Report of three patients with analysis of interleukin-28 polymorphism, hepatitis C virus core region and interferon-sensitivity determining region. *Hepatology Res.* 2011 Nov;41(11):1126-1131

5. Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K.: IL28B polymorphism may guide pegylated interferon plus ribavirin therapy even after curative treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat.* 2011 Oct;18(10):e550-560
6. Tanaka Y, Tashiro H, Onoe T, Ide K, Ishiyama K, Ohdan H.: Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living donor liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2012 Mar;44(2):555-559.
7. Kawaoka T, Takahashi S, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Onoe T, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K.: IL28B SNP of donors and recipients can predict virological response to PEGIFN/RBV therapy in patients with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Mar 20. [Epub ahead of print]
- possible adoptive immunotherapy with PBMC-Derived CD56+ cells for preventing HCV re-infection after liver transplantation. American Transplant Congress 2011, Philadelphia (USA), 2011.4.30-5.4
2. Tanaka Y, Tashiro H, Takanashi S, Chayama K, Ohdan H.: Cellular Alloreactivity prior to interferon-based antiviral therapy is predictive of chronic rejection in liver transplantation recipients with recurrent hepatitis. American Transplant Congress 2011, Philadelphia (USA), 2011.4.30-5.4
3. Ohdan H.: Tolerance monitoring in liver transplantation. Congress of the Asia Society of Transplantation 2011, Seoul (Korea), 2011.9.25-9.28
4. Tanaka Y, Tashiro H, Ide K, Onoe T, Ishiyama K, Ohdan H.: Tailoring immunosuppressive therapy on the basis of immune monitoring by a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living-donor liver transplantation. Congress of the Asia Society of Transplantation 2011, Seoul (Korea), 2011.9.25-9.28
5. Ohdan H.: Adoptive immunotherapy for inducing anti-HCC and anti-HCV activity after liver transplantation. Symposium, 21st World congress of the

[学会発表]

1. Hotta R, Tanaka Y, Doskali M, Ohira M, Hiraga N, Chayama K, Ohdan H.: A

- international association of surgeons,
gastroenterologists and oncologists,
Tokyo (Japan), 2011.11.9-12
6. 田代裕尊, 相方浩, 谷本新学, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 茶山一彰, 大段秀樹: C型慢性肝炎関連肝細胞癌切除後のPEG-IFN療法による予後改善効果. 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.6.2-3
 7. 河岡友和, 相方浩, 宮木大輔, 村上英介, 長沖祐子, 高木慎太郎, 平賀伸彦, 柘植雅貴, 平松憲, 脇浩司, 三木大樹, 今村道雄, 川上由育, 高橋祥一, 越智秀典, 田代裕尊, 大段秀樹, 茶山一彰: HCV関連肝細胞癌根治後Peg-IFN+RBV併用療法の効果予測因子からみたIFN治療戦略. 第47回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.6.2-3
 8. 大段秀樹: 肝臓移植後の免疫モニタリングに基づく免疫抑制の最適化. 第28回日本TDM学会・学術大会, 広島, 2011.6.18-19
 9. 大段秀樹: 肝臓/肝炎の根治を目指した肝移植後の免疫細胞療法. 第39回幹細胞治療フォーラム, 東京, 2011.7.21
 10. 河岡友和, 高橋祥一, 三木大樹, 越智秀典, 田代裕尊, 大段秀樹, 茶山一彰: 肝移植後C型肝炎再燃に対するIFN治療と遺伝子多型の関連. 第29回日本肝移植研究会, 仙台, 2011.7.22-23
 11. 大段秀樹: 肝移植後の肝臓/肝炎再発に対する免疫細胞療法. 第47回日本肝臓学会, 静岡, 2011.7.28-29

**F. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)**

該当なし。

生体肝移植後のC型肝炎再発におけるインターフェロンの治療効果に基づく IL28B 遺伝子多型と ISGs の発現に関する研究

研究分担者 太田 哲生 金沢大学大学院医学系研究科がん局所制御学 教授

研究要旨

- ① Genotype 1 型の C 型肝炎患者において、肝内の Interferon stimulated genes (ISGs) の高発現症例は Peg-Interferon/Ribavirin (Peg-IFN/RBV) 療法に抵抗性である。IL28B 遺伝子多型 (SNP) でマイナーアレル型は Peg-IFN/RBV 療法に抵抗性であるとともに肝内の ISGs の発現が高い。また ISGs の高発現と IL28B SNP は、IFN 治療抵抗性に寄与する因子であることが明らかとなった。
- ② Genotype 1 型の C 型肝炎生体肝移植レシピエントにおいても、レシピエントの IL28B マイナーアレル型は Peg-IFN/RBV 治療に抵抗性である。今後は IL28B 遺伝子多型と ISGs と関係についても検討を進める予定である。

A. 研究目的

C 型肝炎に対する抗ウイルス療法が進歩して sustained viral responder (SVR) 率が向上したとはいえ、その効果は十分とはいえない。特に、わが国で最も頻度が高い genotype 1b 型においては治療抵抗性の頻度が高い。そのため、末期 C 型肝炎硬変に対して生体肝移植を行ったレシピエントに対して抗ウイルス療法を行っても、ウイルス排除が困難な症例が少なくなく、長期予後は不良と推察される。生体ドナーの犠牲を無にしないためにも、移植後の IFN 治療抵

抗性の C 型肝炎再発を阻止する有効な手立てを構築することが急務である。Genotype 1b であっても、抗ウイルス療法が奏功する症例があることは周知の事実である。近年の研究により、HCV に対する IFN を中心とした抗ウイルス療法の感受性に関わる因子として、ウイルス側因子のみならず宿主側因子もきわめて重要であることが明らかにされた。ウイルス側因子としてはインターフェロン感受性領域 (ISDR) やコア領域の変異が重要であり、宿主側因子としては IL28B の遺伝子多型 (Tanaka et al,

2009, Nat Genet.) がきわめて重要な因子と考えられている。しかし、そのメカニズムについては十分な解明がなされていない。そこで我々は IL28B の遺伝子多型 (SNP) と IFN 治療抵抗性の機構解明を行うことを目的に、様々な方面からのアプローチを開始している。その一端として、IL28 の発現形態やその下流の Interferon stimulated genes (ISGs) について詳細な検討を行っている。

B. 研究方法

- ① C 型肝炎患者の肝臓内の ISGs に注目して IL28B の SNP との関係や IFN 治療抵抗性との関係について詳細な検討を行った。
- ② 研究①の結果をもとに、生体肝移植後 HCV 再感染例におけるレシピエントの IL28B 遺伝子多型 (SNP) と IFN の治療効果との関係について検討を行った。

C. 研究結果

- ① C 型肝炎患者の肝臓内での遺伝子の発現を検討したところ、ISGs の発現が高い状態が IFN 抵抗性と密接な関係にあることが明らかとなった。IFN 治療に良く反応する症例 (responder) では、IFN 治療前の ISGs が低く抑えられているものの、IFN 治療に伴って ISGs が強く誘

導されることが明らかとなった。一方、治療抵抗例 (non-responder) では治療前から ISGs が既に高く誘導されているものの、治療後はあまり ISGs の誘導が増加しないことが明らかとなった。次に、IL28B の遺伝子多型と肝内の ISGs の発現の関連について検討したところ、IFN の効果が乏しいとされる IL28B マイナーアレルを有する症例は、メジャー症例に比べて肝内の ISGs の発現が高いことが判明した。同時にマイナータイプの肝臓では、治療前からインターフェロン α シグナルがより強く発現し、Wnt シグナルが増えていることも判明した。一方、メジャータイプの肝臓では、IL12、IL2 や IL7 シグナルなどの T, B 細胞系、DC 系に関連する遺伝子がマイナーより強く発現していることが明らかとなった。IL2 は肝移植後に拒絶に関与することがわかっているため、メジャーアレルであれば SVR を得られやすいかわりに、IFN 療法により拒絶をきたすリスクはむしろ高まるのではないかと推察される。ISGs や IL28B の SNP が IFN の治療効果にどれだけ寄与するのかを多変量解析で検討したところ、ともに有意な規定因子と判定され、両者がそれぞれ独立した治療効果予測因子となりえることが示唆された。