

維化細胞に変化するが、その際に肝細胞が産生する TGFbeta が星細胞のコラーゲン遺伝子を活性化すると考えられている。HCV 感染細胞を取り巻く環境がウイルスの増殖を制御している可能性が考えられるために、これまでに予備的解析から HCV 感染細胞と星細胞を混合培養した場合に、サイトカイン産生を介したクロストークが見られたので、以下の研究方法でその詳細を明らかにした。

- (1) HCV 感染細胞、あるいは HCV ゲノム自立複製細胞を肝星細胞と混合培養して得られるサイトカイン産生の変化を調べ、そのサイトカインを同定した。実験には HCV 感染 JFH1 細胞、樹立肝星細胞である LX2 および Li90 を用いた。
- (2) 変化が見られた場合、それが何に起因するかを解析して原因を明らかにした。生理活性を示すか否かについても調べた。
- (3) HCV 感染細胞およびレプリコン自立複製細胞を用いて同様の実験を行った。レプリコン細胞としては HCV1b 型ゲノムに由来する NNC、JFH1 サブゲノムレプリコン細胞等を用いた。

(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) JFH1/HuH7 と LX2 の混合培養により培地中に MIP-1beta を誘導

した。

両細胞を混合培養する事により培養液中に MIP-1beta が放出された。次に、それぞれの細胞の培養上清液を相手の細胞に添加した場合の MIP-1beta 産生を調べたところ、LX2 細胞の培養上清を JFH1/HuH7 に添加したときに MIP-1beta 産生が観察され、JFH1/HuH7 の上清を LX2 に添加しても産生増加は見られなかった。

- (2) 培養上清に産生される MIP-1beta は CCR5 陽性細胞の遊走を高めた。

MIP-1beta は CCR5 のリガンドとして働く。従って、CCR5 を発現している細胞障害性 T 細胞の誘引因子としても働く。実際に CCR5 を産生する細胞に対する遊走実験を行ったところ、混合培養した上清に誘引作用のある事が分かった。

- (3) LX2 が産生する IL-1alpha が JFH1/HuH7 に働き MIP-1beta 産生を上げる。

LX2 培養上清を分子篩にかけ、MIP-1beta 産生を上げる画分をサイトカインアレイ解析する事により、IL-1alpha が MIP-1beta 産生を誘導する事が分かった。

- (4) 星肝細胞を TGFbeta 処理すると IL-1alpha 産生が高まり、その結果混合培養により MIP-1beta 産生が増加した。

星肝細胞の活性化と IL-1alpha 産生との関連性を調べるために、TGFbeta 処理 LX2 細胞の

IL-1alpha 産生を調べた。その結果、TGFbeta 用量依存的に IL-1alpha の産生が高くなった。

- (5) HCV レプリコン細胞では LX2 と混合培養しても MIP-1beta 産生増加は観察されない。

HCV 感染細胞と LX2 との混合培養で MIP-1beta 産生が上がる際に、HCV がどのような役割を果たしているかを調べるために、レプリコン細胞と LX2 との混合培養を行い MIP-1beta の産生増加を調べた。しかし、この条件では MIP-1beta の産生増加は観察されなかった。

D. 考察

HCV 産生は宿主の種々の要因で制御されている。ウイルス複製に直接正に働く因子や、抑制的に働く因子の存在が明らかにされており、それらの因子の細胞内量の違いによりウイルス産生は異なる。このような事は IFN 量の違いにより一方、感染細胞を取り囲む環境もウイルス産生には大きな要因になる。本研究では、肝細胞が他の細胞と共存する状況の肝組織において HCV 感染細胞が周辺細胞とのクロストークを介してどのような増殖様式をとるかを明らかにすることが、ウイルスの持続感染性との関連で重要である。肝実質細胞と相互作用する細胞の一つである肝星細胞を混合培養したところ、HCV 感染細胞から MIP-1beta の産生が観察された。MIP-1beta は CCR5 を発現している細胞障害性 T 細胞を誘引

する働きがある。これらのことから、肝星細胞の働きにより HCV 感染細胞周辺に細胞障害性 T 細胞が引き寄せられ、感染細胞を破壊する可能性が考えられる。そのことにより、ウイルス産生が抑制される結果になると考えられる。実際にこのようなことが生体で観察されるかについては、動物モデル実験などでの検証が必要である。

E. 結論

HCV 感染肝細胞を肝星細胞と混合培養することにより、感染細胞から MIP1beta が産生されることが分かった。本サイトカインは細胞障害性 T 細胞の誘因作用があるので、感染細胞が攻撃を受け炎症が高くなること、またウイルスの産生も抑制されることが示唆される。ウイルス産生制御には感染細胞を取りまく環境についての理解も重要である事が分かった。

F. 研究発表

論文発表

1. Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1820(12):1886-1892, 2012
2. Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C

virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. PLoS Pathog. 8(8):e1002860, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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）
分担研究報告書

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、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) の有効性を報告してきた。本年度は、上記症例のゲノム解析 (IL28B-SNIP) を施行することでステロイドフリー免疫抑制法と LDIR therapy の有効性との関係について検討した。その結果、ステロイドフリー免疫抑制法は早期の HCV 再発を抑制していたが、HCV に対する抗ウイルス療法の効果については、IL28B-SNIP の結果と有意に相関しており、プロトコールとの関係は明らかではなかった。

【研究協力者】

永野浩昭 (大阪大学大学院医学系研究科
消化器外科 准教授)
和田浩志 (大阪大学大学院医学系研究科
消化器外科 助教)
濱 直樹 (大阪大学大学院医学系研究科
消化器外科 助教)

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。

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

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 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. Marubashi S, Mori M, et al. Once-daily prolonged-release tacrolimus in de novo liver transplantation: a single center cohort study. *Hepatogastroenterology* 59(116):1184-1188, 2012
2. Kim C, Mori M, et al. Significance of alanine aminopeptidase N (APN) in bile in the diagnosis of acute cellular rejection after liver transplantation. *J Surg Res* 175(1):138-148, 2012
3. Asaoka T, Mori M, et al. Intra-graft transcriptome level of CXCL9 as biomarker of acute cellular rejection after liver transplantation. *J Surg Res* 178(2):1003-1114, 2012

[学会発表]

1. Hama N, Mori M, et al. Perioheral Blood Marker for Acute Cellular Rejection in Liver Transplantation. 9th Korea-Japan Transplantation Forum. 2012/10, Incheon,

- Korea.
2. 森正樹,他. マージナルドナー利用の現状と展望. 第48回日本移植学会総会, 2012/9, 愛知.
 3. 丸橋繁, 森正樹,他. 成人間生体肝移植における血管, 胆管合併症軽減の工夫と成績. 第112回日本外科学会定期学術集会, 2012/4, 千葉.
 4. 丸橋繁, 森正樹,他. 腹腔鏡補助下肝ドナー手術の工夫と成績. 第24回日本肝胆膵外科学会・学術集会, 2012/5, 大阪.
 5. 丸橋繁, 森正樹,他. 肝細胞癌に対する肝移植における再発予測と成績. 第48回日本肝癌研究会, 2012/7, 石川.
 6. 丸橋繁, 森正樹,他. 生体肝移植ドナー手術における腹腔鏡手技の導入とその成績. 第67回日本消化器外科学会総会, 2012/7, 富山.
 7. 小林省吾, 森正樹,他. 臓器移植法改正前後における脳死肝移植症例の検討. 第16回日本肝臓学会大会, 2012/10, 兵庫.
 8. 小林省吾, 森正樹,他. 教室における脳死肝移植症例の検討. 第30回日本肝移植研究会, 2012/6, 福岡.
 9. 小林省吾, 森正樹,他. 教室における肝容積の評価と過小グラフトのレシピエントの術後経過への影響. 第48回日本移植学会総会, 2012/9, 愛知.
 10. 小林省吾, 森正樹,他. 肝移植後におけるHCVウイルスの再感染予防への取り組み. 第48回日本肝臓学会総会, 2012/6, 石川.
 11. 濱直樹, 森正樹,他. 生体肝移植におけるリンパ球クロスマッチの臨床的意義. 第48回日本移植学会総会, 2012/9, 愛知.
 12. 濱直樹, 森正樹,他. 生体部分肝移植における門脈圧亢進のおよぼす影響. 第19回日本門脈圧亢進症学会, 2012/9, 東京.
 13. 濱直樹, 森正樹,他. 肝肺症候群合併肝疾患に対する肝移植. 第14回日本肝不全治療研究会, 2012/9, 東京.
 14. 和田浩志, 森正樹,他. HCV陽性肝移植症例に対する肝炎再発予防に対する取り組みと抗ウイルス治療効果. 第30回日本肝移植研究会, 2012/6, 福岡.
 15. 和田浩志, 森正樹,他. IL28B遺伝子多型による肝移植後HCV抗ウイルス治療の効果予測. 第48回日本移植学会総会, 2012/9, 愛知.
 16. 門田和之, 森正樹,他. 抗HLA抗体陽性肝移植の1例. 第30回日本肝移植研究会, 2012/6, 福岡.
 17. 門田和之, 森正樹,他. 脳死肝移植術を施行した肝肺症候群を伴った胆道閉鎖症の1例. 第48回日本移植学会総会, 2012/9, 愛知.
 18. 中島慎介, 森正樹,他. 胆嚢管を利用し胆道再建した成人生体肝移植の1例. 第30回日本肝移植研究会, 2012/6, 福岡.
 19. 大久保恵太, 森正樹,他. 教室におけるドナー肝容積に関する検討. 第30回日本肝移植研究会, 2012/6, 福岡.
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
(予定を含む)
該当なし

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）

分担研究報告書

C 型肝炎再発抑制を目的とした肝移植術中二重濾過血漿交換療法 (DFPP) による C 型肝炎ウイルス除去療法とドナー肝臓内リンパ球を用いた術後抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 補助免疫療法の併用療法の試み

研究分担者 大段 秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨

肝移植後の C 型肝炎ウイルス再感染および肝炎再発は、肝移植患者の予後および術後 QOL を悪化させる大きな要因であり、術後早期の抗 C 型肝炎ウイルス療法により移植後 HCV 肝炎の再発・進行を有効に制御できれば、移植後の予後を著しく改善し得る可能性がある。我々は、癌合併肝硬変患者に対する肝移植術後再発予防補助療法としてドナー肝由来リンパ球（肝 NK 細胞）移入を行なっているが、その内術前 HCV 陽性肝硬変症例で、肝由来リンパ球移入後に著明な血清 HCV RNA 量の減少あるいは消失を認めた。さらに肝由来リンパ球移入による抗 C 型肝炎ウイルス効果は人 HCV ウイルスを感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いた動物実験でも確認された。前述の肝由来リンパ球移入による抗 C 型肝炎ウイルス効果は術前血中 HCV RNA 量が低い症例ほど高かったことより、肝由来リンパ球移入による肝移植術後 HCV 再発抑制効果を十分に得るためには、術前あるいは術中の HCV 量を低下させることが必要と考えられた。これらの知見を基礎として、肝移植手術 3 病日前及び肝移植術中に DFPP によるウイルス除去療法を行い、術後ドナー肝由来リンパ球を移入する補助免疫療法の併用療法を臨床試験として開始した（広島大学病院臨床研究許可番号 第 40051-1、UMIN000008754）。肝移植手術 3 病日前の DFPP 施行では安全性確認（Phase I）を行い、肝移植手術中は DFPP 施行による安全性と有効性を検討した（Phase I/II）。さらに 3 病日後にドナー肝由来リンパ球を移入による術後補助免疫療法を行い、血中 HCV RNA 量を検討した。2012 年 8 月より現在まで 2 例の HCV 陽性肝硬変患者に実施し、術前および術中の DFPP に明らかに起因する有害事象は認めなかった。術直後の HCV RNA 量は 2 例目では検出感度以下を達成したが、1 例目 2 例目ともに術後血中 HCV RNA は再検出され、再感染を確認した。しかし、最近の HCV 陽性肝移植患者 10 例の術前および術後 2 週間の HCV RNA 量推移の比較では、補助療法を行わなかった 8 例全例で術後 2 週間値が術前値を大きく超えていた（平均 5.34→6.58logIU/ml）のに対し、補助療法を行った 2 例ではいずれも術前値以下に抑制されていた（6.7→6.2、3.9→3.0logIU/ml）。このことより、本補助療法は少なくとも短期的には免疫抑制下での術後 HCV 再感染および増殖を抑制する傾向があると考えられた。今後症例を蓄積し、本補助療法の有効性と IL-28 genotype の関連などを検討していく必要があると考えられる。

A. 研究目的

C 型肝硬変症例に対する肝移植の問題点は、肝移植後の C 型肝炎の再発である。肝移植術後の C 型肝炎ウイルスの出現はほぼ必発であり、さらに肝炎再発は graft loss の重要な要因の一つである。肝炎再発が早いほど患者生存率は不良で、全体では 5 年以内に 20~30% のレシピエントが肝硬変に至るとされる。肝移植術後 C 型肝炎再感染対策としては、大きく予防的治療と再発後治療に分けられる。いずれも (Peg) IFN+ ribavirin 療法が標準治療であるが、肝移植術後はステロイド使用やウイルス量が多い、免疫抑制剤を使用しているなどの理由により、通常の C 型肝炎症例に比べ奏効率は低い。C 型肝炎再感染抑制に対しては、対策が無い現状である。最近我々は、肝臓内の自然免疫応答を司るリンパ球の一種である Natural Killer (NK)細胞を肝臓移植時に採取、活性化することで強い抗腫瘍活性を誘導することに成功し、肝癌症例に対する肝移植後の癌再発予防を目的としたドナー肝臓内リンパ球を用いた術後補助免疫療法を広島大学医学部倫理委員会の承認のもと (第 414 号)、2006 年 1 月より臨床導入した (図 1)。2011 年 4 月までに施行した 25 例の検討で、術前 HCV 陽性肝硬変症例であった 13 例中 10 例では、活性化肝由来リンパ球移入後に著明な血清 HCV RNA 量の減少を

認めた (図 2)。

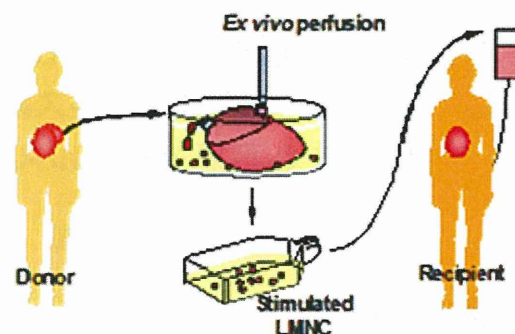


図 1. ドナー肝臓内リンパ球を用いた術後補助免疫療法シエーマ

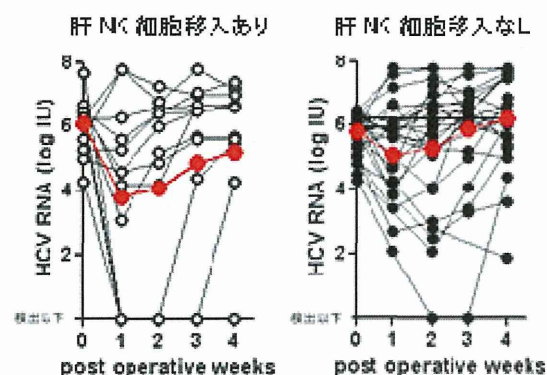


図 2. 肝移植術後血清 HCV-RNA の推移 (赤丸は平均値)

2 例は術後血中 HCV RNA 陰性が続き、IFN+ribavirin 療法を導入後も陰性状態が維持された。これに対し、活性化ドナー肝 NK 細胞移入を行わなかった術前 HCV 陽性肝硬変症例では、30 例中全症例で術後 4 週の時点での血清 HCV RNA 量は術前と同等レベルであり、血中 HCV RNA が陰性化した症例は存在しなかった。さらに活性化ヒト肝 NK 細

胞の抗 HCV 効果を HCV replicon 細胞または HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vitro* および *in vivo* 実験にて確認した。これらの結果より、NK 細胞を主体とした肝由来リンパ球には抗 HCV 効果があることが示唆された。しかし、ドナー肝臓内リンパ球を用いた術後補助免疫療法（抗 HCV 療法）では血中の HCV RNA 量を減少できたものの、全例に陰性化できるまでは至らなかった。このことは抗 HCV 療法前に出来るだけ血中 HCV RNA 量を強制的に減少する必要があると考えられ、物理的に血中から HCV RNA を除去できる二重濾過血漿交換療法 (Double filtration plasmapheresis : DFPP) の術中併用が最適と考えられた。しかし、従来の DFPP はフィブリノーゲン損失率が高く (37.5%) 肝移植での使用には適さないため、今回ウイルス除去率を保持したままフィブリノーゲン除去率が従来膜より低い新膜を開発した。肝移植術中に DFPP を施行することによって、HCV RNA 量を検出限界以下にまで低下させ、さらに抗 HCV 療法を行うことで、再感染を抑制することを目的とした自主臨床研究を開始した。

B. 研究方法

肝移植中のウイルス除去目的に DFPP 使用を行う場合、従来品（カスケードフロー EC-50W など）では、前述したと

おり、フィブリノーゲンの損失が問題となる。そこで、旭メディカル株式会社に、①フィブリノーゲン除去量が少ない、②従来品と同等のウイルス除去能を持つ、③生物学的安全性を担保する、新たな DFPP 二次膜の開発・提供を依頼した。検討の結果、タンパク損失が少なく、医療機器として実績のあるセルロース膜を組み込んだ二次膜を用いて DFPP 膜を開発した。

本機器は ISO10993 に基づく生物学的安全性試験（細胞毒性試験、皮内反応性試験、感作性試験、急性毒性試験、発熱性物質試験、血液適合性（補体系）試験）およびその他安全性試験、において特定の問題を認めなかった。すべて医療機器 GLP 施設で実施し、試験結果の信頼性は担保されている。抗凝固剤使用下での大動物（ブタ）を用いた体外循環試験でも副作用や使用上の不具合は認められず、9 時間の体外循環を安全・安定に施行できた。また性能面においてもフィブリノーゲン損失率 15% 以下、従来品と同等の膜前後のウイルス除去能を確認した。

以上の結果をもって、臨床試験を計画し、広島大学倫理委員会承認を得た

肝移植手術 3 病日前の DFPP 施行では安全性確認 (Phase I) を行い、肝移植手術中は DFPP 施行による安全性と有効性を検討した (Phase I/II) (図 3)。さらに 3 病日後にドナー肝由来リンパ球

を移入による術後補助免疫療法を行い、血中 HCV RNA 量を検討した (図 4)。

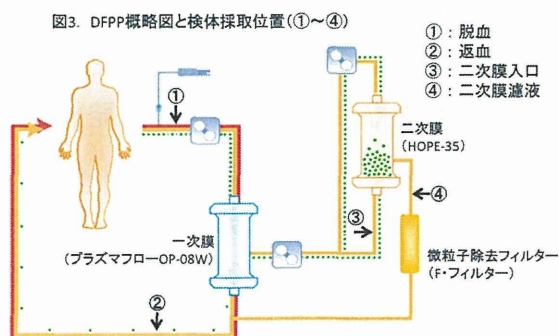


図 4



(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。また本研究に用いられた DFPP 二次膜の提供および臨床研究は「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年厚生労働省告示第 415 号) および「臨床研究において用いられる未承認医療機器の提供等に係る薬事法の適用について」(平成 22 年薬食発 0331 第 7 号) など該当指針に基づき、厚生省担当部署の助言のもと計画され、広島大学倫理委員会承認を得た上で、公開データベースに登録した。(広島大学病院臨床研究許可番号 第 40051-1、UMIN000008754)。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、十分な理解を得

た上で、希望をする患者に対し書類での同意を得た。

C. 研究結果

1. 治療成績

2012 年 8 月より現在まで 2 例の HCV 陽性肝硬変患者に実施し、術前および術中の DFPP に明らかに起因する有害事象は認めなかった。術直後の HCV RNA 量は 2 例目では検出感度以下を達成したが、1 例目 2 例目ともに術後血中 HCV RNA は再検出され、再感染を確認した (表 1)。

	症例1	症例2
年齢、性別	65才、女性	49才、男性
体重	35.7kg	80kg
ヘマトクリット	27.9%	22.1%
治療歴	PEG-IFN/RBV無効	PEG-IFN/RBV無効
術前ウイルスサブタイプ・量 (4病日前DFPP開始時)	1b, 6.4Log	1b, 3.9Log
4病日前	DFPP施行時間	4時間
手術	手術時間	13時間
	DFPP施行時間	13時間
	血漿処理量	23L
手術終了時HCV量 (log/ml)	N/A	< 1.2 (検出限界以下)
3病日目 (活性化リンパ球移入前) HCV量 (log/ml)	4.5	2.6
術2週間後HCV量 (log/ml)	6.2	3.0
術4週間後HCV量 (log/ml)	6.9	4.0

第二症例目での術中の HCV 経過を図 5 に示す。無肝期前には DFPP により 2log/ml 前後の HCV 除去を認めたが、検出以下までは至らなかった。無肝期後は手術終了までに血中 HCV 量は随時低下し、手術終了時には血中 HCV-RNA 量は 1.2log/ml 以下の検出限界以下を達成した。しかしながら、第 3 病日・肝由来活性化リンパ球移入を行う前には血中に 2.6log/ml の

HCV-RNA を認め、HCV の再増殖を認めた。

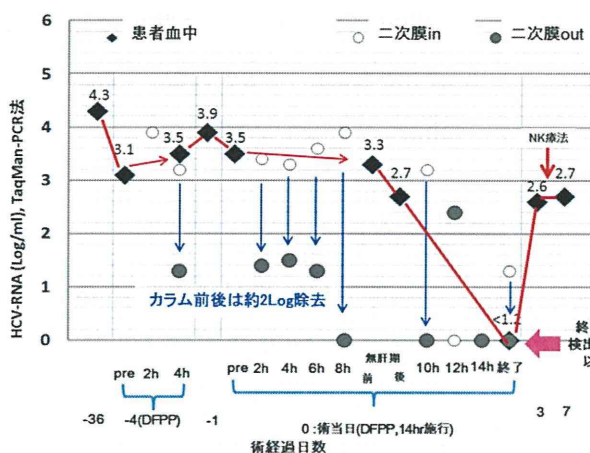


図5. 第二症例目の術中・術後HCVウイルス量変化

しかし、最近の HCV 陽性肝移植患者との術前および術後 2 週間の HCV RNA 量推移の比較では、補助療法を行わなかった 8 例全例で術後 2 週間値が術前値を大きく超えていた(平均 $5.34 \pm 0.41 \rightarrow 6.58 \pm 0.63 \text{ logIU/ml}$) のに対し、補助療法を行った 2 例ではいずれも術前値以下に抑制されていた ($6.7 \rightarrow 6.2$, $3.9 \rightarrow 3.0 \text{ logIU/ml}$)。

このことより、本補助療法は少なくとも短期的には免疫抑制下での術後 HCV 再感染および増殖を抑制する傾向があると考えられた。

D. 考察および結論

C 型肝炎関連疾患に対する肝移植後の C 型肝炎ウイルス再感染および肝炎再発は、肝移植患者の予後および術後 QOL を悪化させる大きな要因である。

術後早期の抗 C 型肝炎ウイルス療法により移植後 HCV 肝炎の再発・進行を有効に制御できれば、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。本研究では、新規開発 DFPP 二次膜は術中 HCV を安全に除去する能力を保持し、特に無肝期以降は血中 HCV を検出下限以下にまで除去可能であることが示された。しかしこれまでに本療法を行った二例とも最終的に HCV 再感染を認めている。本療法を行った二症例では行わなかった症例と異なり、術後早期の血中 HCV 量は術前値より低値に抑えられていた事より、本療法は抗 HCV 治療として有効と考えられるが、第二症例目の術中・術後経過が示すように、術終了時に血中 HCV 量の検出限界以下を達成しながら、比較的早期、免疫療法開始前に血中 HCV-RNA の再検出を認めていることから、HCV を除去するだけでなく、グラフト肝を感染から防御するさらなる対策が必要と考える。また、抗 HCV 免疫療法では NK 細胞の放出する IFN- γ が抗ウイルス作用に重要な役割を示すことから、今後症例を蓄積し、本補助療法の有効性とレシピエント・ドナーの IL-28 genotype の関連などを検討していく必要があると考えられる。

E. 研究発表

[論文発表]

1. 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. Interleukin-28B single nucleotide polymorphism of donors and recipients can predict viral response to pegylated interferon/ribavirin therapy in patients with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol.* Sep;27(9) 1467-72, 2012
2. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology.* 56(2) 555-66, 2012
 3. Kawaoka T, Hiraga N, Takahashi S, Takaki S, Tsuge M, Nagaoki Y, Hashimoto Y, Katamura Y, Miki D, Hiramatsu A, Waki K, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. Achievement of Sustained Viral Response after Switching Treatment from Pegylated Interferon α -2b to α -2a and Ribavirin in Patients with Recurrence of Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection after Liver Transplantation: A Case Report. *Intervirology* 55(4) 306-10, 2012
 4. Morooka Y, Umeshita K, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Yamamoto M, Shimamura T, Oshita A, Kanno K, Ohdan H, Kawagishi N, Satomi S, Ogawa K, Hagiwara K, Nagano H. Reliability and validity of a new living liver donor quality of life scale. *Surg Today* Jan 17 Epub ahead of print, 2013
- [学会発表]**
1. Tanaka Y, Ohdan H. Novel Immune Regulatory Strategy with Combined Anti-IL-2R α and Anti-IL-6R mAbs Therapy To Prevent T-Cell Alloimmune Responses. American Transplantation Congress, Boston, USA, 2012.6.2-6
 2. Matsuura T, Nishida S, Ohira M, Hibi T, Uchida K, Dohi T, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Tryphonopoulos P, Ruiz P, Wepler D, Khan A, Linetsky E, Ricordi C, Ohdan H, Tzakis A.G. Liver Grafts Contain a Large Number of CD52 Negative Natural Killer Cells: Role for Infections after Liver Transplantation with Alemtuzumab Induction. 24th International congress of the transplantation society, Berlin, Germany, 2012.7.15-19
 3. 大段秀樹. 免疫モニタリングに基づく臓器移植後免疫抑制の最適化. 第 48 回日本移植学会総会, 名古屋, 2012.9.20-22
 4. 尾上隆司, 井手健太郎, 石山宏平, 小林剛, 天野尋暢, 田澤宏文, 田中友加, 五十嵐友香, 森涼子, 菅野啓子, 田代

裕尊, 大段秀樹. 当院における臓器移植法改正後の脳死肝移植登録の状況と脳死肝移植の経験. 第 48 回日本移植学会総会, 名古屋, 2012.9.20-22

5. 寺岡義布史, 大段秀樹. Salvage transplantation の安全性と長期予後の検討. 第 30 回日本肝移植研究会, 福岡 2012.6.14-15

6. 森本博司, 大段秀樹. C 型肝炎に対する肝移植における同時性脾摘術とその予後. 第 30 回日本肝移植研究会, 福岡, 2012.6.14-15

7. 大段秀樹. From Bed to Bench and Back: 肝局在免疫細胞の特殊性の解明と臨床応用. 第 97 回日本消化器病学会中国支部例会, 広島, 2012.5.26

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 生体肝移植後のレシピエントを含めた Genotype 1 型のC型肝炎患者では、IL28B 遺伝子多型（SNP）がマイナーアレル型の場合には Peg-Interferon/Ribavirin (Peg-IFN/RBV) 療法に抵抗性である。
 - ② IL28B SNP でマイナーアレル型では、もともと肝内の Interferon stimulated genes (ISGs) の発現が高く、Peg-IFN/RBV 療法を行っても肝内の ISGs の上昇は認められない。即ち、もともと ISGs の発現が高い症例は Peg-IFN/RBV 療法に抵抗性である。
 - ③ 一方、IL28B SNP メジャーアレル型では、Peg-IFN/RBV 治療により肝内の ISGs の有意な上昇が認められた。また、メジャーアレル型では IFN β ではなくて、IFN λ 2/3 が ISGs の発現を制御している可能性が示唆された。
- 今後の課題：IL28B SNP マイナーアレル型では Peg-IFN/RBV 療法を行っても肝内の ISGs の上昇は認められないが、その理由を明らかにするため、肝生検組織を用いてレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション（MCD）法にて肝小葉と門脈域の遺伝子発現を解析する。マイナーアレル型で IFN- λ 4 の発現が報告されたが、我々も、マイナーアレル型で ISGs を誘導するものの HCV の複製をむしろ増強させる液性因子を同定した。今後、この液性因子の解析を進めるとともに、IFN 治療抵抗性への関与を評価する。

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 (SNP) (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 SNP と IFN 治療抵抗性の機構解明を行うことを目的に、本研究を開始した。その一端として、IL28B SNP とその下流の Interferon stimulated genes (ISGs) について検討を行っている。

B. 研究方法

- ① C 型肝炎患者の肝臓内の ISGs に注目して IL28B 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う。
- 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 SNP と IFN の治療効果との関係について検討を行う。

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 SNP 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 SNP マイナーアレルを有する症例は、メジャーアレル症例に比べて肝内の ISGs の発現が高いと同時に、インターフェロン α シグナルがより強く発現し、Wnt シグナルがアップし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 は肝移植後の拒絶に関与するため、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 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。

② 生体肝移植後 HCV 再感染例におけるレシピエントの IL28B SNP、肝内 ISGs と IFN の治療効果との関係について検討を行った。肝移植後の C 型肝炎再発に対する Peg-IFN/RBV 併用療法の治療反応性と IL28B SNP との関連では、IL28B SNP メジャーアレル型では SVR 率が有意に高いことが示されているため、当科における生体肝移植後 HCV 再発症例におけるレシピエントの IL28B SNP と Peg-IFN/RBV 療法の治療成績について検討した。その結果、当科における C 型肝炎生体肝移植後 HCV 再感染症例においては、IL-28B SNP メジャーアレル型の Peg-IFN/RBV 療法の治療効果はきわめて良好であり、63.6% (7/11 例) で SVR が得られた。メジャーアレル症例の中には治療効果が期待できたにもかかわらず、やむを得ない理由で IFN 治療を中止した症例も含まれているため、さらに高い奏効率が期待できるものと推察される。一方、

IL28B マイナーアレル型では SVR は 1 例も認められず、治療成績はきわめて不良であった。この結果はドナー側の因子を無視できるほどのインパクトがあった。

③ IL28B SNP メジャーアレル型では IFN β ではなくて、IFN λ 2/3 が ISGs の発現を制御している可能性が示唆された。一方、マイナーアレル型で ISGs を誘導するものの HCV の複製をむしろ増強させる液性因子が同定された。

(倫理面への配慮：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）、疫学研究に関する倫理指針（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）、臨床研究に関する倫理指針（平成 10 年厚生労働省告示第 415 号）を遵守し、当院倫理委員会の承認を得た後、患者の承諾を得て研究を行っている。)

D. 考察

IFN 治療抵抗性のウイルス側の因子としては、ISDR 変異が有意な規定因子であったが、宿主側の因子としては、肝内での ISGs の発現と宿主の IL28B SNP が独立した有意な規定因子であることが判明した。生体肝移植

レシピエントにおいても、レシピエントの IL28B SNP が IFN 治療抵抗性を明確に規定した。また、網羅的遺伝子解析の結果、ISGs の中で指標として有用だったのは Mx1, IFI44, IFIT1 の3つの遺伝子であった。IFN 治療抵抗例では ISGs が高発現していたが、その理由として IL28B 遺伝子多型が深く関与していることは明白だが、IL28B メジャーアレル型にも高発現している症例が含まれていたため、さらなる検討を行う必要がある。メジャーアレル型では肝組織中と末梢血中の ISGs の発現レベルに正の相関が認められたが、マイナー型では有意な相関は認められなかった。IFN λ 2/3 が ISGs の発現を制御している可能性が示唆されているが、マイナー型では他の液性因子の存在が示唆される。この候補因子として最近 IFN λ 4 が報告されたが、我々もマイナーアレル型で ISGs を誘導するものの HCV の複製をむしろ増強させる液性因子を同定しており、今後この因子の解析を進める予定である。また、肝生検組織を用いてレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション (MCD) 法にて肝小葉と門脈域の遺伝子発現を解析し、メジャーとマイナーで肝内の ISGs の発現に違いが認められる原因を解析する予定である。

E. 結論

- ① 生体肝移植後のレシピエントを含めた Genotype 1 型の C 型肝炎患者では、IL28B 遺伝子多型 (SNP) がマイナーアレル型の場合には Peg-Interferon/Ribavirin (Peg-IFN/RBV) 療法に抵抗性である。
- ② IL28B SNP でマイナーアレル型では、もともと肝内の Interferon stimulated genes (ISGs) の発現が高く、Peg-IFN/RBV 療法を行っても肝内の ISGs の上昇は認められない。即ち、もともと ISGs の発現が高い症例は Peg-IFN/RBV 療法に抵抗性である。
- ③ 一方、IL28B SNP メジャーアレル型では、Peg-IFN/RBV 治療により肝内の ISGs の有意な上昇が認められた。また、メジャーアレル型では IFN β ではなくて、IFN λ 2/3 が ISGs の発現を制御している可能性が示唆された。

F. 研究発表

該当なし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

該当なし。

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）

分担研究報告書

肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化を目指した 臨床的ならびに基礎的研究

－疾患関連タンパク質の解析基盤の研究－

研究分担者 朝長 毅 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部
プロテオームリサーチプロジェクト
プロジェクトリーダー

研究要旨

C型肝硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝硬変・肝癌発症サンプル、正常肝サンプル間のタンパク質発現を比較定量することを目的として、平成 24 年度は、前年度に引き続き、各症例サンプル、合計 12 検体を定量プロテオーム解析した。その結果、あわせて 1833 タンパク質を同定し、各サンプル間で発現量に差のあるタンパク質を抽出した。これらの変動タンパク質群は、バイオマーカー候補としての有用性が期待される。

A. 研究目的

近年、疾患プロテオミクスという新たな分野が開拓され、様々な疾患の原因やその診断マーカーを探索するために、主に質量分析計を用いたプロテオミクスの手法が取り入れられている。このような動向の背景として、安定同位体標識技術を用いた定量技術の開発、質量分析計の高感度化などの技術開発により、生体試料中のタンパク質を一度に数多く定量することが可能になったことが挙げられる。しかし、臨床サンプルについては、サンプル量に限界があること、サンプル間のばらつきが大きいことなど、代

謝標識ができないこと、多検体解析に対応する必要があること、など培養細胞や実験動物サンプルと比較して、プロテオーム解析に求められる難易度が高い。そこで本研究においては、定量的プロテオミクスの手法を駆使することによって、C型肝硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝硬変・肝癌発症サンプル、正常肝サンプル間のタンパク質発現を大規模に比較定量し、肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化に資する情報を得ることを目的とする。本年度は前年度に引き続き、C型肝硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝硬変・肝癌発症サンプル、正常肝

サンプル間で発現量に差のあるタンパク質を探索することを目的として、具体的には以下の手順で研究を遂行した。

①サンプルの破碎・タンパク質抽出・サンプルの品質検査、②タンパク質の消化・安定同位体タグによるサンプルの標識、③陽イオン交換カラムによる分画、④液体クロマトグラフ質量分析・データ解析。次項にその詳細を記す。

B. 研究方法

①サンプルの破碎・タンパク質抽出・ サンプルの品質検査

京都大学病院にて手術を受けたC型肝炎非発症・肝癌非発症サンプル、C型肝炎発症・肝癌発症サンプル、正常肝サンプルを、粉末状に破碎後、Phase Transfer Surfactant 法を用いて抽出されたタンパク質に対してトリプシンで消化を行った。また抽出されたタンパク質は SYPRO Ruby 染色を行い、サンプルの品質検査を同時に行った。

②タンパク質の消化・安定同位体タグによるサンプルの標識

アミン特異的安定同位体標識タグである iTRAQ 試薬を用いて、タンパク質を消化した各サンプル中のペプチドを標識した。

③陽イオン交換カラムによる分画

標識ペプチドは、陽イオン交換カラム (ZORBAX 300SCX, Agilent) で 20 分画した後 C18 StageTip を用いて

脱塩濃縮し、液体クロマトグラフ質量分析に供した。

④液体クロマトグラフ質量分析・データ解析

LC (AMR, Paradigm)-MS/MS (AB Sciex, Qstar Elite) を用いて、各分画中の標識ペプチドを分析した。データ解析は解析ソフト Mascot Daemon (version 2.3) と Proteome Discoverer (version 1.3) を用いて、ペプチド・蛋白質の偽陽性同定率が 1%以下となるように解析した。

(倫理面への配慮)

京都大学医学研究科による審査で承認された方法で採取保管され、検体の個人情報が漏出することがないように匿名化が厳重に行われるように配慮した患者の手術検体を用いた。

C. 研究結果

C型肝炎非発症・肝癌非発症サンプル 5 検体、C型肝炎発症・肝癌発症サンプル 5 検体、正常肝サンプル 2 検体をプロテオーム解析した結果、合計して 1833 タンパク質を同定した。そのうち、C型肝炎非発症・肝癌非発症サンプルとC型肝炎発症・肝癌発症サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 42 個、C型肝炎非発症・肝癌非発症サンプルと正常肝サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 165 個、C型肝炎

硬変・肝癌発症サンプルと正常肝サンプル間で 2 倍以上の変動したタンパク質を 223 個同定した。

D. 考察

前年度から引き続きサンプル解析を行い、予定通りすべての検体についてプロテオーム解析を行った。解析数を増やした結果、個体差による影響をより抑えることができるため、精度よく変動したタンパク質群を特定することができたと考えられる。今後はインフォマティクス解析を行うことで、変動タンパク質群に共通する特徴を探索する予定である。

E. 結論

臨床検体を用いたタンパク発現定量解析システムを用いて、前年度から解析検体数を増やして合計 12 検体について解析を行い、各症例群で 2 倍以上変化しているタンパク質群を特定した。本研究で確立された手法は普遍的であり、様々な臨床検体を用いたバイオマーカー探索への貢献が期待される。

F. 研究発表

[論文発表]

1. Shiromizu, T., Adachi, J., Watanabe, S., Murakami, T., Kuga, T., Muraoka, S. & Tomonaga, T. Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and

Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *J. Proteome Res.*, in press (2013).

2. Muraoka, S., Kume, H., Adachi, J., Shiromizu, T., Watanabe, S., Masuda, T., Ishihama, Y. & Tomonaga, T. In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List. *J. Proteome Res.* **12**, 208-13 (2013).
3. Yamamoto, T., Nakayama, K., Hirano, H., Tomonaga, T., Ishihama, Y., Yamada, T., Kondo, T., Kodera, Y., Sato, Y., Araki, N., Mamitsuka, H. & Goshima, N. Integrated View of the Human Chromosome X-centric Proteome Project. *J. Proteome Res.* **12**, 58-61 (2013).
4. Narumi, R., Murakami, T., Kuga, T., Adachi, J., Shiromizu, T., Muraoka, S., Kume, H., Kodera, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K., Miyamoto, Y., Ishitobi, M., Inaji, H., Kato, K. & Tomonaga, T. A Strategy for Large-Scale Phosphoproteomics and SRM-Based Validation of Human Breast Cancer Tissue Samples. *J. Proteome Res.* **11**, 5311-22 (2012).

[学会発表]

招待講演

1. 朝長 毅：最近のプロテオミクス技術の進歩とがん研究への応用. 第 112 回日本