

# 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

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

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上本 伸二

平成 26 (2014) 年 5 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

|  |       |       |   |
|--|-------|-------|---|
| 肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化を目指した<br>臨床的ならびに基礎的研究 | 上本 伸二 | ----- | 1 |
|--|-------|-------|---|

## II. 分担研究報告

|   |                     |       |    |
|---|---------------------|-------|----|
| 1. 肝移植後 C 型肝炎に対する治療法の標準化を目指した<br>臨床的ならびに基礎的研究                                     | 上本伸二・千葉 勉・上田佳秀・増田智先 | ----- | 21 |
| 2. 肝移植後 C 型肝炎に対する IFN 長期投与療法の有効性検討と<br>テラプレビルを含む 3 剤併用療法の導入                       | 大段秀樹                | ----- | 29 |
| 3. 生体肝移植レシピエントを含めた C 型肝炎患者における IL28B 遺伝子多型<br>(SNP) と抗ウイルス療法の効果や肝細胞癌 (HCC) 再発との関係 | 太田哲生                | ----- | 35 |
| 4. HCV 陽性肝移植におけるステロイドフリー免疫抑制法と<br>preemptive 抗ウイルス療法の意義に関する研究                     | 森 正樹                | ----- | 39 |
| 5. C 型肝炎硬変肝癌発症・非発症サンプルのプロテオーム解析   | 朝長 毅                | ----- | 43 |
| 6. 移植後ウイルス血症を呈する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発  | 下遠野邦忠               | ----- | 49 |

|                     |       |    |
|---------------------|-------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | ----- | 55 |
|---------------------|-------|----|

# I . 総括研究報告

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）

総括研究報告書

## 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

研究代表者 上本 伸二 京都大学大学院医学研究科肝胆膵・移植外科学講座 教授

### 研究要旨：

肝移植後 C 型肝炎ならびに B 型肝炎に対する最適な治療法を確立することを目的とし、臨床研究ならびに基礎研究の両面から解析を行った。

これまでの解析から、肝移植後 C 型肝炎に対するペグインターフェロン＋リバビリン治療の効果は低く、有害事象が多いことが明らかになった。治療成績の向上のためには、Direct acting antiviral(DAA)の導入が必要であるが、DAA と免疫抑制剤との相互作用が問題となる。

今回、肝移植後 C 型肝炎症例に対してテラプレビル＋ペグインターフェロン＋リバビリン治療を行った。テラプレビルと免疫抑制剤との相互作用を克服するため、タクロリムスからシクロスポリンへのコンバート、テラプレビル開始後のシクロスポリンの治療薬物モニタリングによる投与量の調節を行った。その結果、免疫抑制剤濃度に大きな変化を与えることなくテラプレビルの投与が可能となり、拒絶反応や感染は認めなかった。全体で 11 人中 9 人で sustained virological response (SVR)を達成することができ、治療効果は良好であった。治療中には全身倦怠感、貧血、腎障害などの有害事象を認め、それぞれ対策を要したが、治療終了後に改善を認めた。これらのことから、肝移植後 C 型肝炎に対して、DAA を含む 3 剤併用療法を安全かつ効果的に行うことができることが明らかとなった。

肝移植後 C 型肝炎・B 型肝炎についての基礎研究として、次世代ゲノムアナライザーによる肝移植症例の B 型肝炎ウイルス解析、肝組織におけるプロテオーム解析、ならびに HCV 感染細胞を用いた HCV 感染の分子機構の解明についての基礎研究を行い、肝移植後 C 型肝炎・B 型肝炎の治療や予防法開発へとつながる知見を得た。

### 研究分担者

千葉 勉：京都大学大学院医学研究科

消化器内科学講座 教授

下遠野 邦忠：国立国際医療研究センター

特任部長

森 正樹：大阪大学大学院医学系研究科

消化器外科学 教授

大段 秀樹：広島大学医歯薬保健学総合

研究院 外科学 教授

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

朝長 毅：独立行政法人 医薬基盤研究所  
創薬基盤研究部 プロオムプロ  
ジェクト プロジェクトリーダー  
上田 佳秀：京都大学医学部附属病院  
臓器移植医療部 講師  
増田 智先：九州大学病院 薬剤部 教授

## A. 研究目的

C 型慢性肝炎患者に対する抗ウイルス治療が積極的に行われるようになってきたが、すでに肝硬変、肝癌へと進行し抗ウイルス治療が困難な症例が多数存在する。これら進行した C 型肝炎硬変・肝癌に対する治療法として、近年肝移植が選択されるようになり、その数は年々増加しつつある。

しかしながら HCV 陽性レシピエントに対する肝移植後は、大部分の症例で C 型肝炎が再発し、再発後は免疫抑制剤などの影響を受け急速に進行することが明らかとなっている。この進行を抑制し予後を改善させるためには抗ウイルス治療が不可欠であるが、現在のところ、移植後 C 型肝炎の標準的治療法は確立されていない。移植後 C 型肝炎は、免疫抑制剤の使用など通常の C 型肝炎とは異なる点が多く、その治療成績は不良で有害事象が多いことが明らかとなってきている。以上より、移植後 C 型肝炎に対する有効かつ安全な治療法を確立することが急務である。本研究では、肝移植後 C 型肝炎症例の臨床像、治療成績を詳細に解析し、その予後、治療効果に関与するウイルス

側、宿主側の因子を、それぞれ次世代ゲノムアナライザー、プロテオミクスを用いて解析することにより、移植後 C 型肝炎に対する、効果的で副作用の少ない治療法を確立し、標準化することを目的とした。

さらに、肝移植後の B 型肝炎ウイルス(HBV)感染の問題として存在する異なる 2 つの病態、HBs 抗原陽性レシピエントにおける肝移植後の B 型肝炎、ならびに、HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後のレシピエントにおける B 型肝炎、に対する最適な治療法を確立することも本研究の目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 肝移植後 C 型肝炎についての臨床研究

#### 1-a. 肝移植後 C 型肝炎に対するテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン治療時の免疫抑制剤の使用法についての検討

肝移植後 C 型肝炎症例 9 例に対して以下の 3 段階の方法にてテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン治療導入を行った。1. タクロリムスからシクロスポリンへのコンバート、2. テラプレビル開始とシクロスポリン血中濃度調節、3. ペグインターフェロン+リバビリン開始。これらの各段階、ならびに治療中、治療終了後に、シクロスポリンとタクロリムスの治療薬物モニタリングを行い、投与量の調節を行った。3 剤併用用法を 12

週間、その後ペグインターフェロン＋リバビリン治療を12週間継続した。これらの経験から、肝移植後症例に対するDAA使用時の免疫抑制剤の使用法について解析を行った。

#### 1-b. 肝移植後C型肝炎に対するテラプレビル＋ペグインターフェロン＋リバビリン治療の効果と安全性の検討

上記のテラプレビルを含む3剤併用療法の効果と安全性について解析を行った。

#### 1-c. 生体肝移植レシピエントを含めたC型肝炎患者におけるIL28B遺伝子多型(SNP)と抗ウイルス療法の効果や肝細胞癌(HCC)再発との関係

肝切除か生体肝移植もしくはラジオ波焼灼療法(RFA)を行ったC型肝炎HCC患者の末梢血液と肝細胞癌組織、背景肝組織を用いて、IL28B遺伝子多型(rs8099917)とInterferon stimulated genes (ISGs)との関係について詳細な検討を行った。さらに、肝の局所免疫について免疫組織学的検討を行った。

#### 1-d. 肝移植後C型肝炎に対するインターフェロン長期投与療法の有効性検討

広島大学において、2000年から2013年1月までにHCV関連肝疾患に対し肝移植施行され、当院にてインターフェ

ロン治療を開始した56例を対象とした。術後pre-emptiveに2剤併用療法(ペグインターフェロン＋リバビリン)を開始し、Genotype 1はHCV RNAが陰性化してから原則1年以上の長期投与を行った。ペグインターフェロン＋リバビリンを原則として行い、ペグインターフェロンは週一回、リバビリンは200mg/日から始め800mg/日へ増量した。さらに2剤併用療法無効例2例にテラプレビルを含む3剤併用療法(ペグインターフェロン＋リバビリン＋テラプレビル)を施行した。

#### 2. 肝移植後C型肝炎ならびにB型肝炎についての基礎研究

##### 2-a. HBc抗体陽性ドナーグラフト中のHBVの次世代ゲノムアナライザー解析

HBc抗体陽性ドナーの肝臓内に潜伏しているHBVクローンの特徴ならびにde novo B型肝炎発症例のHBVの特徴を明らかにするため、HBVの次世代ゲノムアナライザー解析を行った。肝組織ならびに血中からDNAを抽出し、HBV-DNAをHBV特異的なプライマーを用いたPCR法にて増幅後、次世代シーケンサーにて遺伝子配列を同定し、コンピューターソフトを用いてHBVの多様性や遺伝子配列の特徴について解析を行った。

##### 2-b. C型肝炎硬変肝癌発症・非発症サンプルのプロテオーム解析

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比較定量するため、プロテオーム解析を以下の手順で行った。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。

## 2-c. 移植後ウイルス血症を呈する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発

本研究では移植後にもたらされるHCV血症の要因を明らかにする事を念頭において、試験管内感染系として出来るだけ生体に近い条件でのウイルス感染評価実験が望ましいと考え、酸素分圧を変化させたときのHCV感染変化を解析した。生体における肝細胞は外部環境に比べ酸素分圧が低いので、低酸素環境下での培養時における感染の違いを調べる。特に、低酸素条件においたときの細胞表面分子の発現を調べ、その分子の発現とHCV感染との関連性を調べた。

- (1) HuH7.5を低酸素条件で培養し、ウイルス感染増殖性の違いを調べる。
- (2) 低酸素時において細胞表面に発現誘導される因子を明らかにする。そのために、マイクロアレイ等の解析

を行う。

- (3) その因子とHCV感染との関連を明らかにする。低酸素条件下で発現誘導される因子を強制的に発現させたときのHCV感染の変化を調べる。
- (4) 得られる成果とウイルス血症との関連を考察する。

## C. 研究結果

### 1. 肝移植後C型肝炎についての臨床研究

#### 1-a. 肝移植後C型肝炎に対するテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン治療時の免疫抑制剤の使用法についての検討

タクロリムスからシクロスポリンへのコンバートは、全例で拒絶反応や感染を生じることなく、中央値9日(7-13日)で血中濃度の安定化(トランプ値 150-200 ng/mL, ピーク値 >500 ng/mL)が可能であった。テラプレビル導入によってシクロスポリンの血中濃度の上昇と半減期の延長を認めたが、シクロスポリン内服量の減量と投与間隔の延長にて血中濃度安定化が可能であった。安定化までの期間は中央値8日(6-14日)であり、シクロスポリンの内服量は中央値でテラプレビル開始前の33%

(25%-50%)に減少した。その減量率は症例間で異なり、症例毎の治療薬物モニタリングが必要であることが明らかとなった。血中濃度安定化後にペグインターフェロンとリバビ

リンの導入を行った。治療中のシクロスポリン血中濃度は安定していた。テラプレビル終了後にはシクロスポリン血中濃度の低下を認め、再度シクロスポリン内服量の増量を行い、その後にタクロリムスにコンバートした。タクロリムスの血中濃度を、治療開始前の濃度（トラフ値 6-8 ng/mL）に維持するために必要な内服量は、9例中6例で増量が必要であった。すなわち、治療中においても治療薬物モニタリングによる内服量の調節が必要であることが明らかとなった。

#### 1-b. 肝移植後C型肝炎に対するテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン治療の効果と安全性の検討

血中HCV-RNAはテラプレビル単独での1週間の治療にて著明に減少し、その後ペグインターフェロンとリバビリンを開始し、全例で陰性化した。陰性化までの期間は6例で治療開始4週以内であり、他の3例も7週までであった。全例で治療終了まで血中HCV-RNAは陰性が維持され、治療終了後に1例が再発したが、他の8例ではsustained virological response (SVR)が達成された。SVR率は89%と良好であった。

1例が全身倦怠感のために治療開始14週間で治療中止となったが、他の8例では治療プロトコルを完遂

できた。全例で全身倦怠感、貧血、高尿酸血症、腎障害の有害事象を認めた。また、好中球減少を5例、食欲不振を6例、皮疹を1例、ビリルビン上昇を4例に認めた。貧血のため、リバビリンの減量を全例に認め、4例では中止となった。好中球減少のため、3例でペグインターフェロンの一時的な減量を必要とした。高尿酸血症に対しては、全例でフェブキソスタットを投与した。いずれの有害事象も治療終了後に改善した。

以上より、薬物血中濃度モニタリングと投与量の調節、ならびに有害事象対策により、肝移植後C型肝炎に対してDAAの使用は可能であり、テラプレビルを含む3剤併用療法は安全かつ効果的であることが明らかとなった。

#### 1-c. 生体肝移植レシピエントを含めたC型肝炎患者におけるIL28B遺伝子多型(SNP)と抗ウイルス療法の効果や肝細胞癌(HCC)再発との関係

C型肝炎に対する抗ウイルス療法でSVR率の高いIL28B遺伝子多型メジャーアレル型は、マイナーアレル型に比べてHCC治療後の早期再発率が有意に高く、IL28B遺伝子多型が早期HCC再発の有意な独立した因子と判定された。IL28B遺伝子マイナーアレル型の方が、背景肝でのISGsの発現が有意に亢進するとともに、癌部にお



ける Immune-related genes の発現や T リンパ球とマクロファージの浸潤が亢進し、局所における抗腫瘍免疫が高まっていることが示唆された。一方で、IL28B 遺伝子メジャーアレル型ではマイナーアレル型に比べて末梢血 T リンパ球中の regulatory T cell の比率が上昇し、抗腫瘍免疫の低下が示唆された。

#### 1-d. 肝移植後C型肝炎に対するIFN長期投与療法の有効性検討

広島大学における過去13年間の肝移植後C型肝炎再燃に対するIFN治療効果の検討では、SVR率は48%であった。さらにnon SVR群の10年生存率40%に対し、SVR群では82%と、SVR群で有意な生存率の改善を認めた。さらにIL28B 遺伝子多型(rs8099917)の関連の検討の結果、ドナー/レシピエントのIL28B遺伝子多型の組み合わせが治療効果に関与しており、ドナー/レシピエントのIL28B遺伝子多型がTT/TTの症例が最もSVR率が良好であった(76%)。また長期投与完遂例にSVRが多く、長期投与後の再燃のリスクとしてリバビリンの低容量投与が明らかとなった。さらに、2例の肝移植後HCV再燃患者にプロテアーゼ阻害剤であるテラプレビルにペグインターフェロンとリバビリンを併用した3剤併用抗HCVウイルス療法を導入した。1例にSVR、1例にVRが得られたが、副作

用により中止後早期にリバウンドを認めた。効果・安全性共に問題はなかったが、副作用は免疫抑制剤併用によるTVRの血中濃度上昇により発現したと考えられた。

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

低用量 preemptive ペグインターフェロン+リバビリン治療は 14 例 (50%) に施行しえた。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。低用量 preemptive ペグインターフェロン+リバビリン治療導入率は、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。

#### 2. 肝移植後 C 型肝炎・B 型肝炎についての基礎研究

##### 2-a. HBc抗体陽性ドナーグラフト中のHBVの次世代ゲノムアナライザー解析

次世代ゲノムアナライザーを用いることにより、多様なウイルス・クロ

ーンの集合体である HBV 感染の全体像の把握が可能であることを昨年度までの研究により明らかにした。同手法を用いて、HBc 抗体陽性ドナーグラフト中の HBV の遺伝子配列ならびにその多様性について解析を行った。44 例の HBs 抗原陰性・HBc 抗体陽性健常人ドナーの肝臓内に存在する HBV の多様性は、HBs 抗原陽性例の HBV と比較して有意に低いことが明らかとなった。重症化に關与することが明らかとなっている、G1896 の変異については、44 例中 39 例では 99.9%以上の比率で野生型が存在しており、残りの 5 例においては 99.9%以上の比率で G1896A 変異型が存在しており、混在している症例は認めなかった。HBs 抗原陰性・HBc 抗体陽性者から、免疫抑制状態において HBV が再活性化した症例の血中 HBV を同様に解析した結果、やはり多様性は低く、G1896 の野生型か変異型かのどちらかが相互排他的に存在していた。

以上の結果より、HBs 抗原陰性・HBc 抗体陽性者の肝臓内に潜伏感染している HBV の多様性は極めて低いことが明らかとなった。

## 2-b. C型肝硬変肝癌発症・非発症サンプルのプロテオーム解析

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型肝硬変・肝癌非発症サンプルとC型肝硬変・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型肝硬変・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。

## 2-c. 移植後ウイルス血症を呈する宿主因子の探索とウイルス増殖予防法の開発

(1) 低酸素条件下において HCV 感染が亢進した。

HuH7.5 細胞を正常酸素分圧と低酸素分圧で培養し、その後 HCV 感染を行い、その 12 時間及び 24 時間後に細胞を間接免疫抗体染色法により、感染細胞を解析した。その結果、低酸素条件下で培養した細胞において有意に感染細胞の増加が見られた。感染を定量的に評価するために、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ HCV (HCV/Luc) を感染させて感染評価を行ったところ、低酸素条件下では、通常酸素分圧条件に比べて、約 3 倍の感染性を示した。

(2) HuH7.5 を低酸素条件下で培養すると VLDLR (very low density lipoprotein receptor) の産生が亢進した。

低酸素条件下にする事による感染効率の増加が何に起因するかを調べるために、細胞表面の蛋白質の変化を調べた。

これまでに HCV は膜表面のリポ蛋白質受容体と会合して感染するといわれているために、それらの遺伝子候補について低酸素条件で発現促進されるものを探索し、VLDLR を見いだした。VLDLR は正常の酸素分圧下では発現が検出できないが、約 5% の酸素分圧下で培養すると発現誘導が見られた。

(3) VLDLR を異所性に発現させた細胞において、HCV 感染は有為に亢進した。

低酸素条件下で発現誘導される VLDLR が HCV 感染を亢進する可能性を調べるために、これまでに HCV 感染が成立しなく、かつ VLDLR の発現もない HuH7 細胞に VLDL 遺伝子を外来的に発現させて、HCV 感染が成立するかを調べた。VLDLR を発現させないコントロール細胞に比べ、感染が有意に高くなった。

(4) VLDLR 遺伝子をノックアウトした細胞では低酸素条件下で培養しても HCV 感染の増加は見られない。

HuH7.5 細胞は低酸素条件下で VLDL を発現誘導する。そこで、VLDLR 遺伝子を CRISPR によりノックアウトした細胞を構築した。この細胞を低酸素条件下で培養し HCV 感染させたが、有為な感染増加は見られなかった。一方、この細胞に VLDLR variant 2 を発現させると感染増加が観察された。

(5) VLDLR を介した HCV 感染に CD81 は必要ない。

HCV 感染にはウイルス外膜蛋白質 E2

が CD81 と会合し、その後 Claudin1 等の働きにより、感染が成立するといわれている。VLDLR を介する感染においても CD81 が必要か否かを調べるために、CD81 発現のない HuH7.5 (-CD81) を作成して、VLDLR による HCV 感染促進を調べた。その結果、VLDLR 依存的な感染には CD81 が必要ない事が分かった。

## D. 考察

### 1. 肝移植後 C 型肝炎についての臨床研究

肝移植後 C 型肝炎再発に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法の治療効果は低く、慢性拒絶や de novo 自己免疫性肝炎などの移植後特有の有害事象も含めたリスクも高いことを明らかにしてきた。肝移植後 C 型肝炎の治療効果改善のためには、テラプレビルを含む DAA の使用が望ましい。テラプレビルを加えることによって治療期間が短縮できるため、長期治療後の生じる頻度が高い重篤な有害事象を回避できると考えられる。

今回、テラプレビルと免疫抑制剤との相互作用を克服する方法として、薬物血中濃度の頻回の測定と治療薬物モニタリングを行った。その結果、シクロスポリンならびにタクロリムスの内服量を個々の症例において適切に調節し、血中濃度が安定したままテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン治療を行うことが可能

であった。この方法は、今後使用可能となる他の DAA にも応用可能であり、DAA の肝移植後症例への安全な使用法が確立できたと言える。

さらに、肝移植後 C 型肝炎症例に対するテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン治療効果が良好であることも明らかにした。従来行われてきたペグインターフェロン+リバビリンによる 1 年以上に渡る治療の SVR 率よりも明らかに良好な SVR 率が得られた。有害事象として、拒絶反応や感染は認めなかったが、全身倦怠感、貧血、高尿酸血症、腎障害を全例に認めた。しかしながら、これらに対する対策法も明らかにすることができ、治療終了後には改善を認めた。これらのことから、今後は DAA+ペグインターフェロン+リバビリン治療が肝移植後 C 型肝炎に対する標準治療となると考えられる。

IL28B 遺伝子多型は、C 型肝炎の治療抵抗性という側面からみれば、メジャーアレル型の方が治療に有意であることは疑いようもないが、その一方で、HCC に対する治療という側面から見れば、マイナーアレル型の方が治療に有利であり、相反する結果となった。IL28B マイナーアレル型では、メジャーアレル型に比べて背景肝の ISGs の発現が有意に亢進するとともに、癌部における Immune-related genes の発現や T リンパ球とマクロファ-

ジの浸潤が亢進していたことより、局所における抗腫瘍免疫が高まっていることが示唆された。実際に、ISGs の亢進は HCC の増殖抑制やアポトーシス亢進につながることを報告されており、マイナーアレル型における局所腫瘍免疫の亢進が早期 HCC 再発の抑制につながったものと考えられる。一方、IL28B メジャーアレル型ではマイナーアレル型に比べて末梢血 T リンパ球中の Treg の比率が上昇し、抗腫瘍免疫の低下が示唆された。即ち、IL28B 遺伝子多型がマイナーアレル型では、局所の抗腫瘍免疫が亢進し、メジャーアレル型では局所の免疫寛容が亢進していることが示唆された。一方、抗ウイルス療法によるウイルス排除という点においては、そのことが逆に作用しているものと推察される。但し、このメカニズムの解明は未だ十分とはいえず、今後のさらなる検討が必要である。

## 2. 肝移植後 C 型肝炎・B 型肝炎についての基礎研究

HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後のレシピエントにおける HBV 活性化の頻度は、HBIG や HBV ワクチンによる活性化予防を行っている現時点でも高率に生じていることが、これまでの研究から明らかになった。次世代ゲノムアナライザーによる肝内潜伏 HBV の解析から、その対策を個別に行うための

重要な知見が得られた。すなわち、肝内潜伏 HBV の多様性は極めて低く、均一な HBV が存在していることを明らかにした。このことから、潜伏している HBV の遺伝子解析を行い、増殖力の強い G1896A 変異株や、HBs 抗体エスケープ変異株、核酸アナログ耐性変異株などの存在を同定することが、肝移植後の HBV 活性化予測やその予防策の選択に有用である可能性が示唆された

C 型肝硬変肝癌発症・非発症サンプルのプロテオーム解析の結果、C 型肝硬変サンプルと正常肝サンプルでのプロテオームプロファイルは大きく異なる一方で、C 型肝硬変、肝癌非発症・発症サンプル間の差は小さく、2 倍以上の発現量の差が見られたタンパク質は 42 個（全体の 2.6%）であった。これらの発現差のあるタンパク質は、肝癌非発症・発症を予測するマーカータンパク質としてのポテンシャルを有するとともに、発症機構解明の手がかりとなりうる。今後解析サンプル数を増やすことで、より精確に変動タンパク質群を特定することが期待される。

さらに、*in vitro* での HCV 基礎解析の結果、低酸素条件下ではウイルスゲノム複製が亢進する一方で、本研究では、感染そのものが亢進する事を明らかにした。その際、低酸素条件下で発現誘導される VLDLR が感染を亢進する事が分かった。HCV 感染には、複数の

宿主蛋白質が関与する事が知られている。その中でも SR-BI, LDLR などリポ蛋白質受容体が細胞への吸着に必要とされている。ウイルス粒子にはアポリポ蛋白質 E が会合しており、この蛋白質を除くと培養細胞 HuH7.5 へのウイルス感染性は極端に低下する。従って、SR-BI, LDLR 等は粒子に会合しているアポリポ蛋白質 E を介して吸着し、その後のウイルスの粒子侵入に寄与すると考えられている。一方、アポリポ蛋白質 E は VLDLR のリガンドとしても働く事が知られている。HuH7.5 は通常の培養条件では、VLDLR を発現していない。しかし、低酸素条件で培養すると発現が誘導される。そこで、低酸素条件下での HCV 感染をしらべたところ、感染効率が高くなる事を見いだした。VLDLR 遺伝子を外来的に発現させた細胞では、低酸素条件にしなくても感染の増加が観察された。CRISPR で VLDLR をノックアウトした HuH7.5 では低酸素条件下でも感染の増加は見られなかった。また、VLDLR の細胞質側領域を欠失させた分子を発現する HuH7.5 細胞も HCV 感染の増加は観察されなかった。以上から VLDLR は HCV 感染に重要な宿主因子のひとつであると考えられる。なお、VLDLR 発現による HCV の感染増加には CD81 が必要でない事から、これまで報告された HCV 感染様式とは異なる感染機構が存在するといえる。

生体内における酸素分圧は組織により異なり、肝組織における分圧はおよそ6%と推定される。培養細胞を用いた通常の酸素分圧下でのHCV感染が生体内にそのまま適用出来るとは限らない。移植後のウイルス血症も、HCV感染機構の変化によりもたらされる可能性が考えられる。

## E. 結論

肝移植後C型肝炎治療ならびに肝移植後B型肝炎対策の現状が明らかとなり、テラプレビル併用やB型肝炎ワクチンといった新規治療法の導入も可能となった。また、臨床研究と基礎研究の両面から効果予測、有害事象予測が可能となってきた。以上の解析結果から、今後、より有効で有害事象の少ない対策法のプロトコール作成へ進めることが可能となった。

治療薬物モニタリングにより、肝移植後C型肝炎に対するテラプレビルを含む3剤併用療法による安全かつ効果的な治療が可能であった。この結果より、肝移植後C型肝炎症例に対してもDAAが使用可能であることが明らかとなり、今後、肝移植後C型肝炎に対する治療成績向上ならびに予後改善が期待できる。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### [論文発表]

1. Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Muzuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin receptor somatic mutations are frequent in HCV-infected cirrhotic liver and associated with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 146:222-232:2014.
2. Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S. Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2014; 97(3): 344-350.
3. Kikuchi M, Okuda Y, Ueda Y, Nishioka Y, Uesugi M, Hashimoto E, Takahashi T, Kawai T, Hashi S, Shinke H, Omura T, Yonezawa A, Ito T, Fujimoto Y, Kaido T, Chiba T, Uemoto S, Matsubara K, Masuda S. Successful Telaprevir Treatment in Combination of Cyclosporine against Recurrence of Hepatitis C in the Japanese Liver Transplant Patients. *Biol Pharm Bull*. 2014; 37(3) :417-423.
4. Ueda Y, Yoshizawa A, Y Ogura, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Chiba T, Uemoto S. Plasma cell hepatitis induced by the termination of antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor

- liver transplantation. Hepatol Res. (in press)
5. Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H. Reactivation from Occult HBV Carrier Status is Characterized by Low Genetic Heterogeneity with the Wild-type or G1896A Variant Prevalence. J Hepatol. (in press)
  6. Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Inuzuka T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K, Koike K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver grafts in liver transplant recipients; ultra-deep sequencing analysis. J Clin Microbiol. 2013; 51(11): 3645-3652.
  7. Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Marusawa H, Teramukai S, Uemoto S, Chiba T: Pretransplant serum hepatitis C virus RNA levels predict response to antiviral treatment after living donor liver transplantation. Plos One 8:e58380:2013.
  8. 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 43:67-71:2013.
  9. Takada Y, Kaido T, Asonuma K, Sakurai H, Kubo S, Kiuchi T, Inomata Y, Isaji S, Tsuruyama H, Teramukai S, Matsubara Y, Sakabayashi S, Uemoto S. Randomized multicenter trial comparing tacrolimus plus mycophenolate mofetil with tacrolimus plus steroids among HCV-positive recipients of living donor liver transplantation. Liver Transpl 19: 896-906, 2013.
  10. Takada Y, Uemoto S. Living donor liver transplantation for hepatitis C. Surg Today 43: 709-714. 2013.
  11. 上田 佳秀: de novo B型肝炎 HBV再活性化予防のために基礎知識 p118-126. 2013年9月20日初版発行 医薬ジャーナル社. 編集 持田 智
  12. 上田 佳秀: 移植とウイルス肝炎診断と治療. vol.101-no.9 2013. 1357-1362
  13. 大段秀樹 「State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery. 」 Frontiers in Gastroenterology. 18(3): 203-213. 2013
  14. 尾上隆司, 高橋祥一, 茶山一彰, 大段秀樹 「肝移植-現状と展望 B型肝炎, 肝硬変に対する肝移植」臨床消化器内科. 28(9): 1271-77. 2013
  15. Takamura H, Nakanuma S, Hayashi H, Tajima H, Kakinoki K, Sakai S, Makino I, Nakagawara H, Miyashita T, Okamoto K, Nakamura K, Oyama K, Inokuchi M,

- Ninomiya I, Kitagawa H, Fushida S, Fujimura T, Ohnishi I, Kayahara M, Tani T, Arai K, Yamashita T, Kitamura H, Ikeda H, Kaneko S, Nakanuma Y, Matsui O, Ohta T. Evaluation of eligibility criteria in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma by  $\alpha$ -SMA positive cancer associated fibroblast. *Oncology Report* 30(4) : 1561-1574, 2013
16. Hodo Y, Honda M, Tanaka A, Nomura Y, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Sasaki M, Nakanuma Y, Moriyama M, Kaneko S. Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. *Clin Cancer Res* 19 : 1827-1837, 2013
17. Marubashi S, Mori M, et al. Laparoscopy-assisted hybrid left-side donor hepatectomy. *World J Surg* 37(9):2202-2210, 2013
18. Kobayashi S, Mori M, et al. Evaluation of safety parameters and changes in serum concentration in liver transplant recipients treated with doxorubicin during the anhepatic period. *Cancer Chemother Pharmacol* 72(6):1325-1333, 2013
19. Marubashi S, Mori M, et al. Hepatic artery reconstruction in living donor liver transplantation: risk factor analysis of complication and a role of MDCT scan for detecting anastomotic stricture. *World J Surg* 37(11):2671-2677, 2013
20. Hideaki Kume, Satoshi Muraoka, Takahisa Kuga, Jun Adachi, Ryohei Narumi, Shio Watanabe, Masayoshi Kuwano, Yoshio Kodera, Kazuyuki Matsushita, Junya Fukuoka, Takeshi Masuda, Yasushi Ishihama, Hisahiro Matsubara, Fumio Nomura, Takeshi Tomonaga. Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring and tissue microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* in press.
21. Takahisa Kuga, Hideaki Kume, Naoko Kawasaki, Misako Sato, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Isamu Hoshino, Takanori Nishimori, Hisahiro Matsubara and Takeshi Tomonaga. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase Ia and FAM83H in colorectal cancer. *Journal of cell science*, **126** (20), 4721-4731, 2013.
22. Takashi Shiromizu, Jun Adachi, Shio Watanabe, Tatsuo Murakami, Takahisa Kuga, Satoshi Muraoka, and Takeshi Tomonaga. Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *Journal of Proteome Research*, **12** (6):2414-2421, 2013.



23. Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Jun Adachi, Takashi Shiromizu, Shio Watanabe, Takeshi Masuda, Yasushi Ishihama, and Takeshi Tomonaga. In-depth Membrane Proteomic Study of Breast Cancer Tissues for the Generation of a Chromosome-based Protein List. *Journal of Proteome Research*, **12** (1), 208–213, 2013.
24. Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology*. 145: 658-667, 2013
25. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. *J. Virol* 87: 8169-8178, 2013.
26. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N., PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem Biophys Res Commun*. 430(2) :592-597, 2013.
27. 増田 智先, 細川 実緒, 上杉 美和, 端 幸代, 河合 知喜, 松原 和夫, 千葉 勉, 上本 伸二 肝移植後 C 型肝炎に対する テラプレビル+ペグインターフェロン +リバビリン治療 第 31 回日本肝移植研究会 熊本 熊本全日空ホテルニュースカイ、2013 年 7 月 4 日 シンポジウム 3. C 型肝炎硬変治療における肝移植の意義 –現状の評価と挑戦–
28. 上田 佳秀, 千葉 勉, 上本 伸二 肝移植におけるチーム医療の必要性 第 31 回日本肝移植研究会 熊本 熊本全日空ホテルニュースカイ、2013 年 7 月 4 日 イブニングセミナー. 肝移植患者の長期管理における各専門内科医との至適連携とは
29. Yoshihide Ueda, Satoshi Masuda, Toshimi Kaido, Takashi Ito, Kohei Ogawa, Atsushi Yoshizawa, Yasuhiro Fujimoto, Akira Mori, Hiroyuki Marusawa, Mio Hosokawa, Miwa Uesugi, Sachiyo Hashi, Tomoki Kawai, Kazuo Matsubara, Tsutomu Chiba, Shinji Uemoto. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for recurrent hepatitis C after liver transplantation. September 3, 2013. Symposium Invited session (SY05): Liver transplantation for HBV and/or HCV infection. The 13<sup>th</sup> Congress of the Asian Society of Transplantation (CAST 2013). Kyoto, Japan.
30. 上田 佳秀, 千葉 勉, 上本 伸二: 臓器移植後の肝炎ウイルス対策の現状と問題点 第 49 回日本移植学会総会

#### [学会発表]

1. 上田 佳秀, 海道 利実, 伊藤 孝司, 小川 晃平, 吉澤 淳, 藤本 康弘, 森 章,

- 京都、2013年9月7日 臓器横断的シンポジウム10：移植後ウイルス感染症への対策
5. 上田 佳秀、増田 智先、上本 伸二 肝移植後C型肝炎に対するテラプレビルを含む3剤併用療法 JDDW 2013、東京、2013年10月10日 シンポジウム7. C型肝炎治療の新展開 (第17回肝臓学会大会)
  6. 金 秀基、丸澤宏之、千葉 勉 肝幹/前駆細胞を起源とする肝発癌モデルを用いたゲノム異常の網羅的解析 JDDW 2013、東京、2013年10月11日 ワークショップ(第17回肝臓学会大会)
  7. 上田 佳秀 HCV診療の最前線第2回 日本移植学会若手育成教育セミナー「臓器移植と感染症—その一—：ウイルス感染」 東京 TKP 赤坂ツインタワーカンファランスセンター 8階 8A室 2014年3月1日
  8. 田代裕尊、尾上隆司、石山宏平、井手健太郎、小林剛、大平真裕、田原裕之、田中友加、大段秀樹：移植と免疫応答 肝移植後の免疫応答と感染、第26回日本外科感染症学会総会、神戸、2013.11.25
  9. 安部智之、尾上隆司、石山宏平、井手健太郎、大平真裕、田原裕之、田代裕尊、大段秀樹：生体部分肝移植術がC型肝炎陽性レシピエントの耐糖能に与える影響について 第49回日本移植学会総会、京都、2013.9.5
  10. 平田文宏、尾上隆司、清水誠一、石山宏平、井手健太郎、大平真裕、田澤宏文、寺岡義布史、山下正博、安部智之、橋本慎二、森本博司、佐伯吉弘、谷峰直樹、小林剛、天野尋暢、田代裕尊、大段秀樹：当院における再肝移植症例の検討 第31回日本肝移植研究会、熊本、2013.7.4
  11. 河岡友和、高橋祥一、今村道雄、菅 宏美、藤野初江、福原崇之、小林知樹、苗代典昭、宮木大輔、三木大樹、平賀伸彦、柘植雅貴、平松 憲、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、越智秀典、石山宏平、井手健太郎、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治療効果と10年生存率の検討。 第49回日本肝臓学会総会、東京、2013.6.6
  12. 河岡友和、高橋祥一、今村道雄、菅 宏美、藤野初江、福原崇之、小林知樹、苗代典昭、宮木大輔、三木大樹、平賀伸彦、柘植雅貴、平松 憲、川上由育、兵庫秀幸、相方 浩、越智秀典、石山宏平、井手健太郎、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治療効果(3剤併用を含む)と10年生存率の検討。 第31回日本肝移植研究会、熊本、2013.7.4
  13. 石山宏平、大平真裕、井手健太郎、小林剛、天野尋暢、田中友加、田代裕尊、大段秀樹：肝移植後経過時期に応じた免疫療法個別管理の工夫 第113回日本外科学会定期学術集会、福岡、2013.4.12
  14. 高村博之、柄田智也、中沼伸一、岡本浩一、酒井清祥、牧野 勇、林 泰寛、中村慶史、尾山勝信、中川原寿俊、宮下知治、

- 田島秀浩, 大西一朗, 二宮 致, 北川裕久, 伏田幸夫, 谷 卓, 藤村 隆, 萱原正都, 宮本正俊, 太田哲生. 肝癌に対する肝移植の適応と限界 肝細胞癌に対する生体肝移植の適応基準はどうあるべきか. 第 113 回日本外科学会総会, 福岡国際会議場 2013 年 4 月 12
15. Kobayashi S, Mori M, et al. Liver transplantation for alcoholic liver cirrhosis. 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
  16. Hama N, Mori M, et al. Protocol and outcome of ABO incompatible living donor liver transplantation. 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
  17. Wada H, Mori M, et al. Incidence and management of cytomegarovirus infection after living donor liver transplantation. 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
  18. Okubo K, Mori M et al. A case report of the living donor liver transplantation with difficulty in portal veins and hepatic arterial reconstruction. 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
  19. Tsuda Y, Mori M, et al. Liver transplantation with modified portal vein anastomosis for the patients with portal vein stenosis (PVS) or thrombosis(PVT). 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
  20. 和田浩志, 森 正樹,他. 肝移植後のサイトメガロウイルス感染症対策と現状. 第 31 回日本肝移植研究会, 2013/7, 熊本.
  21. 小林省吾, 森 正樹,他. 教室におけるアルコール性肝硬変に対する肝移植. 第 31 回日本肝移植研究会, 2013/7, 熊本.
  22. 濱直樹, 森 正樹,他. 当科の血液型不適合肝移植に対する周術期プロトコールと治療成績. 第 31 回日本肝移植研究会, 2013/7, 熊本.
  23. 津田雄二郎, 森 正樹,他. 門脈再建困難症例に対する再建方法の適応についての検討. 第 31 回日本肝移植研究会, 2013/7, 熊本.
  24. 津田雄二郎, 森 正樹,他. 肝移植後のサイトメガロウィルス(CMV)感染症対策と現状. 第 49 回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.
  25. 濱直樹, 森 正樹,他. ABO 不適合肝移植に対する周術期プロトコールと治療成績. 第 49 回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.
  26. 小林省吾, 森 正樹,他. 当施設におけるアルコール性肝硬変に対する肝移植. 第 49 回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.
  27. 和田浩志, 森 正樹,他. 門脈再建困難症例に対する再建方法の適応についての検討. 第 49 回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.
  28. 和田浩志, 森 正樹,他. 教室における脳死肝移植登録者と肝移植施行症例の検討. 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013/4, 福岡.

29. 濱直樹, 森 正樹, 他. 成人肝移植術後長期経過例における腎機能障害の検討. 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013/4, 福岡.
30. 濱直樹, 森 正樹, 他. 改正臓器移植法施行後の脳死肝移植の現状. 第 68 回日本消化器外科学会総会, 2013/7, 宮崎.
31. 梶原淳, 森 正樹, 他. 脳死肝移植における提供肝に関する当院での検討. 第 68 回日本消化器外科学会総会, 2013/7, 宮崎.
32. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y, Tomonaga T, ATP Accessibility Screening (AAS), A High-Throughput and High-Resolution Kinase Analysis Platform for Signaling Research, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
33. Kume H, Muraoka S, Hashimoto Y, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, Fukuoka J, Kodera Y, Matsushita K, Matsubara H, Tomonaga T, Discovery and subsequent validation of biomarkers for colorectal cancer by large-scale proteomic analysis and tissue microarray analysis, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
34. Shiromizu T, Adachi J, Yagi S, Hoffman RM, Tomonaga T, Proteomic Analysis of Highly Invasive Colorectal Cancer Cells Established by Orthotopic Xenograft Mouse Model, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
35. Muraoka S, Kume H, Saitoh H, Enomoto Y, Ito Y, Nishizuka S, Wakabayashi G, Hoshino I, Matsubara H, and Tomonaga T, Development of High-throughput Screening System Using Autoantibody Library for Discovery of Scirrhus Gastric Cancer Biomarker, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
36. Hashiguchi K, Muraoka S, Adachi J, Sato M, Kuga T, Watanabe R, Shiromizu T, Hashimoto Y, Nagano M, Kishida M, Tomonaga T, Quantitative Phosphoproteome Analysis of Cultured Stomach Cancer Cell Lines Aimed at Development of Biomarkers for Prediction of Drug Efficacy, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日
37. Sato M, Adachi J, Tomonaga T, Quantitative Proteome Analysis with Isotope Dimethyl Labeling to Identify TGF-beta-mediated Tumor Proteins Using the Metastatic Mouse Breast Cancer Model, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013 年 9 月 14 日-18 日