

原発性硬化性胆管炎の最近の話題

原発性硬化性胆管炎に対する肝移植の適応と問題点*

田代 裕尊¹⁾・田妻 進²⁾・佐々木民人³⁾・茶山 一彰³⁾
浅原 利正¹⁾・大段 秀樹¹⁾

要約：進行した原発性硬化性胆管炎（PSC）に対しては内科的治療はなく、唯一確立された治療法は肝移植である。PSC に対する肝移植は、肝不全症状や難治性胆管炎を呈した症例には適応されるが、その時期は予後予測式を参考に決定される。PSC は胆管癌や炎症性腸疾患を合併することが比較的多く、術前の胆管系の精査や炎症性腸疾患の内科的治療は重要である。本邦における PSC に対する生体肝移植（特に親から子への移植）の成績は他の肝疾患同様にその短・中期（移植後 5 年まで）成績は良好であるが長期予後（移植後 10 年）は不良である。この原因として PSC の再発が高率に認められ、一旦再発を来すと PSC は進行し肝不全に至る。この再発を制御できる治療法は現在確立されておらず対症療法または可能であれば再移植のみとなる。今後、生体肝移植と比較し再発リスクの少ない脳死肝移植の推進が待たれる。

Key words：原発性硬化性胆管炎，生体肝移植，現疾患再発，胆管癌

はじめに

原発性硬化性胆管炎（Primary Sclerosing Cholangitis：PSC）は、肝内・肝外胆管に原因不明の線維性狭窄を来し胆汁うっ滞から肝硬変へと進展し最終的には肝不全に至る難治性の肝疾患である。病理組織学的にはリンパ球、多核白血球などの炎症細胞の浸潤と線維化を伴う慢性胆管炎であり、特徴的所見としてタマネギ状の胆管周囲求心性巣状線維化（onion-skin fibrosis）を認めることもある。

PSC は胆管病変に加え、炎症性疾患特に潰瘍性大腸炎との合併率が高く、欧米では約 70% に、わが国では約 40% に合併することが報告されている¹⁾。PSC は若年男性に多いとされるが、わが国では中高年（40～50 歳）に発症することが多く、進行性である。治療は内科的治療（胆汁酸，免疫抑制），内視鏡的治療（胆管ス

テント挿入）が行われるが、これらの治療にもかかわらず病状が進行すれば肝移植の適応となる。肝移植を施行した場合、その予後は欧米では 1 年生存率は 90% から 94%，5 年 85% 前後，10 年 70% と他の肝疾患と同様に良好であるが、PSC の再発は 7 年のフォローで約 20% に認め、その再発がグラフトロスに繋がることが報告されている²⁾。一方、わが国では日本肝移植研究会での肝移植症例登録報告 2009 年において初回生体肝移植が 5,058 例に施行され、その内 PSC に対して 139 例に施行されている。その短期生存率は原発性胆汁性肝硬変症（PBC）を代表とする他の胆汁うっ滞性肝疾患と同様良好であるが、長期成績では不良で、PBC の累積生存率は 1 年 81%，5 年 77%，10 年 73% に対して、PSC でのそれは 1 年 81%，5 年 75%，10 年 59% であった³⁾。PSC では、再発によるグラフトロスや PSC に併発する胆管癌、潰瘍性大腸炎などの特有の問題点を有しており、本稿では PSC に対する肝移植の適応、タイミング、手術手技、移植後の QOL、再発などの問題点について自験例を交え概説する。

I. 適応（移植時期）

どの時点で移植のインフォームドコンセントを行う

* Indication of Liver Transplantation for Primary Sclerosing Cholangitis

1) 広島大学病院移植外科（〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3）

2) 同 総合診療部

3) 同 消化器内科

表 1 予後予測式

New Mayo Model	$R = 0.03 \times (\text{age in years}) + 0.54 \log_e (\text{bilirubin in mg/dl}) + 0.54 \times \log_e (\text{aspartate aminotransferase in U/ml}) + 1.24$ (if history of variceal bleeding *) $- 0.84 \times (\text{albumin in g/dl})$
MELD	$\text{MELD score} = 3.8 \times \log_e (\text{T. Bil in mg/dl}) + 11.2 \times \log_e (\text{INR}) + 9.6 \times \log_e (\text{creatinine in mg/dl}) + 6.4 \times (\text{etiology : 0 if cholestatic or alcoholic, 1 otherwise})$

*有のとき1点、無のとき0点

か、あるいは移植時期の決定に関しては、PSCに限らず判断に迷うことがある。肝腎症候群に移行して移植のタイミングが遅れると移植後早期の予後は不良となる一方で、移植時期が早すぎても移植周術期のリスクや免疫抑制剤などの長期投与に伴う副作用のリスクが原疾患のリスクを上回る可能性がある。

繰り返す食道静脈瘤の破裂、難治性腹水、肝性昏睡の存在は他の肝疾患同様に移植の適応となる。PSC特有の適応として、繰り返す胆管炎、薬物治療に抵抗性の搔痒感、があげられる。これらの症状は患者のQOLを著しく損なうもので、あらゆる薬物治療や内視鏡的治療に抵抗性の場合には肝移植の適応となる。この全身搔痒感は必ずしも肝機能、門脈圧亢進症の程度や組織学的肝硬変の進行度と相関しない。一方、PSC特有の術前問題点として骨異栄養症、潰瘍性大腸炎、胆管癌の合併があげられる。骨異栄養症は、胆汁うっ滞性肝疾患に共通する合併症であるが、進行すると脊椎の圧迫骨折から体動障害を伴う高度の背部痛を認めることもあり、術前には骨密度の測定による評価が必要である。骨密度低下ではカルシウム、ビタミンD、骨吸収抑制剤（ビスフォネート）、ホルモン療法などの内科的治療が必要となる。しかしながら、病的骨折に至った症例の多くは移植後の改善が困難なことが多く移植適応に慎重になることも多い。潰瘍性大腸炎合併例では、大腸癌の併発の可能性があるが術前大腸内視鏡検査によるスクリーニングが重要である。また潰瘍性大腸炎自体の術前内科的コントロールも当然計られなければならない。PSCでは、胆管癌を10~20%に併発するといわれているが、わが国での最近の報告では、約4%と低値である⁴⁾。胆管癌併発の予測・診断を行うには困難な症例が多いが、内視鏡的検査による術前検査は重要である。腫瘍マーカー（CEA, CA19-9）を用いた予測もいくつか報告⁵⁻⁷⁾されているが、本特集での他稿において胆管癌の診断については詳述されているので参考にされたい。

従来からPSCの重症度、予後リスクを数値化して移植適応の指標に、あるいは欧米では移植順位の決定に使用されてきた。その代表的なものを表1に示す。

New Mayo modelの予後予測モデル⁸⁾はPSCの予後を予測するものとして現在最も頻用されている。Mayo clinicのホームページから予後予測のサイトに入り、年齢、血清ビリルビン値、AST (aspartate aminotransferase)、アルブミン値、プロトロンビン時間、食道静脈瘤からの出血の有無を入力するとRisk scoreが算出される。このモデルでは今後1年から4年までの予後が1年毎に自動計算される。New Mayo modelでは計算されたリスクスコアを基に0未満をlow risk group, 0以上2未満をintermediate risk group, 2以上をhigh risk groupに分け、intermediate risk groupでの1年、5年生存率はそれぞれ90%, 80%以上であるが、high risk groupではそれぞれ50~60%, 30~40%であり⁹⁾、PSCに対する肝移植成績では1年生存率は80%以上であることからこのスコアで2点以上である場合は移植も治療の選択肢として考慮すべきである。

肝予備能の指標として古くからChild-Pughスコアが用いられているが、Child-PughスコアはPSC患者の予後と相関しないことが多い。

末期肝不全の重症度を反映し、主に脳死ドナー肝の有効利用を目的として採用されている予測式としてMELD (The Model for End-Stage Liver Disease) scoreがある。当初、門脈圧亢進症に対するTIPS (Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt)の早期予後を反映するスコアとして提唱された予測式であったが、広く末期肝不全患者に適用されており、PBC特有の予測式ではない。MELDスコアを規定している因子は、血清ビリルビン値、クレアチニン値、INR、原疾患の種類で、ホームページ上で自動計算可能である。移植前のMELDスコア25点以上では移植後早期の予後は有意に不良であるが、PSCでは必ずしも予後と相関しないという報告もある。一般的にMELDスコア15点以上の末期肝硬変は移植の適応となり¹⁰⁾またわが国においても同様な結果を示している¹¹⁾。

表 2 PSC 再発診断の基準

Diagnosis
Confirmed diagnosis of primary sclerosing cholangitis prior to liver transplantation and
Cholangiography
Intrahepatic and/ or extrahepatic biliary stricturing, beading, and irregularity >90 days or
Histology
Fibrous cholangitis and/ or fibro-obliterative lesions with or without ductopenia, biliary fibrosis, or biliary cirrhosis
Exclusion criteria
Hepatic artery thrombosis/ stenosis
Established ductopenic rejection
Anastomotic strictures alone
Nonanastomotic strictures before posttransplantation day 90
ABO incompatibility between donor and recipient

II. 手術手技

肝移植の手術手技に関しては、基本的には胆道再建以外は他の肝疾患と違いはない。PSC における胆道再建は肝外胆管病変のため胆管空腸吻合が基本的に行われている。しかしながら、胆管病変が肝内のみで肝外胆管に病変がおよんでいない症例では、胆管・胆管吻合が可能である。

III. 移植後の癌再発と *de novo* 癌

移植時における摘出肝から胆管癌を少数の症例に認める¹²⁾。欧米での報告では、数%に胆管癌が報告され5年生存率はPSC単独症例では87%に対して胆管癌併発症例（術前、術中より診断された腫瘍、全症例の3%）では5年生存率は0%とその予後はきわめて不良であった¹³⁾。一方、偶発胆管癌（術後病理検査で発見された1cm以内の腫瘍、全症例の8%）を併発していた症例では5年生存率は83%とPSC単独症例と同等の成績であった¹³⁾。移植後の *de novo* 癌の発生も高いことがPSC症例では報告されている¹⁴⁾。PSC肝移植患者において皮膚癌以外の累積癌発症率は5年10%、10年21%（全体では、5年7%、10年14%）ときわめて高い。また、潰瘍性大腸炎合併症例のPSCからの肝内胆管癌と大腸癌の発症も報告されている¹⁵⁾。さらに、PSCは潰瘍性大腸炎における大腸癌の発症を促進するとの報告もある¹⁶⁾。潰瘍性大腸炎合併症における大腸癌の10、20年後の発症リスクは14%と31%と非合併症の5年2%、10年2%に比べ有意に高値であり、胆管癌の発症リスクも非合併例に比べ3倍高いと報告されている¹⁵⁾。潰瘍性大腸炎合併PSCに対する肝移植症例では、45ヵ月のフォローで6%に大腸癌の発症を

認めている¹⁷⁾。潰瘍性大腸炎合併症では、移植後の大腸内視鏡による術後フォローも重要である。

IV. 肝移植後のPSC再発

PSCの再発は移植後のフォローにおいて重要な問題である。PSC再発診断は肝動脈血栓症、慢性拒絶反応、血液型不適合に起因する病変など多くのPSCに類似する胆管病変があり、しばしば診断に難渋する¹⁸⁾。診断には、組織学的または胆道造影検査を必要とし、診断基準が提唱されている（表2）。以前欧米の報告ではPSCの再発は約20%とされ予後には影響しないとされていた^{2,13)}が、わが国では生体肝移植が多く、再発の頻度は高くしかも予後を左右している¹⁹⁾。Egawaら²⁰⁾の報告においてその再発は約50%におよび、ほぼ全例が肝不全に至っている。再発因子として、親をドナーとする移植、若年者PSC症例などがあげられている。またMELDスコアが高値の症例では、PSC再発が高いと報告している。また最近の欧米からの報告でも、脳死肝移植において再発の頻度は、わが国における生体肝移植の頻度ほど高くはないが、一旦再発を認めた症例では予後が不良であるとする報告が多い。その再発のリスクとして、胆管癌の併発¹²⁾、術後のステロイド剤の長期投与²¹⁾、HLA²²⁾などがあげられている。生体肝移植において有意にPSCの再発率が高いことより、遺伝的背景とPSCの再発については因果関係を有すると考えられるが、さらに今後の検証を要する。

V. 自検例

2009年までに当科で施行した成人生体肝移植152例のうちPSCの症例は3例であった。移植直前のNew Mayo modelにおけるRisk scoreは前例2点以上で

あった。3例とも術前・術後に癌の発症は認めていないが、2例において潰瘍性大腸炎を合併していた。1例は生体腎移植術後約1ヵ月後より内科的治療に抵抗性の胆管炎を来しPSCの増悪により生体肝移植を施行したが、術後に敗血症を認め多臓器不全で2ヵ月目に死亡した。他の2例は移植後それぞれ2年、8ヵ月経過し、現在いずれの症例もPSCの再発を認めていない。

おわりに

PSCに対する生体肝移植の短期成績は良好であり、肝移植の良い適応である。しかしながら、親族をドナーとする生体肝移植では高率に再発が認められ、長期予後が不良であるため、今後のさらなる再発因子の解析と対策が待たれる。また、再発リスクを避けるためにも、今後は欧米から報告されているように再発率が少ない脳死肝移植の推進が急がれる。

参考文献

- 1) Takikawa H : Characteristics of primary sclerosing cholangitis in Japan. *Hepatol Res* 37 : S470-S473, 2007.
- 2) Graziadei IW, Wiesner RH, Marotta PJ, et al. : Long-term results of patients undergoing liver transplantation for primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 30 : 1121-1127, 1999.
- 3) 日本肝移植研究会 : 肝移植症例登録報告 2008. 移植 44 : 559-571, 2009.
- 4) Tanaka A, Takamori Y, Toda G, et al. : Outcome and prognostic factors of 391 Japanese patients with primary sclerosing cholangitis. *Liver Inter* 28 : 983-989, 2008.
- 5) Chalasani N, Baluyut A, Ismail, et al. : Cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis : A multicenter case-control study. *Hepatology* 31 : 7-11, 2000.
- 6) Nichols JC, Gores GJ, LaRusso NF, et al. : Predicting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis : An analysis of the serological marker CA 19-9. *Mayo Clin Proc* 68 : 874-879, 1993.
- 7) Ramage JK, Donaghy A, Farrant JM, et al. : Serum tumor markers for the diagnosis of cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology* 108 : 865-869, 1995.
- 8) Kim WR, Therneau TM, Wiesner RH, et al. : A revised natural history model for primary sclerosing cholangitis. *Mayo Clin Proc* 75 : 688-694, 2000.
- 9) Kim WR, Poterucha JJ, Wiesner RH, et al. : The relative role of the Child-Pugh classification and Mayo natural history model in the assessment of survival in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 29 : 1643-1648, 1999.
- 10) Merion RM, Schaubel DE, Dykstra DM, et al. : The survival benefit of liver transplantation. *Am J Transplant* 5 : 307-313, 2005.
- 11) Ishigami M, Honda T, Okumura A, et al. : Use of the model for end-stage liver disease (MELD) score to predict 1-year survival of Japanese patients with cirrhosis and to determine who will benefit from living donor liver transplantation. *J Gastroenterol* 43 : 363-368, 2008.
- 12) Campsen J, Zimmerman MA, Trotter JF, et al. : Clinically recurrent primary sclerosing cholangitis following liver transplantation : a time course. *Liver Transpl* 14 : 181-185, 2008.
- 13) Goss JA, Shackleton CR, Farmer DG, et al. : Orthotopic liver transplantation for primary sclerosing cholangitis : a 12-year single center experience. *Ann Surg* 225 : 472-483, 1997.
- 14) Watt KDS, Pedersen RA, Kremers WK, et al. : Long-term probability of and mortality from de novo malignancy after liver transplantation. *Gastroenterology* 137 : 2010-2017, 2009.
- 15) Claessen MMH, Vleggaar FP, Tytgat KMAJ, et al. : High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 50 : 158-164, 2009.
- 16) Brentnall TA, Haggitt RC, Rabinovitch PS, et al. : Risk and natural history of colonic neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 110 : 331-338, 1996.
- 17) Higashi H, Yanaga K, Marsh JW, et al. : Development of colon cancer after liver transplantation for primary sclerosing cholangitis associated with ulcerative colitis. *Hepatology* 11 : 477-480, 1990.
- 18) Graziadei IW, Wiesner RH, Batts KP, et al. : Recurrence of primary sclerosing cholangitis following liver transplantation. *Hepatology* 29 : 1050-1056, 1999.
- 19) Yamagiwa S, Ichida T : Recurrence of primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis after liver transplantation in Japan. *Hepatol Res* 37 : S449-S454, 2007.
- 20) Egawa H, Taira K, Teramukai S, et al. : Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after living donor liver transplantation : a single center experience. *Dig Dis Sci* 54 : 1347-1354, 2009.
- 21) Cholongitas E, Shusang V, Papatheodoridis GV, et al. : Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 14 : 138-143, 2008.
- 22) Alexander J, Lord JD, Yeh MM, et al. : Risk factors for recurrence of primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Liver Transpl* 14 : 245-251, 2008.

2. 副腎皮質ホルモン剤

—ステロイド投与患者における周術期管理*

井手健太郎 大段 秀 樹**

【要旨】手術侵襲は生体にとって大きなストレスであるため、生体機能を調節する重要なホルモン系である視床下部-下垂体-副腎皮質系が大きく反応する。長期ステロイド投与患者では視床下部-下垂体-副腎皮質系が抑制されているため、侵襲下における急性副腎不全発症の高リスク群である。ステロイドカバーの目的は、このような患者の周術期にグルココルチコイドを追加ないし補充投与することで急性副腎不全を防止し、手術や麻酔に起因する低血圧、ショック、死亡などを回避することであるが、その副作用である創傷治癒遅延と易感染性を念頭におき、患者の全身状態に応じた必要最小限のステロイドを投与する必要がある。

はじめに

副腎皮質ホルモン剤(グルココルチコイド)は、抗炎症・免疫抑制目的で関節リウマチや全身性エリテマトーデス(SLE)などの膠原病、白血病、潰瘍性大腸炎、気管支喘息などのアレルギー疾患、糸球体腎炎および臓器移植後などに対して、長期的に用いられている。このようなグルココルチコイド長期投与患者における手術では、侵襲に伴い急性副腎不全による重篤な血圧低下をきたす危険性があるため、周術期にグルココルチコイド(ストレスステロイド)を追加ないし補充投与するステロイドカバーが行われる¹⁾。ステロイドカバーはその副作用である創傷治癒遅延と易感染性を考慮し、一律で大量のカバーから侵襲の種類や

程度、患者の全身状態に応じた必要最小限のステロイドを補充する投与方法が行われるようになってきた²⁾。

本稿では長期ステロイド投与患者の周術期管理とその注意点について、最新の知見を交えて概説する。

1. 侵襲に対する生体応答と グルココルチコイド

副腎皮質ホルモンは生体の恒常性を保つため必須のホルモンである³⁾。グルココルチコイドは副腎皮質で産生され、視床下部より分泌される corticotrophin-releasing hormone (CRH)、下垂体より分泌される副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone: ACTH)などによって分泌調節を受け、その調節系全体は視床下部-下垂体-副腎皮質系(hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis)と呼ばれている³⁾。健常成人では平常時に5~10mg/m²/日のコルチゾール(hydrocortisone 20~30mg/日, prednisolone 5~7mg/日に相当)が日内変動をもって分泌されて

キーワード: グルココルチコイド, 急性副腎不全, ステロイドカバー

* Perioperative management for patients treated with glucocorticoids

** K. Ide, H. Ohdan (教授): 広島大学外科.

いる²⁾。生体に侵襲が加わると血漿コルチゾール濃度はすぐさま上昇し始め、4~6時間でpeakに達し、おおむね24時間で基準濃度に戻る。侵襲の程度によっては基準濃度に戻るのに48~72時間かかる⁴⁾。コルチゾールの分泌量は侵襲の程度で異なり³⁾、最大で約100mg/m²/日に産生量を増やし、生体の恒常性維持に寄与する。具体的には、循環の維持、電解質代謝、グルコース・脂質・蛋白代謝の維持、免疫能・創傷治癒能の維持などであり、各種臓器、組織における正常機能を維持するように働いている^{1,2,6,7)}。

長期にわたるグルココルチコイドの投与はHPA axisを抑制する⁸⁾。またACTH分泌がなくなると数週間で副腎皮質が萎縮し、二次性副腎不全に陥る⁹⁾。副腎不全の症状として脱力、体重減少、低血圧、胃腸症状などがあり、検査所見として低ナトリウム血症、高カリウム血症、高クロール血症性代謝性アシドーシス、低血糖などがみられる^{1,7)}。HPA axisが抑制された状態で手術を受けると、個体内で適切なACTHやコルチゾールの産生ができず、低血圧性ショックに陥る⁹⁾。以上が長期ステロイド投与患者に対する手術侵襲による急性副腎不全発症の機序である。

II. 副腎皮質機能検査と

急性副腎不全発症の高リスク群

副腎皮質機能検査としては、血漿コルチゾール濃度測定とACTH刺激試験がある。成人における血中コルチゾール早期安静時基礎値は5~20μg/dlであり、必ずステロイド内服前に採血しておく。ACTH刺激試験は、合成ACTH(tetracosacide acetate 250μg)を筋注あるいは静注して刺激前の基礎値とACTH投与1時間後の血漿コルチゾールを測定し、その上昇の程度をみる検査であり、正常な場合は7~18μg/dlの範囲で上昇する。血漿コルチゾール値の低下やACTH刺激試験における低反応の場合は副腎不全の存在を示し、周術期のステロイド補充療法が必要である^{1,6)}。しかし、通常の手術では術前に副腎機能を評価することはほとんどないが、グルココルチコイド服用が原因の手術(消化性潰瘍穿孔など)では、ACTH刺激試験で副腎機能を評価してステロイド使用を検討すべきであろう¹⁾。

HPA axisは1日あたりprednisolone 5mg相当

以下の投与では、投与期間によらず正常に維持される^{2,6,9)}。3週間以内の投与であれば、投与されたグルココルチコイドの種類・量によらず正常なHPA axisが維持されるといわれているが、明確な結論が出ているわけではない。またグルココルチコイドの投与を中止してからHPA axisの機能が正常化するまで1年間を要するといわれている²⁾。よって、過去1年間に3週間以上にわたり1日あたりprednisolone 20mg相当以上のグルココルチコイドを投与されている場合、あるいは投与量にかかわらずCushing症候群を有している場合はHPA axisが抑制され、副腎機能低下状態にあると判断すべきである⁹⁾。また、過去1年間に3週間以上にわたり1日あたりprednisolone 5~20mg相当を投与されている場合は、ACTH刺激試験などの副腎皮質機能検査により現存の副腎機能を評価するか、副腎機能低下があるものとして対応する⁹⁾。しかし実際には、グルココルチコイドを投与されていた患者におけるHPA axis抑制の程度を投与期間、最高投与量、総投与量などから正確に予測することは困難である^{2,7)}。

III. 急性副腎不全とステロイドカバー

副腎不全による低血圧は治療抵抗性で輸液や昇圧薬に反応せず、発熱も抗生物質では治まらないとされている。周術期に急性副腎不全が起こると、原因不明の治療抵抗性の血圧低下として認識され、容易にショックとなり死亡へと移行する¹⁾。

周術期ステロイドカバーの最初の報告は1953年のLewisら⁹⁾によるものであり、推奨されたステロイドカバー量は通常使用量の4倍以上で、以降グルココルチコイドを服用している患者あるいは最近まで服用していた患者には大量のステロイドを周術期に投与することが一般的になった。代表的な方法としてhydrocortisone 200mgを術前投与し1週間程度で漸減する方法、あるいは術前・術中にhydrocortisone 100mgを投与し、漸減する方法がある¹⁰⁾。現在ではグルココルチコイド服用者の周術期急性副腎機能不全の発生率は高くないと思われ、また古典的な大量ステロイドカバーは必要ないと考えられている¹¹⁾。しかし、発生率は低くても致死的な合併症であることから、大量ではないとしてもなんらかのステロイドカバーが行われている。

表1. ステロイドカバーのガイドライン(文献2より引用)

侵襲の程度	侵襲の種類	グルココルチコイド投与法
軽度	単径ヘルニア手術, 大腸内視鏡検査, 微熱をきたす疾患	hydrocortisone 25mgまたは methylprednisolone 5mgを手術当日あるいは発症時に静注
中等度	開腹胆嚢摘出, 結腸半切除, 高度発熱性疾患, 肺炎, 重症胃腸炎	hydrocortisone 50~75mgまたは methylprednisolone 10~15mgを手術当日あるいは発症時に静注し, 漸減し1~2日間で通常量に戻す
高度	心血管, 胸部手術, 膝頭十二指腸切除, 肝切除, 急性脾炎	hydrocortisone 100~150mgまたは methylprednisolone 20~30mgを手術当日あるいは発症時に静注し, 漸減し2~3日間で通常量に戻す
重症	敗血症性ショック	hydrocortisone 50~100mgを6~8時間ごとに静注または0.18mg/kg/時の持続静注に fludrocortisone 50 μ g/日をショックから離脱するまで(数日から1週間程度)投与する. 徐々にバイタルサインや血清ナトリウム濃度をモニタリングしつつ漸減する

5mg/日以下の prednisolone を投与されている患者では, 通常の維持量の投与は必要であるが, 追加の必要はない
5mg/日以上 prednisolone を投与されている患者では, 通常の維持量に加えて上記を投与する

2002年に Coursin²⁾は, 患者病態別に必要投与量を提唱したステロイドカバーのガイドラインを報告した(表1). このガイドラインは経験に基づいたものであり, 大規模研究に基づいたものではないためいまだ議論の余地がある. しかし, 従来の経験的に設定されていた事例を見直し, その過剰さを副作用の点から反省したうえで設定し直し, 侵襲の程度に応じてバリエーションをもたせていることと, 概して少量で短期的であることなど参考にすべき点が多い. より適切なステロイドカバーの適応や投与方法, 投与期間などに関して今後の研究の発展が期待される^{2,6,7,12)}.

IV. 創傷治癒障害と易感染性

動物実験での副腎摘出モデルにおいて創傷治癒反応や感染抵抗性が減弱することから, 生理的範囲内のグルココルチコイドは創傷治癒に必須である¹³⁾. しかし, 過量のグルココルチコイドは, 創傷治癒機転の段階の中で抗張力, 上皮化, 血管新生, 創収縮などすべての過程を選延させ, 創傷治癒能力を低下させるとともに免疫能を低下させ, 易感染状態をきたす. よって, 一般的には「ステロイド=創傷治癒阻害因子」と認識されている⁶⁾.

創傷治癒過程が各種サイトカインと免疫担当細胞から線維芽細胞などのカスケードで形成される炎症反応そのものであり, この炎症反応を抑制す

る比較的高用量のステロイド投与が創傷治癒反応に抑制的に作用すると考えられる⁶⁾. また長期ステロイド投与患者に非薄化した皮膚や筋萎縮を認めた場合は, ステロイドによる蛋白異化が亢進していることを示唆し, 創傷治癒に不利な状況であるため注意を要する⁶⁾.

臨床的には, 長期ステロイド投与患者の消化管吻合は縫合不全発生のリスクが高いと考えられるため, 状況に応じた安全性・確実性の高い吻合法の選択や, 人工肛門造設・二期的再建など吻合のない術式の選択を考慮する必要がある⁶⁾. また易感染性に伴う創感染の高リスク状態と考えられるため, 適切な手術部位感染対策も重要である⁷⁾. 臨床的にはまだ認知はされていないが, ビタミンAの術前あるいは術後の投与によって, ステロイドのための創傷治癒障害を軽減できたという報告もあり¹⁴⁾. 臨床的な至適投与方法などを含めて今後の研究が期待される.

おわりに


長期ステロイド投与患者における, 急性副腎不全を回避するための周術期ステロイドカバーの重要性と創傷治癒反応における至適量のステロイドの有用性に関して述べた. ステロイドカバーに関しては, 一律で大量のカバーから侵襲に応じた段階的な投与方法にかわりつつあるが, 一定の結論が

あるわけではない。侵襲の種類や程度、麻酔管理、患者の全身状態を考慮したうえで、個別に至適投与法を検討することが肝要である。

◆ ◆ ◆ 文 献 ◆ ◆ ◆

- 1) 松山博之, 入田和男, 高橋成輔 ステロイドカバー—最近の考え方 臨麻 28 : 219-225, 2004
- 2) Coursin DB, Wood KE : Corticosteroid supplementation for adrenal insufficiency. JAMA 287 : 236-240, 2002
- 3) Selye H : The significance of the adrenals for adaptation. Science 85 : 247-248, 1937
- 4) Thoren L : General metabolic response to trauma including pain influence. Acta Anaesth Scand 55 : 9-14, 1974
- 5) Hume DM, Bell CC, Barter FC : Direct measurement of adrenal secretion during operative trauma and convalescence. Surgery 52 : 174-187, 1962
- 6) 宮田 剛, 標葉隆三郎 : 長期ステロイド治療患者における消化管手術とステロイドカバー 臨外 57 : 939-944, 2002
- 7) 須田康一, 竹内裕也, 菅沼和弘ほか : ステロイド投与患者の周術期管理. 外科治療 98 : 367-371, 2008
- 8) Jabbour SA : Steroids and the surgical patient. Med Clin North Am 85 : 1311-1317, 1991
- 9) Lewis L, Robinson RF, Yee J et al : Fatal adrenal cortical insufficiency precipitated by surgery during prolonged continuous cortisone treatment. Ann Intern Med 39 : 116-126, 1953
- 10) 稲田英一 : ステロイドカバー 麻酔 47 : S70-S76, 1998
- 11) Levy A : Perioperative steroid cover Lancet 347 : 846-847, 1996
- 12) Jacob J : Corticosteroid replacement in critically ill patients. Crit Care Clin 22 : 245-253, 2006
- 13) Matsusue S, Walsler M : Healing of intestinal anastomoses in adrenalectomized rats given corticosterone. Am J Physiol 263 : R164-R168, 1992
- 14) Phillips JD, Kim CS, Fonkalsrud EW et al : Effects of chronic corticosteroids and vitamin A in the healing of intestinal anastomoses. Am J Surg 163 : 71-77, 1992

* * *

	<h2 style="text-align: center;">当直医実戦くすりマニュアル</h2> <p style="text-align: center;">監修 実戦マニュアル編集委員会 著 梅田悦生</p> <p>■B6変型判・320頁 2009.9. ISBN978-4-524-26021-8 定価 3,675円 (本体 3,500円+税 5%)</p> <p>「当直医実戦マニュアル」の姉妹本。時間外の薬物治療トラの巻。症状ごとに時間外治療のコンセプト、処方例と主な薬剤名を記載。薬効別便覧では「選び方と使い方のコツ」「当直現場で必要とされる安全性情報」、小児薬用量、FDAなどを解説。併用禁忌薬剤は、すべての記載に薬効分類、一般名、商品名を補った。効果がシャープな注射薬を数多く記載した。</p>
---	---

肝移植における免疫モニタリング

大段 秀樹*

Frontier in Liver Transplantation

Liver Transplant Frontier

Immunomonitoring in liver transplantation

Hideki Ohdan*

key words : 免疫モニタリング, 肝移植, 拒絶反応, 免疫寛容

肝移植後では、免疫抑制薬を徐々に減量可能であるというコンセンサスはあるものの、なにを指標にしてどの程度まで減量するかは、各施設によって方針が異なります。当施設における免疫モニタリングの実際とそれによる免疫抑制療法の最適化について紹介し、さらに、免疫抑制療法を最適化することによって得られる利点、特に B 型肝

炎のワクチン療法と C 型肝炎の免疫細胞療法の可能性についてもお話します。

免疫モニタリング下における免疫抑制療法の最適化 私たちの行っている免疫モニタリングは、carboxyfluorescein diacetate succimidyl 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リンパ球混合試験 (mixed lymphocyte reaction assay : MLR) です^{1,2)} (図 1)。

CFSE 色素は細胞傷害性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

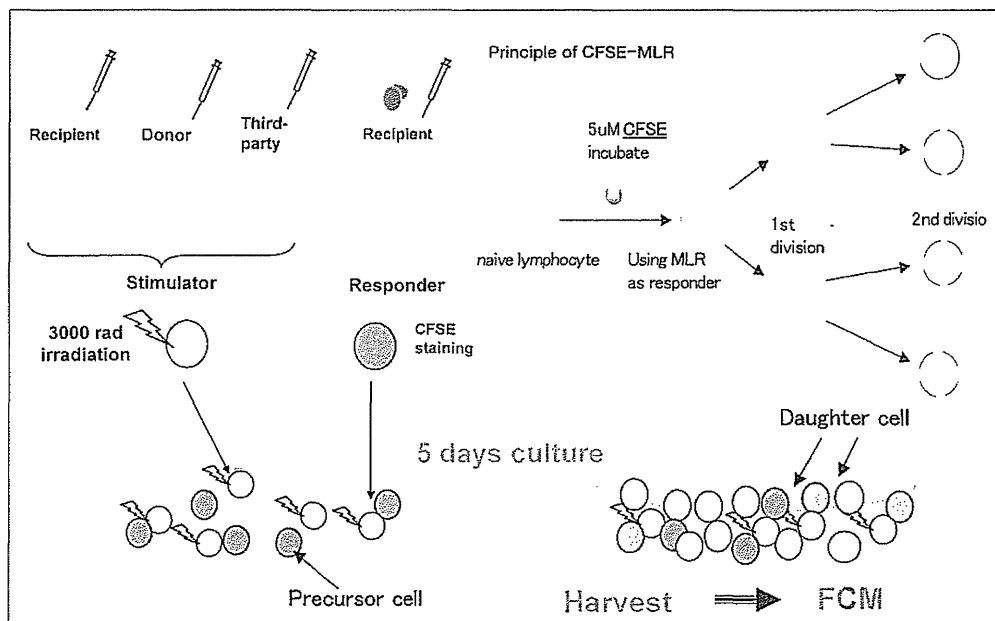


図 1 CFSE 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用したリンパ球混合試験

*Department of Surgery, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University 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

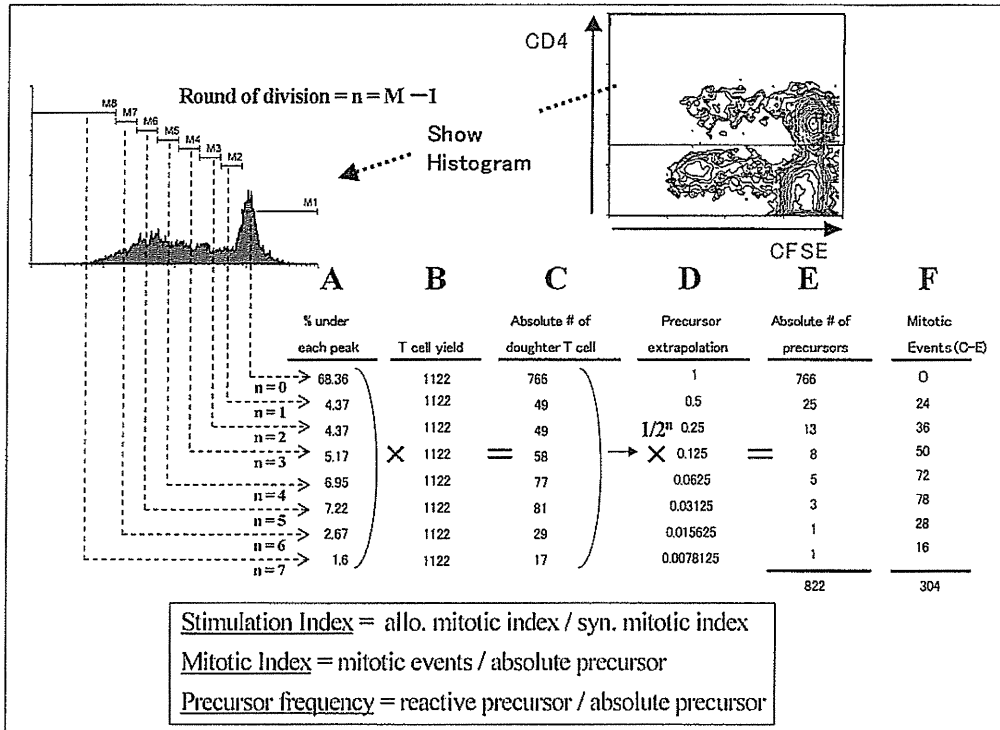


図2 アロ反応性T細胞の precursor frequency, mitotic index と stimulation index の定量法 (Tanaka Y et al. : Immunol Invest 33 : 309-324, 2004¹⁾より)

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フローサイトメトリー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 (SI) の算出、定量化が可能です(図2)。

すなわち、4~5日間リンパ球培養後にフローサイトメーターで解析します。フローサイトメーターではCD4あるいはCD8表出によって展開してCFSEのintensityを測定し、SIを計算します。同時に、CD8T細胞上のCD25表出率を測定します。その理由は、CD8⁺CD25⁺T細胞に抗ドナー細胞傷害性を認め、CD25⁻CD8⁺T細胞には抗ドナー細胞傷害性がほとんど存在しないからです。

また、MLRのフローサイトメーター解析時に、細胞内サイトカイン染色を同時に施行すると、増殖するCD4T細胞にのみIL-2産生が観察できます。そして、増殖するCD8⁺T細胞はインター

フェロン γ (IFN γ)を産生していることが確認できます。したがって、CD4⁺T細胞の抗ドナー応答(stimulation index)をカルシニューリンインヒビター(CNI)増減の指標として用い、CD8⁺T細胞の抗ドナー応答をステロイドの増減の指標として用いています。

図3は、MLRデータに基づいた免疫抑制薬の最適化アルゴリズムです。MLR後にフローサイトメーターで解析して、CD8⁺T細胞のSIを算出します。前感作のないCD8⁺T細胞のSIの平均値が2ですから、2以上か2未満かで分類します。つぎに、抗ドナー応答と抗third-party応答の優位性を判定します。そしてCD25分子の表出率をもって、CD8の抗ドナー応答の亢進(hyper-response on CD8⁺T細胞)があるかどうかを判定します。

CD8⁺T細胞のSIが2以下である場合には、CD4⁺T細胞の応答を観察します。同じく平均値

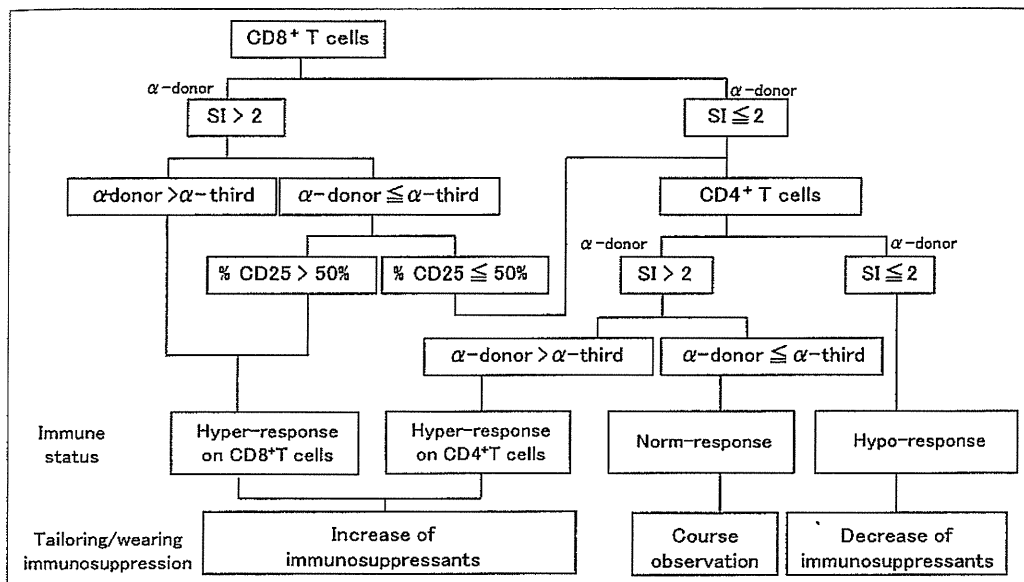


図3 免疫抑制薬の最適化のアルゴリズム

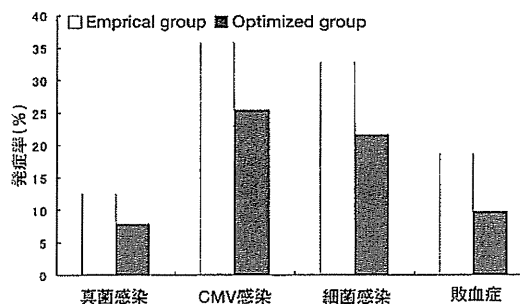


図4 免疫モニタリングの有用性試験
対象は生体肝移植 115 例(2002 年 1 月~08 年 12 月)

2 以上と 2 未満にわけて分類します。そして、抗ドナー応答と抗 third-party 応答の優位性を判定し、免疫学的に四つのカテゴリーに分類して免疫抑制薬を増減しています。

2002 年 1 月~08 年 12 月までに行われた生体肝移植 115 例のうち、リンパ球混合試験によって 51 例に免疫抑制薬を最適しました(optimized 群)。一方、残りの症例では、通常どおり肝機能の安定をもって、徐々に免疫抑制薬を減量する empirical protocol を応用しました(empirical 群)。観察期

間中の真菌感染症の発症率、サイトメガロウイルス(CMV)感染症の発症率、細菌感染症の発症率、血流感染症の発症率は、有意差を認めないものいずれも empirical 群にくらべ optimized 群が低値でした(図 4)。また、optimized 群は、拒絶反応も empirical 群にくらべ発症率は低く、慢性拒絶に陥った症例は認められませんでした。生存率も optimized 群のほうがやや良好でした。

免疫抑制療法の最適化による功：HBV ワクチネーション

B 型肝炎は抗 HBs ヒト免疫グロブリン(HBIG)と核酸合成アナログの併用で再発予防治療が行われていますが、耐性株の出現や医療経済的に問題があり、当施設では HBV ワクチネーションを行っています。しかし、免疫抑制下において能動免疫を期待すること自体、相反する治療を行っていることとなります。必要最低限の免疫抑制による抗ドナー特異的免疫抑制状態を導くことができれば、HBV ワクチンの成功率は改善するはずで。そこで当施設では、MLR アルゴリズムによって免疫抑制薬を最少化していくと同時に、HBV

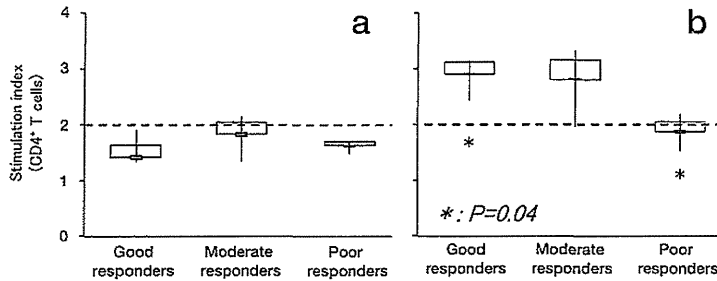


図5
ドナー特異的低反応状態で
HBV ワクチンが効果的
a: 抗ドナー応答
b: 抗 third party 応答
(Tahara H et al. : Transpl Int
22 : 805-813, 2009³⁾より)

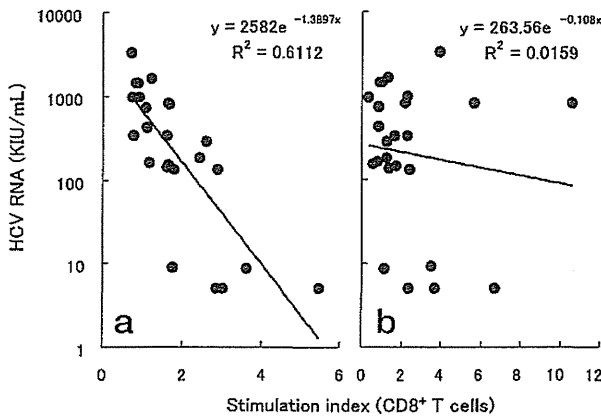


図6
HCV RNA タイターと
アロ免疫応答の関係
a : 抗ドナー応答
b : 抗 third party 応答

ワクチネーションを行っています。HBIG、ラミブジンなどの投与は併用して行い、ワクチネーションは抗体の上昇を認めるまで継続的に投与します。

ワクチネーションの成績は、1年以内に抗HBs抗体の上昇を認めたものを good responder、1~2年以内に抗HBs抗体の上昇を認めHBIGの離脱ができたものを moderate responder とすると、レスポンスした症例では抗ドナー応答は低下したままで抗 third-party 応答は正常化しています(図5)³⁾。すなわち、外来抗原に対しては応答できる状態であることを意味しています。一方、ワクチネーションに反応しなかった poor responder をみると、抗ドナー応答も抗 third-party 応答も、いずれも低下したままであることがわかります。免疫抑制薬の最適化ができていない症例では、ワクチンの効率も不良であることが予測されます。

当施設のHBVワクチネーションの成功率、すなわちHBIGと核酸合成アナログの離脱率は

65%です。従来の報告例からすると良好な成績です。

免疫抑制療法の最適化による功：HCV免疫細胞療法

つぎに、免疫モニタリングによって明らかとなったC型肝炎に関わる重要な現象について紹介します。C型肝炎患者の末梢血中のRNA titerとMLRで測定したアロ免疫応答の推移をプロットしました。両者の関係をみてみると、抗ドナー応答の stimulation index が高ければHCV量が減り、強い逆相関が観察できます(図6)。しかし、抗 third-party 応答との関係はほとんど認められず、非特異的免疫抑制状態がHCVに対する免疫応答を抑制するのではなく、拒絶反応自体がHCVの増幅を抑制する可能性が示唆されます。

私たちはつぎのような仮説を立てました。肝移植後に拒絶反応が惹起されると、門脈流域にリンパ球が浸潤します。CD4⁺T細胞からはIL-2が、CD8⁺T細胞からはIFN γ がリリースされます。

IL-2 産生細胞の近傍にナチュラルキラー(NK)細胞が存在すれば、そこから IFN γ が産生され、近傍の hepatocyte 中の HCV の増幅を抑制するというものです。

そこで、つぎのような *in vitro* スタディを行いました。ダブルチャンバー・カルチャーシステムの下層に HCV レプリコン細胞を培養し、その上層でリンパ球混合試験を行いました。リンパ球混合試験が HLA の 0-mismatch、すなわち alloimmune response が起きない状態をコントロールとして HCV 増勢の程度を比較すると、3-mismatch で培養すると有意に HCV のレプリケーションが抑制され、6-mismatch で培養するとさらなる抑制効果が認められました。この培養系に IFN γ ブロッキング抗体を添加すると、抑制効果は消失してしまいます。したがって、拒絶反応が惹起されたときにリリースされる IFN γ が HCV の増幅を抑制しているといえます。HCV を制御するために拒絶反応を起こさずにはするという事は現実的ではないので、組織傷害を起こすことなく、いかに肝グラフトに IFN γ 産生細胞を集めるかが、治療戦略となりえます。

私たちが考えた戦略は、肝臓に内在する NK/NKT 細胞は拒絶反応を惹起しない細胞ですが、これを直接 IL-2 で活性化して抗ウイルス効果を誘導しようというものです。ヒト肝リンパ球を採取して、NK/NKT 細胞を分離して、ダブルチャンバーシステムで培養してみると、期待どおり NK/NKT 細胞に強い抗 HCV 効果の誘導が観察できました。

また、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた実験を行いました。UPA トランスジェニック・スキッドマウス、すなわち、肝不全・免疫不全マウスにヒトの肝細胞を移植すると、90%以上がヒト肝細胞

に置換されたヒト肝細胞キメラマウスが作成できます。C 型肝炎感染血清を注入すると C 型肝炎感染マウスが作製され、ここに肝由来ヒト NK/NKT 細胞を注入すると HCV は消失することが観察できました⁴⁾。

これらの基礎実験を踏まえて、ドナー肝由来活性化 NK/NKT 細胞療法を開発しました。肝移植時に肝臓を摘出して臓器灌流を行います。この廃液には NK/NKT 細胞が豊富に存在します。これを IL-2 と CD3 抗体の存在下で 3 日間培養して、レシピエントに点滴静注する治療法です。

7 例の C 型肝炎患者にこの治療法を行ったところ、2 例で HCV が消失しました。この 2 例は移植前の HCV-RNA が比較的 low、一方、高い症例では効果が認められていません。本療法を行わなかったコントロール群と比較すると、本療法を行った群は有意に HCV-RNA 量が移植後 4 週間以内では低下していることがわかります。しかし、7 例中 2 例とその確率は低く、いかに移植前の HCV を低下させるか、あるいは投与するリンパ球数を増加させるかが今後のテーマになります。

文 献

- 1) Tanaka Y 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(3) : 309-324, 2004.
- 2) Tanaka Y 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(9) : 1262-1267, 2005.
- 3) Tahara H et al. : Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transpl Int* 22(8) : 805-813, 2009. Epub 2009 Mar 17.
- 4) Ohira M et al. : Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 119(11) : 3226-3235, 2009.



宮川 どなたか質問はございますか。

古川 大段先生の発表された免疫モニタリングの手法は、煩雑で時間がかかり、なにか事象が起きたときには治療が追いつかない可能性があります。

す。拒絶反応が起きたとき、通常は肝生検を行い、その日に結果が出て治療に移りますが、そういう場合、どういう選択をされますか。

大段 私たちは事象が起きたときに MLR をし

ているのではなくて、移植後2週間おきに定期的にMLRをしています。その間になにかあったとしても、その前のMLRの結果が参考になります。

古川 理想的には、大段先生がおっしゃるようにMLRをしながら拒絶反応をその時点で抑えられればいいのですが、なにか事象が出てきたときは対応が難しいと感じました。

大段 MLRの結果を待っていれば治療が間に合わない拒絶反応はきわめて強いものです。この場合、4日の培養を待たずに細胞分裂が肉眼的にも観察できるようになります。その段階で、フローサイトメーターで解析をして判断しています。常に5日間の培養が必要ではなく、強い拒絶反応は3日ほどで判定ができます。翌日に結果の出る肝生検のテンポには追いつかないかもしれません。

古川 そういうときはどちらを重視しますか。

大段 拒絶反応かどうかという判定は、組織診よりも免疫モニタリングを重視しています。

古川 それならば効率的ではありませんね。

大段 そうですね。ウイルス性肝炎に対する肝移植例では、拒絶反応なのか肝炎再発なのか、早期では組織学的にも鑑別しにくい症例も経験しているので、免疫抑制薬を増量するか減量するかという指標としては、免疫モニタリングを用いています。

古川 拒絶反応の発現率は差が出ましたが、それをもっと下げられる可能性はありますか。

大段 いまの段階では、免疫モニタリングによってリアルタイムに免疫調整をしているというよりは、移植後早期は一般的な減量プロトコルを行い、退院後に免疫モニタリングによって免疫抑制薬をどれくらいまで減量できるか判断しています。

古川 長期だといいいのですが、急性期をどのよ

うに乗り切るのが問題だと思いましたので、質問させていただきました。

ワクチン療法においては、late responderでは反応が抗ドナー応答と抗third-party 応答とも高かったですね。

大段 Good responderでは抗ドナー応答は低く、抗third-party 応答だけが回復しています。Poor responderは両方とも抑制されています。

古川 1年以内に反応するのがearly responderですか。

大段 そうです。

古川 それか、抗ドナー応答は低くて抗third-party 応答は同じくらいですが、1年以上経って反応するものは両方とも同じくらいであると。

大段 時期の差はありますがMLRで判定される免疫状態とワクチンに対するレスポンスの関係は同等です。

古川 抗third-party 応答には同じように反応しているのに、なぜワクチン治療の成績はわるいのでしょうか。

大段 呈示したデータはHBVワクチネーションに成功したときのMLRのデータです。1~2年の間にワクチネーションに成功した症例は最適化に時間がかかっていると理解していただければと思います。免疫抑制薬の最適化に時間がかかる症例は、拒絶反応を経験しているとかそれなりの理由があるので、そういった症例では最適化までに時間がかかってしまいます。

古川 C型肝炎については、いつもながらすばらしい結果なので、大段先生にはもっと研究を推し進めていただきたいです。

武富 C型肝炎の治療については、プロトコルでは肝移植直後にリンパ球を入れて、自然免疫を検討されていますが、たとえば採取したNK/NKT細胞をある一定期間ストックしておいて、IFN+リバビリン併用療法時に使用する、または、末梢血のNK/NKT細胞を代用して使用するということが可能でしょうか。また、そのときの相乗効果をどう予想されますか。

大段 その方向で検討しています。ヒト肝細胞キメラマウスを使った実験でもウイルス量が低け

発言者

- 宮川 真一 (信州大学医学部外科)(司会)
 古川 博之 (旭川医科大学外科講座消化器病態外科学分野)
 大段 秀樹 (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)
 武富 紹信 (九州大学大学院消化器・総合外科)
 宿股 裕紀洋 (熊本大学小児外科・移植外科)

れば、リンパ球療法で完全にウイルスを消失しえますが、ウイルス量が多いとリンパ球を移入しても効果が認められません。肝移植時も、ウイルス前値が低ければ活性化リンパ球療法1回でウイルスが消失しています。そういう意味では、IFN治療を行いつつ、ウイルス量を減少させて、リンパ球療法を併用するというのは理論的で、凍結保存してIFNと同時に使用するという試みをしようという方向でいます。

末梢血中のリンパ球を培養して免疫細胞療法に使用する発想については、100ccの末梢血からリンパ球を分離して4週間培養すると40倍ほどのNK細胞が採取できます。これを繰り返し投与するプロトコールの確立を目指しています。

武富 肝臓を摘出すると、HCVもボトムネックでかなり下がります。そのタイミングに合わせて培養リンパ球を入れていると考えていいのでしょうか。

大段 移植後3日に移入しているので、HCVは少し戻りはじめています。時期かもしれませんし、もしかするとHCV消失症例では、ボトム時にリンパ球が移入されたのかもしれませんが、リアルタイムにウイルス量を観察していませんので、今後は免疫細胞移入のタイミングを図るための観察が必要です。

宮川 移植後の肝機能異常の場合、C型肝炎再発か拒絶反応かの判断が難しく、私たちも肝組織でHCVをFISH法によって測定しHCVの増殖をみましたが、拒絶反応とHCVの増殖はオーバーラップしている症例が多くありました。

拒絶反応が起こるくらいの免疫状態であればHCV増殖を抑制できるという点について、私たちの結果からみると、肝内で実際に起こっていることは非常に複雑だと思えますが、どうお考えでしょうか。

大段 ご指摘のように、拒絶反応とHCV量の相互作用は複雑である可能性はあります。拒絶反応によって産生されたIL-2が肝炎を誘導している可能性もあります。

宮川 ドナーのリンパ球をIL-2で活性化して

入れるのは1回だけですか。

大段 いまのところ1回だけです。

宮川 リンパ球には寿命があるので、繰り返し入れるというお考えはありますか。

大段 今後は末梢血中から増殖したNK細胞を細胞療法に使用したいと考えています。先ほど、末梢血中リンパ球を4週間培養するとNK細胞が40倍ほどになるとお話ししましたが、その40倍の培養細胞には強い抗HCV効果が認められました。つまり、肝臓内のNK細胞と同等の抗HCV効果は誘導できます。しかし、生体に投与した場合の細胞寿命が短縮することが今後の課題です。

宮川 MLRで免疫反応をご覧になっていますが、フォローアップ症例をずっとみていくのですか。

大段 50数例に行いましたが、入院中は2週間間隔で、退院後は3カ月から半年間隔でMLRを行い、その数値を参考にして免疫抑制薬を増減しています。

宮川 CD8⁺CD25⁺T細胞の割合は、長期的にはどのように変わるのでしょうか。

大段 長期ではCD8⁺T細胞の応答は徐々に消失して、CD4⁺T細胞の応答が残存する症例で肝機能障害が認められることがあります。その場合は、CNIを調整することが多くあります。CD8⁺T細胞の応答が長期まで残るのはまれです。

猪股 この戦略を用いての実際的な免疫抑制の修飾方法ですが、CNIとステロイドについては発表されましたが、代謝拮抗薬のMMF等を加えることに関してはどうでしょうか。武器としてもCNIとステロイドだけでいこうと考えているのか、CD4⁺CD8⁺T細胞によってこういう状況であれば代謝拮抗薬も加えるといった具体的な方法があるのでしょうか。

大段 本来、免疫抑制療法はCNIとステロイドの二剤併用ですが、腎機能障害あるいは糖尿病などでCNIを減量する必然のある症例では代謝拮抗薬を併用しています。その場合には、代謝拮抗薬を維持して、CNIを最適化しています。

宮川 ありがとうございます。

Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor

Bruno Sainz Jr¹, Naina Barretto¹, Danyelle N Martin², Nobuhiko Hiraga³, Michio Imamura³, Snawar Hussain¹, Katherine A Marsh², Xuemei Yu^{1,5}, Kazuaki Chayama³, Waddah A Alrefai^{1,4} & Susan L Uprichard^{1,2}

Hepatitis C virus (HCV) is a leading cause of liver disease worldwide. With ~170 million individuals infected and current interferon-based treatment having toxic side effects and marginal efficacy, more effective antivirals are crucially needed¹. Although HCV protease inhibitors were just approved by the US Food and Drug Administration (FDA), optimal HCV therapy, analogous to HIV therapy, will probably require a combination of antivirals targeting multiple aspects of the viral lifecycle. Viral entry represents a potential multifaceted target for antiviral intervention; however, to date, FDA-approved inhibitors of HCV cell entry are unavailable. Here we show that the cellular Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) cholesterol uptake receptor is an HCV entry factor amenable to therapeutic intervention. Specifically, NPC1L1 expression is necessary for HCV infection, as silencing or antibody-mediated blocking of NPC1L1 impairs cell culture-derived HCV (HCVcc) infection initiation. In addition, the clinically available FDA-approved NPC1L1 antagonist ezetimibe^{2,3} potentially blocks HCV uptake *in vitro* via a virion cholesterol-dependent step before virion-cell membrane fusion. Moreover, ezetimibe inhibits infection by all major HCV genotypes *in vitro* and *in vivo* delays the establishment of HCV genotype 1b infection in mice with human liver grafts. Thus, we have not only identified NPC1L1 as an HCV cell entry factor but also discovered a new antiviral target and potential therapeutic agent.

HCV is thought to enter cells via receptor-mediated endocytosis beginning with interaction of the viral particle with a series of cell surface receptors, including the tetraspanin CD81 protein⁴, scavenger receptor class B member I (SR-BI, also known as SCARB1)⁵ and the tight-junction proteins claudin-1 (CLDN1)⁶ and occludin (OCLN)^{7,8}, followed by clathrin-mediated endocytosis and fusion between the virion envelope and the endosomal membrane^{9,10}. Although the specifics of each interaction are not fully understood, it is now recognized that multiple cellular factors, as well as many components of the viral particle, not just the viral glycoproteins, participate in the entry process. For example, the HCVcc particle is associated with cellular lipoproteins (for example, low-density lipoprotein and very-low-density lipoprotein)^{11,12} and is enriched in cholesterol¹³, the latter

of which has been shown to be necessary for HCV cell entry^{13,14}. Apart from the likely function of cholesterol in viral membrane stabilization and organization, the dependence of HCV infectivity on cholesterol led us to reason that other cholesterol-uptake receptors (apart from SR-BI and LDLR), such as NPC1L1, might also have a role in HCV cell entry.

NPC1L1, a 13-transmembrane-domain cell surface cholesterol-sensing receptor (Fig. 1a) expressed on the apical surface of intestinal enterocytes and human hepatocytes, including Huh7 cells (Supplementary Fig. 1), is responsible for cellular cholesterol absorption and whole-body cholesterol homeostasis^{15,16}. Similar to what has been observed for other HCV entry factors⁸, we observed downregulation of NPC1L1 in HCVcc-infected Huh7 cultures. Specifically, as early as day 4 after infection NPC1L1 protein levels were markedly reduced and remained downregulated until the end of the experiment at day 12 after infection (Fig. 1b). Having observed a correlation between NPC1L1 expression and HCV infection, we next determined whether NPC1L1 expression levels affect HCV infection by transfecting Huh7 cells with siRNAs targeting NPC1L1 or the known HCV entry factors CD81 or SR-BI. Compared to cells transfected with an irrelevant control siRNA, CD81-, SR-BI- and NPC1L1-silenced cells were significantly less susceptible to HCVcc infection (Fig. 1c). The inhibition was HCV specific, as silencing of these proteins had no effect on vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped particle (VSVGpp) infection (Supplementary Fig. 2a). Inhibition of HCV also correlated with a reduction in NPC1L1 mRNA and protein and was NPC1L1 specific and not the result of off-target effects (Fig. 1d,e, Supplementary Figs. 3 and 4a,b). Although protein amounts were only marginally lowered by siRNA knockdown, the effect on HCV was considerable, highlighting the sensitivity of HCV to small changes in NPC1L1 levels. Notably, SR-BI mRNA expression has been shown to be reduced by NPC1L1 knockdown in nonhepatic cells¹⁷ and SR-BI is an HCV entry factor⁵, but we found that SR-BI expression was not adversely affected by NPC1L1 silencing in Huh7 cells (Supplementary Fig. 4c,d). Finally, NPC1L1 silencing had no effect on HCV subgenomic RNA replication, full-length infectious HCVcc RNA replication or secretion of *de novo* HCVcc (Supplementary Fig. 5).

¹Department of Medicine, University of Illinois–Chicago, Chicago, Illinois, USA. ²Department of Microbiology and Immunology, University of Illinois–Chicago, Chicago, Illinois, USA. ³Department of Medicine and Molecular Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan. ⁴Digestive Disease and Nutrition, Jesse Brown Virginia Medical Center, Chicago, Illinois, USA. ⁵Current address: Kadmon Corporation, New York, New York, USA. Correspondence should be addressed to B.S. (bsainz@uic.edu) or S.L.U. (sluprich@uic.edu).

Received 16 March 2011; accepted 25 October 2011; published online 8 January 2012; doi:10.1038/nm.2581

LETTERS

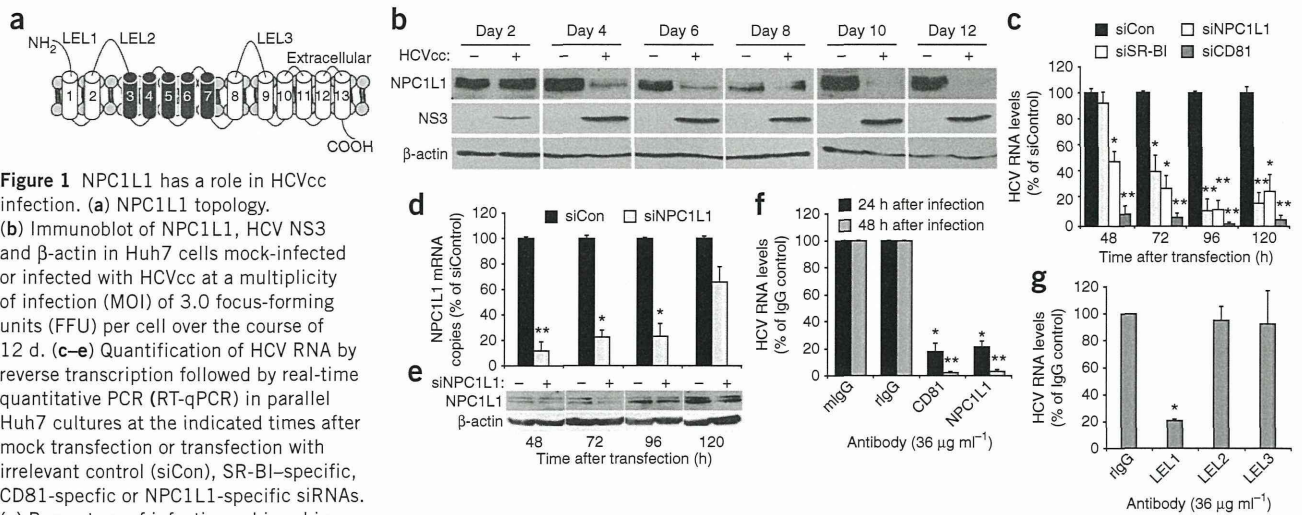


Figure 1 NPC1L1 has a role in HCVcc infection. **(a)** NPC1L1 topology. **(b)** Immunoblot of NPC1L1, HCV NS3 and β -actin in Huh7 cells mock-infected or infected with HCVcc at a multiplicity of infection (MOI) of 3.0 focus-forming units (FFU) per cell over the course of 12 d. **(c–e)** Quantification of HCV RNA by reverse transcription followed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) in parallel Huh7 cultures at the indicated times after mock transfection or transfection with irrelevant control (siCon), SR-BI-specific, CD81-specific or NPC1L1-specific siRNAs. **(c)** Percentage of infection achieved in siCon-transfected cultures. Data are normalized to GAPDH. **(d)** NPC1L1 transcript levels quantified by RT-qPCR, normalized to GAPDH and graphed as a percentage of the maximum number of copies determined in siCon-transfected cultures at each time point examined. **(e)** Immunoblot of NPC1L1 and β -actin protein in siCon-transfected (–) and siNPC1L1-transfected cultures (+). **(f,g)** Intracellular HCV RNA levels detected in parallel Huh7 cell cultures treated with $36 \mu\text{g ml}^{-1}$ of a mouse (mIgG) or rabbit (rIgG) isotype control antibody, a CD81-specific antibody or antibodies specific for each of the three LELs of NPC1L1 for 1 h before and during HCVcc infection. Shown are HCV RNA levels, determined by RT-qPCR and normalized to GAPDH levels, 24 h **(f)** or 48 h **(g)** after infection. Results are graphed as a percentage of infection achieved in the respective IgG control-treated cultures. In all cases, significant differences relative to controls (one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc *t* test) are denoted as **P* < 0.05 or ***P* < 0.01. All results are graphed as means \pm s.d. for triplicate samples. The data presented are representative of three independent experiments.

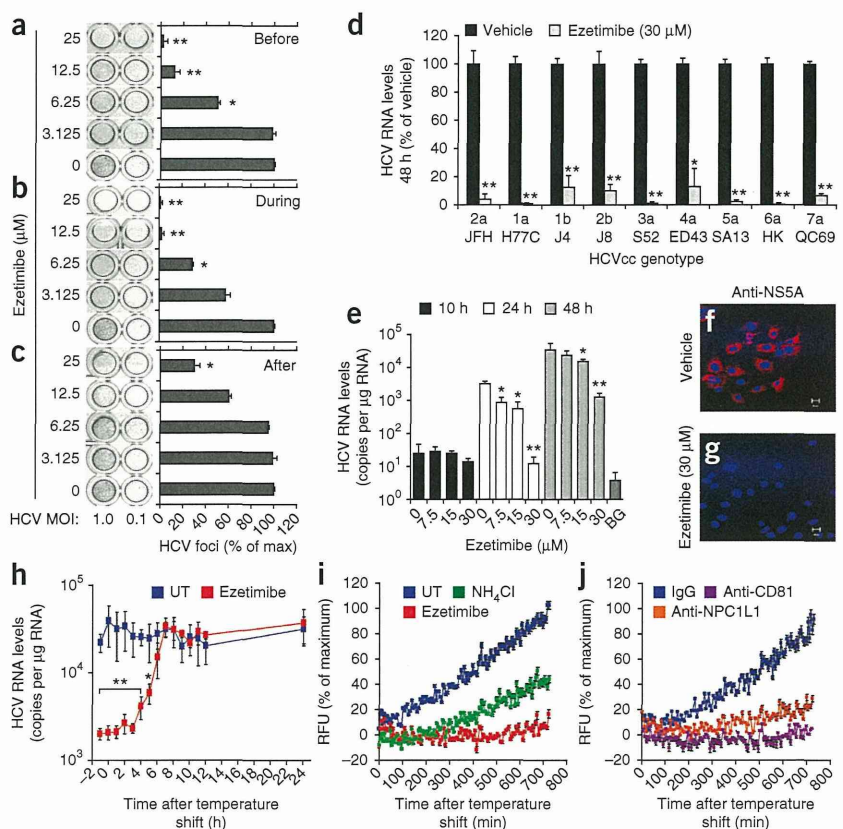
Because siRNA-mediated knockdown of NPC1L1 suggested that HCV infection is inhibited at a step before RNA replication or secretion, we next assessed whether HCV infection was susceptible to inhibition by antibody-mediated blocking of cell surface NPC1L1. Compared to cells treated with irrelevant IgG control antibodies, HCVcc infection, as measured by intracellular HCV RNA levels, was significantly reduced in cells treated with an antibody specific for the known HCV cell entry factor CD81 (Fig. 1f). When we incubated cells with an NPC1L1-specific antibody, HCVcc infection was similarly reduced (Fig. 1f), and the inhibition was HCV specific, as antibody-mediated blocking had no effect on VSVGpp entry (Supplementary Fig. 2b,c). To determine the NPC1L1 domains necessary for HCV entry, we treated cells with antibodies targeting each of the three large extracellular loops (LELs) of NPC1L1 and observed that HCV infection was reduced only when NPC1L1 LEL1, but not LEL2 or LEL3, was blocked (Fig. 1g). Thus, NPC1L1 silencing and antibody-mediated blocking of NPC1L1 LEL1 reduced HCV infection as effectively as targeting other known HCV cell entry factors.

Ezetimibe is a 2-azetidinone-class drug that has been approved by the FDA as a cholesterol-lowering medication¹⁸. As ezetimibe has been shown to be a direct inhibitor of NPC1L1 internalization^{19,20}, we next used this high-affinity, specific pharmacological agent as an alternate means of targeting NPC1L1 before, during or after viral inoculation while additionally evaluating its anti-HCV potential. Specifically, we performed HCVcc foci-reduction assays and quantified foci (that is, clusters of ≥ 5 HCV E2-positive cells) after ezetimibe treatment. Ezetimibe reduced HCVcc foci formation in a dose-dependent manner when present before infection and then removed (Fig. 2a) or only during virus inoculation (Fig. 2b). However, when we added ezetimibe to cells after inoculation (Fig. 2c), the initiation of HCV-positive foci was unaffected, as would be expected for a viral entry inhibitor. Notably, the highest dose of ezetimibe (25 μM) reduced

the size of the HCV-positive foci observed from the typical ≥ 5 HCV E2-positive cells to only 1–3 HCV E2-positive cells per focus, which accounts for the lower number of foci with ≥ 5 HCV E2-positive cells being counted in those cultures, suggesting that NPC1L1 may also affect HCV cell-to-cell spread (data not shown). Dose-responsive, time-of-addition-dependent inhibition of HCV infection was also evident when HCV RNA levels were measured (Supplementary Fig. 6). We additionally observed ezetimibe sensitivity across a panel of HCVcc intergenotypic clones containing the structural regions of diverse HCV genotypes (1–7)²¹ (Fig. 2d). Finally, because NPC1L1 and SR-BI are both involved in cellular cholesterol uptake and SR-BI has been reported to be a rate-limiting HCV cell entry factor²², we overexpressed SR-BI before ezetimibe treatment and found that this overexpression did not overcome the dependence of HCV entry on NPC1L1 (Supplementary Fig. 7). Likewise, we confirmed that the potent antiviral effect of ezetimibe was not due to drug-mediated cytotoxicity (Supplementary Figs. 2d,e and 8a), changes in cell proliferation (Supplementary Fig. 8b), reduced expression of the other known HCV cell surface receptors (Supplementary Fig. 8c–g), inhibition of HCV RNA replication (Supplementary Fig. 9a–c) or inhibition of virus secretion (Supplementary Fig. 9d). Hence, the data support the conclusion that direct pharmacological inhibition of NPC1L1 reduces HCV infection by directly inhibiting viral cell entry.

We next assessed whether ezetimibe inhibits HCVcc binding or a post-binding step by examining cell-associated HCV RNA and protein expression from internalized RNA in vehicle- and ezetimibe-treated HCVcc-infected cultures. At 10 h after infection, a time before detectable HCV RNA replication occurs (Supplementary Fig. 10), ezetimibe did not affect cell-bound HCV RNA levels (Fig. 2e). In contrast, at later time points, HCV RNA levels (Fig. 2e) and *de novo* NS5A protein expression (Fig. 2f,g) were reduced in ezetimibe-treated cultures, suggesting HCV can efficiently bind ezetimibe-treated cells, but a post-binding step is prevented. To further test this hypothesis

Figure 2 Ezetimibe-mediated inhibition of NPC1L1 reduces HCV entry at a post-binding, pre-fusion step. (a–c) Quantification of HCV foci observed in Huh7 cultures treated with vehicle or increasing concentrations of ezetimibe for 6 h before infection and then removed (Before) (a), for 12 h coincident with viral inoculation and then removed (During) (b) or after viral inoculation (After) (c). HCV foci are expressed as a percentage of the foci obtained in vehicle-treated (0 μM) cultures \pm s.d. ($n = 3$). MOI, multiplicity of infection. (d,e) Intracellular HCV RNA levels detected in parallel Huh7 cultures treated with vehicle or the indicated concentrations of ezetimibe beginning 1 h before and during infection with HCVcc containing the structural region of the indicated genotypes (d) or HCVcc JFH-1 (e). Shown are HCV RNA levels, determined by RT-qPCR and normalized to GAPDH, at the indicated times after infection. Results are graphed as a percentage of infection in vehicle-treated cultures or as mean HCV RNA copies per μg total cellular RNA \pm s.d. ($n = 3$). Assay background (BG) is the HCV RNA level detected in uninfected samples. (f,g) Indirect immunofluorescence analysis of HCV NS5A in vehicle-treated (f) and ezetimibe-treated (30 μM) (g) cultures 24 h after infection with HCVcc JFH-1. Scale bars, 20 μm . (h) Intracellular HCV RNA levels detected in synchronized infections performed in parallel Huh7 cultures treated with vehicle or ezetimibe (30 μM) at the indicated times. Shown are HCV RNA levels, determined by RT-qPCR and normalized to GAPDH, 30 h after infection. Results are graphed as mean HCV RNA copies per μg total cellular RNA \pm s.d. ($n = 3$). * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$ for HCV relative to vehicle-treated cultures (one-way ANOVA and Tukey's post-hoc t test). (i,j) HCV fusion, as measured by DiD fluorescence dequenching in Huh7 cells treated with vehicle (UT), NH_4Cl (10 mM), ezetimibe (30 μM), IgG control antibody (36 $\mu\text{g ml}^{-1}$), CD81-specific antibody (anti-CD81, 36 $\mu\text{g ml}^{-1}$), or an antibody to NPC1L1 LEL1 (anti-NPC1L1, 36 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Results are graphed as a percentage of maximum background-corrected relative fluorescence units (RFU) achieved in vehicle-treated or IgG control-treated cultures. All data presented are representative of three independent experiments.



and determine when during the entry process NPC1L1 functions, we assessed the ability of ezetimibe to block HCVcc infection when added at various times after virus binding at 4 $^{\circ}\text{C}$. Ezetimibe retained inhibitory activity after temperature shift to 37 $^{\circ}\text{C}$ for up to 5 h (half-maximal inhibition at 4 h), confirming that NPC1L1 functions after binding, probably late in viral entry (Fig. 2h).

To determine whether ezetimibe acts before fusion, we developed a fluorescence-based HCVcc fusion assay. Specifically, we labeled HCVcc with the hydrophobic fluorophore DiD²³, which incorporates into biological membranes and, at high concentrations, is self-quenching. Upon fusion of viral and target membranes, the DiD fluorophores diffuse away from each other, causing dequenching and allowing for the progression or inhibition of fusion to be measured in real time (Supplementary Fig. 11). Compared to NH_4Cl , an inhibitor of endosomal acidification⁹, ezetimibe more potently inhibited HCVcc^{DiD} fusion, such that by 12 h after binding we measured only ~10% HCVcc^{DiD} dequenching in ezetimibe-treated cultures as compared to vehicle-treated controls (Fig. 2i). Analogously, antibody-mediated inhibition of both CD81 and NPC1L1 also reduced HCVcc^{DiD} fusion (Fig. 2j), indicating that the inhibition observed in ezetimibe-treated wells (Fig. 2i) was not drug specific. We also observed similar results using HCVcc^{DiD} alternatively purified by iodixanol density gradient centrifugation (Supplementary Fig. 12a,b).

As not all viral membrane-incorporated DiD is self-quenched, DiD can also serve as a fluorescent tag to monitor virions during cell entry²⁴. Taking advantage of this, we performed fluorescence microscopy analysis of HCVcc^{DiD}-infected cultures and noted that although we observed little DiD on the surface of vehicle-treated cells, indicative of successful viral entry and fusion, we observed markedly more DiD on the surface of ezetimibe-treated cells (Supplementary Fig. 12c,d). Together with the DiD-fusion data, this indicates that inhibition of NPC1L1 prevents HCVcc cell entry at or before virion-host cell fusion.

Given that antibody-mediated blocking of only NPC1L1 LEL1 (Fig. 1g) reduced HCVcc infection, LEL1 has been shown to bind cholesterol^{20,25} and infectious HCV particles are enriched in cholesterol^{13,26}, we next investigated whether the dependence of HCV cell entry on NPC1L1 might be related to the cholesterol contained within the HCV virions¹³. To address this hypothesis, we used viruses containing the E1/E2 glycoproteins derived from the HCV JFH-1 consensus clone but that differ in their virion-associated cholesterol content and assessed their relative dependence on NPC1L1. Specifically, we found that lentivirus particles pseudotyped with the JFH-1 HCV glycoproteins (HCVpp) contained 94% less cholesterol than the authentic JFH-1 HCVcc particles (HCVcc^{WT}). In contrast, cell culture-adapted HCVcc^{G451R} produced from a JFH-1 viral clone with a G451R point mutation in the viral E2 glycoprotein (HCVcc^{G451R}) contained ~50% more cholesterol than HCVcc^{WT} (Fig. 3a). These cholesterol profiles are consistent with

LETTERS

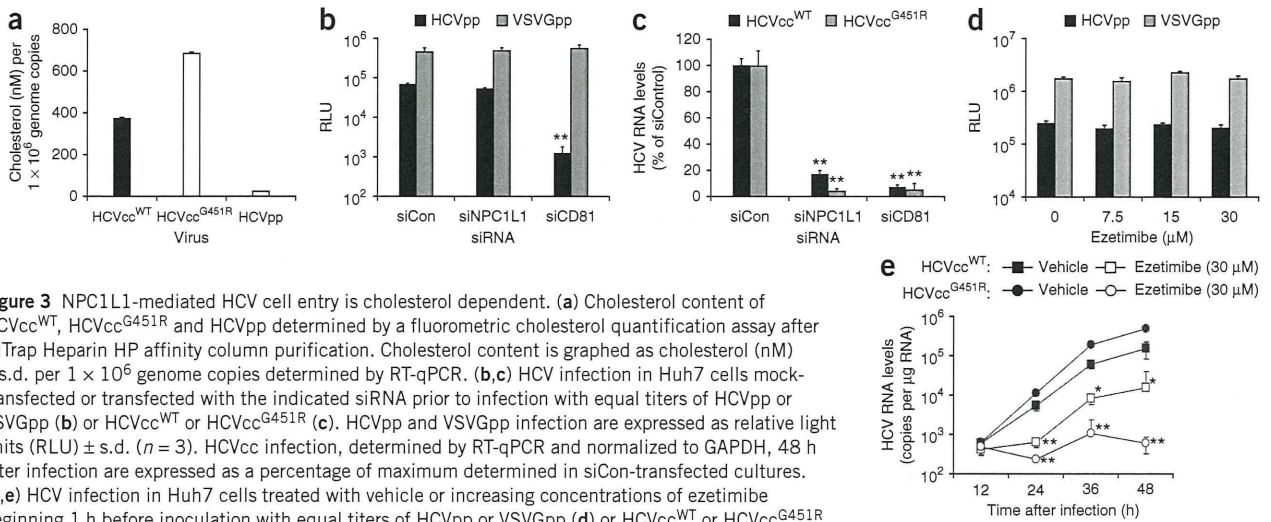


Figure 3 NPC1L1-mediated HCV cell entry is cholesterol dependent. **(a)** Cholesterol content of HCVcc^{WT}, HCVcc^{G451R} and HCVpp determined by a fluorometric cholesterol quantification assay after HiTrap Heparin HP affinity column purification. Cholesterol content is graphed as cholesterol (nM) \pm s.d. per 1×10^6 genome copies determined by RT-qPCR. **(b,c)** HCV infection in Huh7 cells mock-transfected or transfected with the indicated siRNA prior to infection with equal titers of HCVpp or VSVGpp **(b)** or HCVcc^{WT} or HCVcc^{G451R} **(c)**. HCVpp and VSVGpp infection are expressed as relative light units (RLU) \pm s.d. ($n = 3$). HCVcc infection, determined by RT-qPCR and normalized to GAPDH, 48 h after infection are expressed as a percentage of maximum determined in siCon-transfected cultures. **(d,e)** HCV infection in Huh7 cells treated with vehicle or increasing concentrations of ezetimibe beginning 1 h before inoculation with equal titers of HCVpp or VSVGpp **(d)** or HCVcc^{WT} or HCVcc^{G451R} **(e)**. HCVpp and VSVGpp infection are expressed as RLU \pm s.d. ($n = 3$). HCVcc infection, determined by RT-qPCR and normalized to GAPDH, at the indicated times (h) after infection are expressed as mean HCV RNA copies per μ g total cellular RNA \pm s.d. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ for RNA or RLU values relative to siCon-transfected or vehicle-treated cultures (one-way ANOVA and Tukey's post-hoc t test).

the fact that HCVpp is produced from 293T embryonal kidney cells, which do not produce cholesterol-associated lipoproteins²⁷, and are therefore compositionally distinct from HCVcc, whereas HCVcc^{G451R} has a narrower density range with a higher average mean density than the original JFH-1-derived HCVcc^{WT} (ref. 28). As expected, when CD81 was silenced, both HCVpp **(Fig. 3b)** and HCVcc^{G451R} **(Fig. 3c)** cell entry was reduced; however, when NPC1L1 was silenced or inhibited by ezetimibe, the cholesterol-scarce HCVpp showed NPC1L1-independent cell entry and insensitivity to ezetimibe inhibition **(Fig. 3b,d)**. In contrast, the cholesterol-abundant HCVcc^{G451R} showed enhanced NPC1L1-dependent cell entry and hypersensitivity to ezetimibe-mediated inhibition **(Fig. 3c,e)**. Together, these data reveal a correlation between the amount of virion-associated cholesterol and dependence on NPC1L1 for HCV cell entry.

Finally, to assess the involvement of NPC1L1 in HCV cell entry *in vivo*, we evaluated the ability of ezetimibe to inhibit infection of a genotype 1 clinical isolate in a hepatic xenorepopulation model of acute HCV infection²⁹. Specifically, we repopulated urokinase-type plasminogen activator-severe combined immunodeficiency (uPA-SCID) mice with human hepatocytes and treated them via oral gavage with ezetimibe (10 mg per kg body weight per day) or diluent alone for a total of 3 weeks, with treatment beginning 2 weeks, 1 week or 2 d before challenge with HCV genotype 1b positive serum **(Fig. 4a)**.

Ezetimibe treatment delayed the establishment of HCV infection in mice pretreated for 2 weeks before infection **(Fig. 4b, $P = 0.0192$)**, confirming the ability of this drug to inhibit HCV infection *in vivo*. However, when mice were pretreated for only 1 week before infection, ezetimibe was less effective at delaying infection ($P = 0.062$), and it was completely ineffective when treatment was initiated only 2 d before challenge or after infection had been established (data not shown). Specifically, 100% of the nine control diluent-treated mice were serum positive for HCV 1 week after challenge, whereas 71% (five out of seven) and 43% (three out of seven) of mice treated with ezetimibe for 2 weeks and 1 week before infection were HCV negative, respectively **(Fig. 4b,c)**. Although the majority of ezetimibe-treated mice eventually became HCV positive, of the five mice in the 2-week ezetimibe pretreatment group that were HCV negative at week 1, two were completely protected, remaining HCV negative at weeks 2 and 3 after infection (and one mouse died during gavage) **(Supplementary Fig. 13)**. Thus, similar to what was recently reported for another potential HCV entry inhibitor, erlotinib³⁰, ezetimibe was able to delay initial infection *in vivo*. Notably, since NPC1L1 is highly expressed on the apical surface of intestinal enterocytes^{15,16}, a considerable amount of orally administered ezetimibe initially binds to these cells following oral administration³¹. Thus it is plausible that development of alternate non-oral delivery or drug-targeting methods

Figure 4 Ezetimibe delays the establishment of HCV infection in hepatic xenorepopulated mice. **(a)** Schematic diagram of an experiment in which uPA-SCID mice transplanted with human hepatocytes³⁵ were pretreated with diluent alone ($n = 4$ or 5) or ezetimibe (10 mg per kg body weight per day) ($n = 7$), via oral gavage, starting 2 weeks, 1 week or 2 d before infection (indicated by gray bars). The arrow indicates when the mice were intravenously inoculated on day 0 with HCV human serum containing 1.0×10^5 genome copies of HCV genotype 1b and the black bars indicate the time period post-HCV inoculation that treatments were continued. **(b,c)** HCV RNA levels (genome copies per milliliter of serum) 1 week after infection from mice pretreated for 2 weeks **(b)** or 1 week **(c)**. The lower limit of HCV RNA detection is equal to 100 genomic copies per milliliter of serum. A two-tailed Fisher's exact test was performed to compare categorical variables. In all cases, $P < 0.05$ was used to reject the null hypothesis that the distribution of HCV-positive and HCV-negative mice between ezetimibe-treated and nine diluent-treated mice at specific weeks after infection were the same.



might improve transport of ezetimibe to hepatocytes and increase its anti-HCV efficacy. Nevertheless, our finding that ezetimibe can delay the establishment of HCV genotype 1 infection in mice confirms the involvement of NPC1L1 in HCV infection *in vivo* and highlights the therapeutic potential of further pursuing the refinement or development of anti-NPC1L1 therapies³² for the treatment of HCV.

Here we have shown that NPC1L1 is an HCV cell entry factor that functions after binding, at or before fusion. These findings, together with the facts that NPC1L1 is a cellular cholesterol receptor, the HCV particle is enriched in cholesterol, and relative dependence on NPC1L1 is correlated with HCV particle cholesterol levels, support and expand upon previous reports suggesting that virion cholesterol is involved in HCV cell entry^{13,14,26}. Whether NPC1L1 directly interacts with HCV or indirectly participates in HCV entry by removing virion-associated cholesterol to perhaps reveal protected viral glycoprotein binding sites or confer a required conformational change remains to be determined. Lastly, as NPC1L1 is expressed only on human and primate hepatocytes^{33,34}, this discovery additionally highlights NPC1L1 as a potential HCV tropism determinant, which may facilitate the future development of a small-animal model of HCV infection.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank T. Wakita (National Institute of Infectious Diseases, Japan) for JFH1-based plasmids, F. Chisari (The Scripps Research Institute) for Huh7 cells, J. Buhk (Copenhagen University Hospital Hepatitis C Program) for JFH1-based intergenotypic HCV clones, Y. Ioannou (Mount Sinai School of Medicine) for the antibody (Bsn4052) against NPC1L1, D. Burton and M. Law (The Scripps Research Institute) for the antibody (C1) against the HCV glycoprotein E2 and C. Rice (The Rockefeller Institute) for the antibody (E910) against the HCV nonstructural protein NS5A. We would also like to thank P. Corcoran for outstanding technical assistance, H. Dahari for assistance with statistical analyses and T. Layden and S. Cotler for editing the manuscript. We also thank J. Graves of the University of Illinois at Chicago (UIC) Research Resources Center Flow Cytometry laboratory and K. Ma of the UIC Research Resources Center Confocal Microscopy laboratory for technical assistance. This work was supported by the US National Institutes of Health Public Health Service grants R01-AI070827 and R03-AI085226 (S.L.U.), the American Cancer Society Research Scholar Grant RSG-09-076-01 (S.L.U.), the UIC Center for Clinical and Translational Science NIH grant UL1RR029879, the UIC Council to Support Gastrointestinal and Liver Disease and a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology-Japan, Ministry of Health, Labour and Welfare-Japan (K.C.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

B.S. made the initial discovery. B.S. and S.L.U. designed the project, analyzed the results and wrote the manuscript. B.S., N.B., D.N.M., S.H., K.A.M. and X.Y. performed experimental work. B.S., S.L.U., M.I. and K.C. designed the hepatic xenorepopulation mouse experiments, and N.H. performed the *in vivo* studies. W.A.A. was involved in the initial conception of the project and provided valuable expertise.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare competing financial interests: details accompany the full-text HTML version of the paper at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Uprichard, S.L. Hepatitis C virus experimental model systems and antiviral drug research. *Viral. Sin.* **25**, 227–245 (2010).
- Gupta, E.K. & Ito, M.K. Ezetimibe: the first in a novel class of selective cholesterol-uptake inhibitors. *Heart Dis.* **4**, 399–409 (2002).
- Garcia-Calvo, M. *et al.* The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8132–8137 (2005).
- Pileri, P. *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938–941 (1998).
- Scarselli, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017–5025 (2002).
- Evans, M.J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805 (2007).
- Ploss, A. *et al.* Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* **457**, 882–886 (2009).
- Liu, S. *et al.* Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* **83**, 2011–2014 (2009).
- Tscherne, D.M. *et al.* Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J. Virol.* **80**, 1734–1741 (2006).
- Meertens, L., Bertaux, C. & Dragic, T. Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles. *J. Virol.* **80**, 11571–11578 (2006).
- Huang, H. *et al.* Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 5848–5853 (2007).
- Gastaminza, P. *et al.* Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* **82**, 2120–2129 (2008).
- Aizaki, H. *et al.* Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **82**, 5715–5724 (2008).
- Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T., McKeating, J.A. & Chisari, F.V. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J. Virol.* **81**, 374–383 (2007).
- Yu, L. The structure and function of Niemann-Pick C1-like 1 protein. *Curr. Opin. Lipidol.* **19**, 263–269 (2008).
- Altmann, S.W. *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* **303**, 1201–1204 (2004).
- Sané, A.T. *et al.* Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J. Lipid Res.* **47**, 2112–2120 (2006).
- Bays, H.E., Neff, D., Tomassini, J.E. & Tershakovec, A.M. Ezetimibe: cholesterol lowering and beyond. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **6**, 447–470 (2008).
- Chang, T.Y. & Chang, C. Ezetimibe blocks internalization of the NPC1L1/cholesterol complex. *Cell Metab.* **7**, 469–471 (2008).
- Weinglass, A.B. *et al.* Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 11140–11145 (2008).
- Gottwein, J.M. *et al.* Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1–7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **49**, 364–377 (2009).
- Grove, J. *et al.* Scavenger receptor BI and BII expression levels modulate hepatitis C virus infectivity. *J. Virol.* **81**, 3162–3169 (2007).
- Zaitseva, E., Yang, S.T., Melikov, K., Pourmal, S. & Chernomordik, L.V. Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids. *PLoS Pathog.* **6**, e1001131 (2010).
- Coller, K.E. *et al.* RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog.* **5**, e1000702 (2009).
- Zhang, J.H. *et al.* The N-terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake. *J. Biol. Chem.* **286**, 25088–25097 (2011).
- Yamamoto, M. *et al.* Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* **92**, 2082–2087 (2011).
- Farquhar, M.J. & McKeating, J.A. Primary hepatocytes as targets for hepatitis C virus replication. *J. Viral Hepat.* **15**, 849–854 (2008).
- Zhong, J. *et al.* Persistent hepatitis C virus infection in vitro: coevolution of virus and host. *J. Virol.* **80**, 11082–11093 (2006).
- Kneteman, N.M. & Toso, C. *In vivo* study of HCV in mice with chimeric human livers. *Methods Mol. Biol.* **510**, 383–399 (2009).
- Lupberger, J. *et al.* EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nat. Med.* **17**, 589–595 (2011).
- Sweeney, M.E. & Johnson, R.R. Ezetimibe: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **3**, 441–450 (2007).
- Bettters, J.L. & Yu, L. Transporters as drug targets: discovery and development of NPC1L1 inhibitors. *Clin. Pharmacol. Ther.* **87**, 117–121 (2010).
- Davies, J.P., Scott, C., Oishi, K., Liapis, A. & Ioannou, Y.A. Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* **280**, 12710–12720 (2005).
- Davis, H.R. Jr. *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J. Biol. Chem.* **279**, 33586–33592 (2004).
- Matsumura, T. *et al.* Amphiphilic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* **137**, 673–681 (2009).