

. 分担研究報告

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）

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

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
研究分担者 上田佳秀 京都大学医学部附属病院臓器移植医療部 講師
研究分担者 増田智先 九州大学病院 薬剤部 教授

研究要旨

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 9 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、まず、タクロリムスからシクロスポリンへのコンバートを行い、その後にテラプレビル開始してシクロスポリンの血中濃度調節、安定してからペグインターフェロン＋リバビリン開始した。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。その結果、免疫抑制剤濃度に大きな変化を与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。9 人中 8 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。

HBs 抗原陰性・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を明らかにしてきた。今回、次世代ゲノムアナライザーによる肝臓内の HBV の解析から、HBV の多様性は極めて低く、均一な HBV クローンが潜伏感染していることを明らかにした。この結果から、潜伏している HBV の遺伝子解析によって、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。

A. 研究目的

1. C型肝炎ウイルス(HCV)による肝硬変・肝細胞癌の治療法のひとつとして肝移植が定着しつつある。しかしながら、HCV陽性肝疾患の肝移植後は大部分の症例でC型肝炎が再発し、再発後は急速に進行するため、その長期予後は不良である。予後改善のために抗ウイルス治療が行われているが、治療効果は低く、有害事象が多いことが明らかとなっており、標準的治療は確立されていない。Direct acting antiviral agents (DAA)を含む3剤併用療法による治療効果向上が期待されていたが、代謝酵素が同じであるカルシニューリン阻害剤の血中濃度を顕著に上昇させることが問題となる。そのため、今回、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+リバビリン治療について、以下の2点を解析することにより、最適な治療法を確立することを目的とした。
 - 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+リバビリン治療導入時ならびに治療中の免疫抑制剤の使用法を確立する。
 - 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を明らかにする。

2. 肝移植後のB型肝炎ウイルス(HBV)感染の問題として、異なる2つの病態が存在する。ひとつは、HBs抗原陽性レシピエントにおける肝移植後のB型肝炎、もうひとつは、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型肝炎である。これらのレシピエントの肝移植後のB型肝炎再発を予防するために、現在は核酸アナログ製剤と高力価HBs抗体含有免疫グロブリン製剤(HBIG)の併用または単独投与が生涯に渡り行われる。これらによりHBV再発予防が可能であるが、HBIGはヒト血液を原料とするため供給量に限界があり、医療費や安全性の面でも大きな問題を有している。昨年までの解析によって、これらのHBV再活性化予防策の効果と安全性を明らかにした。その結果、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活性化の頻度が高いことが明らかとなった。今回、その活性化に關与するウイルス因子の同定を行うため、次世代ゲノムアナライザーを用いて、HBc抗体陽性ドナーの肝臓内に潜伏しているHBVの遺伝子配列の解析を行った。

B. 研究方法

1. 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、ならびに、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。

2. 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。

(倫理面への配慮)

当該施設における倫理委員会の承認

の上で行った。

C. 研究結果

多変量解析を行った結果、IL28B 遺伝子多型は早期肝細胞癌再発の有意な独立した因子と判定された。C型肝炎に対する抗ウイルス療法でSVR が得られやすいメジャーアレル型は、マイナーアレル型に比べて有意にHCC治療後の早期再発率が高かった。即ち、抗ウイルス療法に抵抗性のマイナーアレル型の方が、早期HCC再発率が有意に低かった。そのメカニズムを考察する上で、いくつかの注目すべき知見が得られた。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 の発現が亢進し、実際にTリンパ球やマクロファージの浸潤が亢進していた。

また、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Regulatory T cell (Treg) の比率が上昇していた。

D. 考察

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方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。

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。

E. 結論

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. 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. *Hepato 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

【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, 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 -
2. 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
3. Yoshihide Ueda, Satohiro 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 13th Congress of
the Asian Society of Transplantation
(CAST 2013). Kyoto, Japan.

4. 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 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

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

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 テラプレビルを含む 3 剤併用療法の導入

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 C 型肝炎再発はその予後を大きく低下させる要因であると同時に、従来の抗 C 型肝炎ウイルス治療抵抗性であることが多い。HCV 関連慢性肝疾患に対する肝移植治療成績を改善するためには、肝移植後も有効な抗 HCV 治療の開発が急務である。本研究では肝移植後の IFN 治療効果とその予後因子を検討した。当院での過去 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(RBV)の低容量投与が明らかとなった。また近年、新しい抗 C 型肝炎ウイルス剤であるプロテアーゼ阻害薬が開発され、C 型慢性肝炎患者に対する臨床使用においてもその効果が確認されている。肝移植後の抗 HCV ウイルス療法としても有望と考えられるが、その効果と安全性に対しては十分な知見が得られていない。当院では現在まで 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 (TVR) に PEG IFN- α 2b (IFN) と RBV 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。今後、免疫抑制剤および TVR 血中濃度モニタリングによる投与量調整を含むプロトコールの標準化が望まれる。

A. 研究目的

本研究では、生体肝移植後 HCV 再感染に対する IFN 治療における生存率を

含めた治療成績および関連する因子を明らかにする。さらに新規 Direct Acting Antivirals (DAA)であるプロテ

アーゼ阻害剤（テラプレビル：TVR）を用いた 3 剤併用抗 HCV ウイルス療法を導入し，その治療成績を検討した。

B. 研究方法

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 IFN 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（PEG-IFN/RBV）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。pegIFN +RBV を原則として行い，pegIFN は週一回，RBV 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（TVR）を含む 3 剤併用療法（PEG/RBV/TVR）を施行した。

（倫理面への配慮）

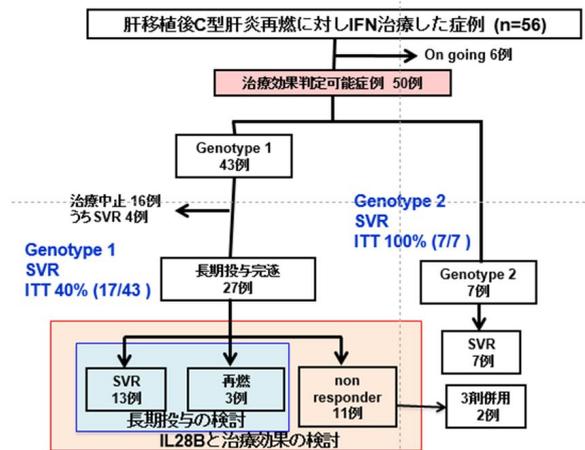
本研究は”ヘルシンキ宣言”に基づき，研究対象者に対する人権擁護上の配慮を行い遂行された。また SNP 解析を含む遺伝子解析に関してはヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成 16 年 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）等該当指針に基づき，所属機関の倫理委員会承認を得た。また全ての研究対象者に対してインフォームドコンセントを行い，書類での同意を得た。

C. 研究結果

1. 治療成績

対象 56 例中，治療効果判定可能症例は 50 例であった。全体の SVR 率は 48%(24/50)，genotype1 型の SVR 率は 39.5%(17/43)，genotype2 型の SVR 率は

100%(7/7)であった。長期投与完遂は genotype1 型では 27 例で SVR/nonSVR は 13/14 例，治療中止は 16 例で SVR/nonSVR は 4/12 例であった。Genotype2 型では 7 例全例が治療完遂し，全例 SVR であった。（図 1）



2. 累積生存率

SVR 症例の 5 年および 10 年生存率はそれぞれ 95%および 82%，non SVR 症例では 61%および 40%であった。カプランマイヤー生存曲線およびログランクテストによる検定では，SVR 症例では有意な生存率の改善を認めた。Non SVR 症例では死亡 9 例中 5 例が HCV 再感染による肝不全であった。（図 2）

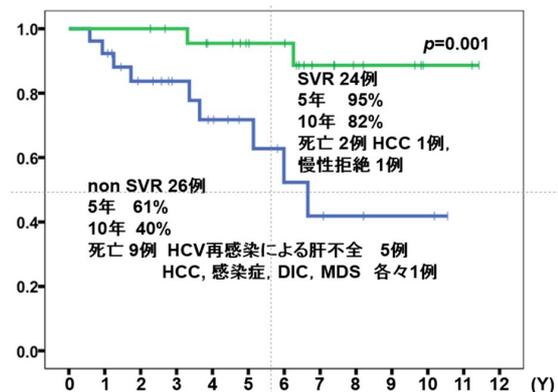


図 2 . 累積生存率

3. IL28B 遺伝子多型と SVR 率の関連

Genotype1 型 C 型肝炎で長期投与完遂例のうち，SVR13 例と null responder 11 例での比較では，ドナー IL28B 遺伝子多型 TT 型が SVR に寄与する因子であったが，レシピエント IL28B 遺伝子多型の寄与は認められなかった。(表 1) しかし，ドナーおよびレシピエントの IL28B 遺伝子多型の組み合わせでの比較ではドナー TT・レシピエント TT 群の SVR 率は 76%(10/13)，ドナー TG+GG・レシピエント any 群の SVR 率は 20%(1/5) と有意な差を認めた (P=0.026)。(図 3)

	SVR (n=13)	non responder (n=11)	p value
年齢 (歳)*	59 (44-69)	60 (45-69)	0.48
性別 (男/女)	10 / 3	6 / 5	0.3
ウイルス量 (LogIU/mL)*	6.3 (5.8-6.6)	6.6 (5.9-7.2)	0.52
ISDR 変異数 (0-1 / 2-5)	7 / 6	6 / 5	1.0
HCV core70 region (wild/ mutant)	4 / 9	4 / 7	1.0
ドナー IL28B genotype TT / TG+GG / ND	12 / 1	6 / 4 / 1	0.06
レシピエント IL28B genotype TT / TG+GG	10 / 3	7 / 4	0.6
Adherence to PEGIFN ≥70 / <70 (%)	9 / 4	3 / 8	0.3
Adherence to RBV ≥50 / <50 (%)	8 / 5	9 / 2	0.1

表 1. Genotype1 型症例の SVR 因子の検討

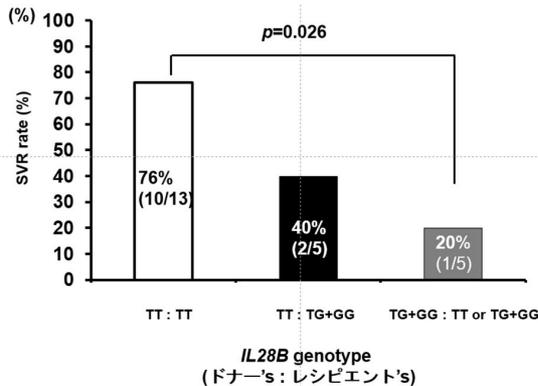


図 3. ドナー/レシピエントの IL28B 遺伝子多型の組み合わせ別 SVR 率

4. IFN 長期投与後再燃に寄与する因子

長期投与完遂例で Virological Response (VR) が得られた症例は 16 例であり，その内 SVR13 例と再燃 3 例で寄与因子を検討・比較した。統計学的に有意

ではなかったが，SVR 例では RBV に対するアドヒアランスが 50%以上の症例が 46%(6/13)であったのに対し，再燃例では 0%(0/3)であり，IFN 長期投与治療後の再燃のリスクと考えられた。(表 2)

	SVR (n=13)	再燃 (n=3)	p value
年齢 (歳)*	59 (44-69)	63 (56-70)	0.3
性別 (男/女)	10 / 3	2 / 1	0.4
ウイルス量 (LogIU/mL)*	6.3 (5.8-6.6)	6.6 (5.9-7.2)	0.5
IFN 治療開始から VR までの期間 (months)*	5 (1-18)	4 (6-9)	0.3
ISDR 変異数 (0-1 / 2-5)	7 / 6	2 / 1	0.9
HCV core70 region (wild/ mutant)	4 / 9	1 / 2	0.6
ドナー IL28B genotype TT / TG+GG	12 / 1	3 / 0	0.5
レシピエント IL28B genotype TT / TG+GG	10 / 3	3 / 0	0.3
Adherence to PEGIFN ≥70 / <70 (%)	9 / 4	3 / 0	0.9
Adherence to RBV ≥50 / <50 (%)	6 / 7	0 / 3	0.2

表 2. IFN 長期投与後の再燃リスク因子

5. テラプレビル (TVR) を含む 3 剤併用療法 (PEG/RBV/TVR) の導入

肝移植後 HCV 再燃症例で術後 2 剤併用療法無効症例 2 例に対し，テラプレビル (TVR) を含む 3 剤併用療法 (PEG/RBV/TVR) の導入を行った。免疫抑制剤を予めシクロスポリンに変更し，低容量から開始した。3 剤併用療法開始後は血中濃度モニタリングを頻回に行い投与量を調節した。1 例目は 63 才・男性，ドナー/レシピエントの IL28B 遺伝子多型は TT/TT 型，移植後 35 ヶ月後に 3 剤併用療法を導入し 12 週間施行後，pegIFN +RBV を 36 週間行い 4 週目でウイルス陰性化を認め SVR を得た。(図 4)

2 例目は 70 才・女性，ドナー/レシピエントの IL28B 遺伝子多型は TT/TG 型，移植後 73 ヶ月後に 3 剤併用療法を導入したが 11 週で腎機能障害，皮疹，倦怠感などの副作用出現にて中止となった。3 剤併用療法導入後 4 週目にウイルス陰性化を得られていたが，中止後 4 週目に再燃を認めた。(図 5) 副作用による中止時の

TVR の AUC_{24h} は同量の TVR 投与を行っている慢性肝炎患者の中央値の 2 倍であった。(図 6)

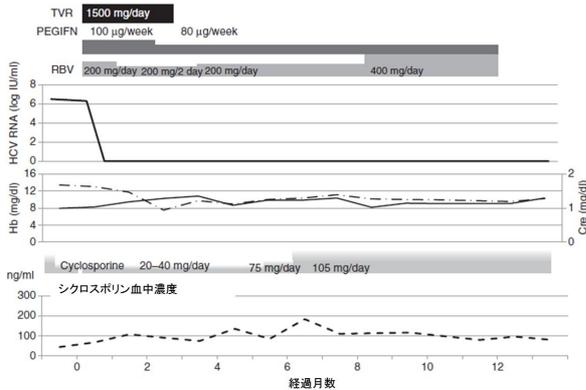


図 4. 3 剤併用療法 1 例目経過

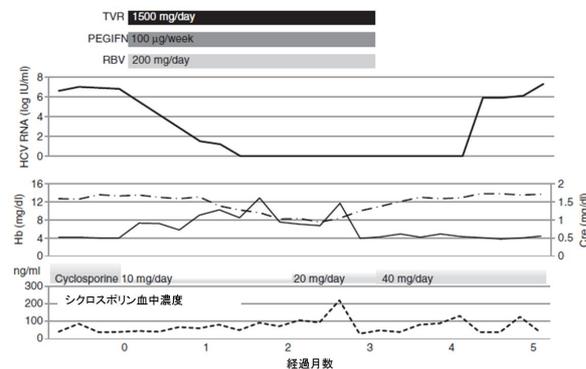


図 5. 3 剤併用療法 2 例目経過

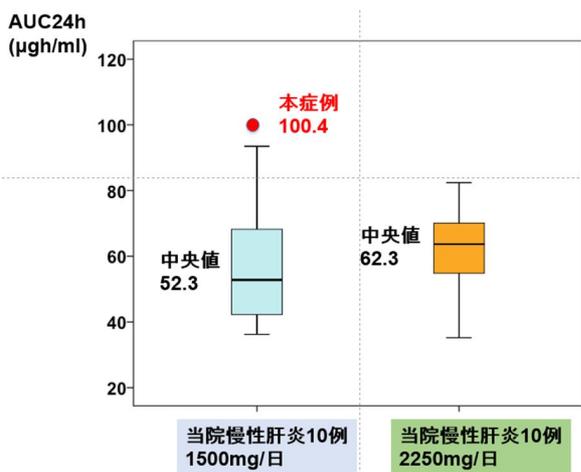


図 6. 慢性肝炎患者と 3 剤併用療法 2 例目の投与中止時の TVR 血中濃度の比較

D. 考察

本研究での解析により，HCV 慢性肝疾

患に対する肝移植において術後 SVR を得ることが長期生存につながることを示された。当院での SVR 率は他の報告よりも高く，IFN 長期投与療法は有用であることが示唆された。IL-28B 遺伝子多型の組み合わせが SVR 達成の因子であること，および長期に VR が得られていても RBV の投与量が少ない場合には再燃率が高かったことより，適応の点では肝移植後 IFN 療法の IL-28B 遺伝子多型を考慮すること，その実施においては RBV のアドヒアランスを保つことが SVR 達成に重要と考えられた。このことは 3 剤併用療法においても同様と考えられる。テラプレビル (TVR) を含む新規 3 剤併用療法では，2 剤併用療法無効症例への投与であったにもかかわらず，1 例に SVR を得られた。このことより，3 剤併用療法は肝移植後 HCV 再燃に対する非常に有用な治療であり，今後推進していくべき治療と考えられる。TVR はその薬理作用上，免疫抑制剤と併用した場合，免疫抑制剤の血中濃度が著しく上昇することが知られており，肝移植後の使用は困難であるとされていた。本研究では，より影響の少ないシクロスポリンへの変更，頻回の薬剤濃度モニタリングと慎重な薬剤投与量調節により安全に併用できることが示された。しかしながら，2 例目の経過は，これら薬剤の併用は免疫抑制剤のみならず，TVR の血中濃度をも上昇させ，副作用を誘発することを示唆している。安全かつ効果的な 3 剤併用療法を行うために本知見は重要であり，今後，プロトコルの確立には免疫抑制剤と TVR 両方の血中濃度モニタリングを前提とした薬剤調整を組み

込む必要があると考えられる。

E. 結論

IFN 長期投与療法は生体肝移植後 HCV 再感染に対して有効な治療法である。IL-28B 遺伝子多型および RBV のアドヒアランスが SVR 達成の因子であり，IFN 療法適応および実施の標準化の際に考慮されるべきと考えられる。また TVR を用いた 3 剤併用療法は将来有望な治療法であり，血中濃度モニタリングに基づいた薬剤調整がその実施において重要と考えられた。

F. 研究発表

【論文発表】

1. Kawaoka T, Takahashi S, Tatsukawa Y, Hiramatsu A, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Ishiyama K, Ide K, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. Two patients treated with pegylated interferon/ribavirin/telaprevir triple therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Hepatol Res.* 2014 Jan 2. [Epub ahead of print]
2. Egawa H, Teramukai S, Haga H, Tanabe M, Mori A, Ikegami T, Kawagishi N, Ohdan H, Kasahara M, Umeshita K. Impact of rituximab desensitization on blood-type-incompatible adult living donor liver transplantation: a Japanese multicenter study. *Am J Transplant.* 14(1): 102-14. 2014
3. Ohdan H. Is living donor liver transplantation really equivalent to deceased donor liver transplantation? *Transpl Int.* 26(8): 778-9. 2013
4. Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, Ohdan H, Tzakis AG. Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells via interferon- γ production. *Transplant Proc.* 45(5): 2045-50. 2013
5. Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Attenuation of portal hypertension by continuous portal infusion of PGE1 and immunologic impact in adult-to-adult living-donor liver transplantation. *Transplantation* 95(12): 1521-7. 2013
6. 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* 43(7): 732-40. 2013
7. 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
8. 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

【学会発表】

1. 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
2. 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
3. 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

4. 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
5. 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
6. 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

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

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。

A. 研究目的

C型肝炎患者における IL28B 遺伝子多型が、インターフェロン(IFN)を中心とした抗ウイルス療法の効果を推察する上で有効な指標となることが明らかにされているが、そのメカニズムは未だ十分に解明されていない。また、C型肝炎患者に高率に合併する HCC との関係についても不明なままである。そこで、研究分担者(太田哲生)は、当施設の消化器内科(金子周一、本多政夫)および形態病理学(中沼安二)と共同で、C型肝炎における IL28B 遺伝子多型の意義について分子レベルでの解明を進めた。IL28B 遺

伝子多型とC型肝炎治療抵抗性のメカニズムと肝細胞癌(HCC)再発との関係を明らかにすることは、厚生労働省がC型肝炎対策の指針を作成する上で、重要な指標を提示することが可能となることが期待される。

B. 研究方法

当院で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．

（倫理面への配慮）金沢大学倫理委員会の承認のもと患者の承諾を得て研究を実施した．

C. 研究結果

多変量解析を行った結果，IL28B 遺伝子多型は早期肝細胞癌再発の有意な独立した因子と判定された．C 型肝炎に対する抗ウイルス療法で SVR が得られやすいメジャーアレル型は，マイナーアレル型に比べて有意に HCC 治療後の早期再発率が高かった．即ち，抗ウイルス療法

に抵抗性のマイナーアレル型の方が，早期 HCC 再発率が有意に低かった．

そのメカニズムを考察する上で，いくつかの注目すべき知見が得られた．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 の発現が亢進し，実際に T リンパ球やマクロファージの浸潤が亢進していた．また，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 Regulatory T cell (Treg) の比率が上昇していた．

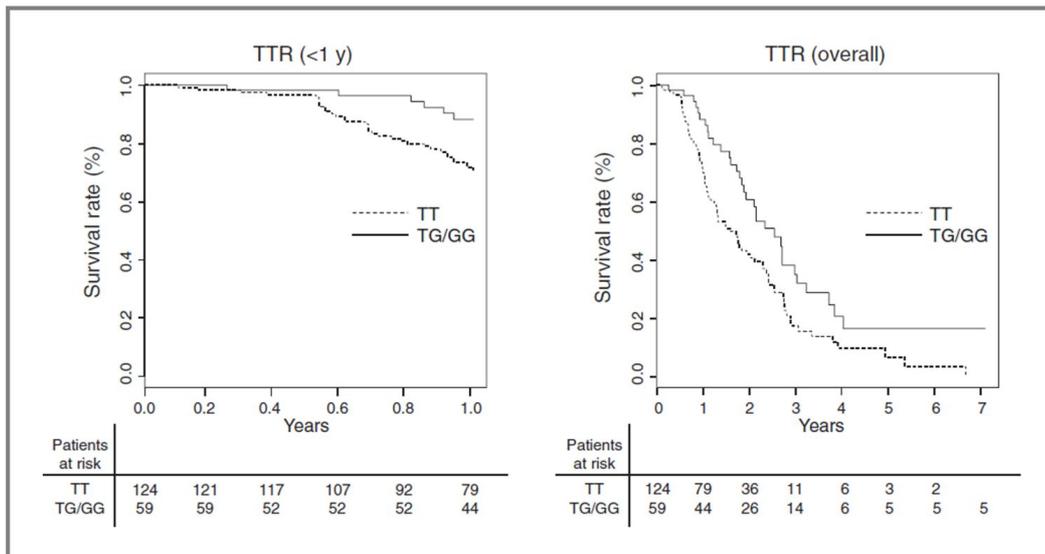


図3. C型肝炎におけるIL28B 遺伝子多型と肝細胞癌(HCC)術後の無再発生存期間の関係
TTR: Time to recurrence,
TT: IL28B major genotype (rs8099917), TG/GG: IL28B minor genotype (rs8099917)

D. 考察

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ー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。

E. 結論

IL28B 遺伝子多型がメジャーアレル型はマイナーアレル型に比べて、HCV に対する抗ウイルス療法における SVR 率が有意に高いが、その一方で、治療後の HCC 早期再発のリスクはむしろ高いことが明らかとなった。

F. 研究発表

【論文発表】

1. 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 α -SMA positive cancer associated fibroblast. *Oncology Report* 30(4): 1561-1574, 2013
2. 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

【学会発表】

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，大西一郎，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 日

**G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)**

該当なし。

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

研究分担者 森 正樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学 教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1999 年より 2008 年の間に行われた成

人間生体肝移植 85 例中、HCV 肝炎陽性 31 例のうちで、ABO 不適合肝移植症例、HBV との混合感染症例、ステロイドを術中 1g のみ使用した症例を除く 28 例を対象とした。抗ウイルス治療は、術後肝機能が安定し次第速やかに低用量 (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. Laparoscopy-assisted hybrid left-side donor hepatectomy. *World J Surg* 37(9):2202-2210, 2013
2. 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
3. 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

[学会発表]

国際学会

1. Kobayashi S, Mori M, et al. Liver transplantation for alcoholic liver cirrhosis. 13th Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.
2. 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.
3. Wada H, Mori M, et al. Incidence and management of cytomegalovirus infection after living donor liver transplantation. 13th

Congress of Asian Society of Transplantation. 2013/9, Kyoto, Japan.

4. 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.
5. 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.

国内学会

1. 和田浩志, 森 正樹,他. 肝移植後のサイロ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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 津田雄二郎, 森 正樹,他. 肝移植後のサ

イトメガロウイルス(CMV)感染症対策と現状. 第 49 回日本移植学会総会, 2013/9, 京都.

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

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型肝硬変肝癌発症・非発症サンプルのプロテオーム解析

**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

定量プロテオミクスの手法を用いて、C型肝硬変、肝癌非発症サンプル5検体、C型肝硬変、肝癌発症サンプル5検体、正常肝サンプル2検体間のタンパク質発現の比較定量を行った結果、1833個のタンパク質が同定された。そのうち肝癌非発症/肝癌発症の発現比が2倍以上のタンパク質が34個、0.5倍以下のタンパク質が8個同定された。これらのマーカー候補タンパク質は、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になると考えられる。

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。

本年度は前年度までに構築した多検体臨床サンプルを用いたプロテオーム解析システムを用いて、C型肝硬変、肝癌非発症サンプル5検体、C型肝硬変、

肝癌発症サンプル5 検体、正常肝サンプル2 検体間のタンパク質発現の比較定量を遂行した。次項にその詳細を記す。

B. 研究方法

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型肝硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝炎硬変・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。

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。

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 分画した後に 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。

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) でピーク情報の取得を行い、同定には Mascot (version 2.4) サーチャエンジンを用いた。同定結果の統計処理には 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、検体の個人情報が出漏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型肝炎硬変・肝癌非発症サンプル、C型肝炎硬変・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型肝炎硬変・肝癌非発症サンプルとC型肝炎硬変・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型肝炎硬変・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

予想通り、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。

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、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変動しているタンパク質群の同定に成功した。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. 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.
2. 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 I α and FAM83H in colorectal cancer. Journal of cell science, 126 (20), 4721-4731, 2013.
3. 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.
4. 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.

[学会発表]

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. Watanabe R, Hashimoto Y, Kishida M, Matsubara M, Adachi J, Tomonaga T, Phospho-profiling of mTOR inhibitor-treated renal cell carcinoma (RCC) cell lines and its application for drug response-efficacy biomarkers, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan,

- 2013年9月14日-18日
8. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Matsubara H, Tomonaga T, A Novel Mechanism of Keratin Cytoskeleton Organization Through Casein Kinase I Alpha and FAM83H in Colorectal Cancer: Interactome Analysis of FAM83H, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013年9月14日-18日
 9. Sano S, Tagami S, Yoshizawa-Kumagaye K, Tsunemi M, Okochi M, Tomonaga T, Absolute quantitation of plasma biomarker peptides APL1b for Alzheimer disease at fmol/ml level using SRM, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013年9月14日-18日
 10. Nagano M, Kuga T, Adachi J, Tomonaga T, A Kinase Activity-Estimating Method Using LC-MS/MS, Human Proteome Organization (HUPO) 12th Annual World Congress, Yokohama, Japan, 2013年9月14日-18日
 11. 朝長 毅:質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化、第11回 北里疾患プロテオミクス研究会、東京、2014年3月28日
 12. 久家 貴寿, 久米 秀明, 川崎 直子, 足立 淳, 星野 敢, 松原 久裕, 齊藤 洋平, 中山 祐治, 朝長 毅: 大腸癌細胞におけるFAM83H と casein kinase I α を介したケラチン骨格制御機構の解明、第36回日本分子生物学会、神戸、2013年12月3-6日
 13. 朝長 毅:質量分析計を用いたバイオマーカー定量法の実用化への挑戦、第10回 千葉疾患プロテオミクス研究会、東京、2013年11月9日
 14. 白水 崇, 足立 淳, 八木 滋雄, 朝長 毅: マウス同所移植モデルによる大腸癌高浸潤性細胞のプロテオーム解析、第72回日本癌学会学術総会、横浜、2013年10月3-5日
 15. 村岡 賢, 久米秀明, 西塚 哲, 若林 剛, 星野 敢, 松原久裕, 朝長 毅: 自己抗体ファージライブラリを用いたスキルス胃癌の診断バイオマーカーの探索、第72回日本癌学会学術総会、横浜、2013年10月3-5日
 16. 足立 淳, 朝長 毅: ターゲットプロテオミクス~Beyond SRM~, 第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月13日

**G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)**

該当なし

移植後ウイルス血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

研究分担者 下達野 邦忠 国立国際医療研究センター 特任部長

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染、増殖を制御する宿主因子を解析して、ウイルス血症が起こる機構を明らかにする事を目指した。ウイルス感染、ゲノム複製、粒子放出の過程で、特にウイルス感染初期過程について解析を進めた。これまでにウイルスの受容体として CD81, Claudin-1, SR-BI, LDLR などが知られているが、VLDLR もウイルス感染を促進する因子である事を見いだした。培養細胞 HuH7.5 では通常の条件では VLDLR を発現していない。しかし、低酸素条件にすると産生が誘導される事を見いだした。低酸素条件下培養で HCV 感染効率が増加した。

VLDLR が HCV 感染に重要である事は、VLDLR を発現する細胞を抗 VLDLR 抗体処理すると感染が阻害される事、VLDLR を発現していない HuH7 細胞に VLDLR を外来的に発現させると感染が増加する事から示された。また、VLDLR を介する感染は抗 CD81 抗体処理によっても低下しない事から、これまで明らかにされているものとは別の感染機構によるものと考えられた。生体内における酸素濃度が HCV の感染性を変化させると考えられる本実験結果は、ウイルス血症を引き起こす要因のひとつになり得ると考えられる。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）感染による肝疾患増悪の結果肝移植を受けた患者の中には移植後に HCV が再活性化され、慢性肝炎を再発するようになる場合が多い。免疫抑制剤投与によるために、ウイルス増殖が許容される環境に曝されたためと考えられ、ウイル

ス血症を呈するようになる。近年インターフェロン、リバビリン以外にウイルスタンパク質の機能を直接抑制する薬剤(DAA)が上市されてきており、インターフェロンが使用できない場合でもウイルス血症を抑える選択肢が増えつつある。しかし、これらの薬剤も副作用の問題があるために、全て

の患者に有効とはいえないのが現状である。

HCV の感染、増殖には種々の宿主因子が関与している。その中でもウイルスの複製を積極的に抑制する宿主因子が明らかになれば、その因子の活性化を通して、ウイルス血症に対処することができる可能性がある。一方、ウイルス感染細胞の肝組織内環境の変化もウイルス産生に影響を与える可能性が高い。本研究では、生体内の肝組織の酸素暴露条件を培養細胞で模擬し、その条件下における HCV 感染を調べ、酸素分圧がウイルス感染に与える影響を調べた。

B. 研究方法

HCV はヒト肝臓細胞に特異的に感染する。その際に、細胞膜表面に存在する数種類の蛋白質がウイルスの受容体あるいは感染促進作用を持つ。試験管内での HCV の感染、増殖を解析する方法として、HuH7.5 細胞への HCV クローンのひとつである JFH1 感染実験がある。この系は他の方法に比べ、感染効率、複製効率およびウイルス粒子放出効率が高いために、ウイルスの研究によく用いられているが、生理的条件下での感染、増殖を考える時に、この系が最適であるかは不明である。また、細胞の培養条件の違いでもウイルス感染性は変化すると考えられるので、試験管内での感染の解析には、細胞の培養条件の検討も重要な要因のひ

とつである。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あるので、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た。

その中でも、酸素分圧を変化させたときの HCV 感染変化を調べる事にした。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る。

- (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。

(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) 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、通常の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 VLDLR 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 VLDLR 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

低酸素条件下ではウイルスゲノム複製が亢進する。一方、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、低酸素条件下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

HCV 感染の分子機構を解析し、低酸素条件下で誘導される VLDLR 発現が感染促進因子として働いている事を明らかにした。この因子を介した感染は、CD81 を必要としないので、新たな感染経路であると考えられる。このような感染様式が生体内の低酸素条件下で存在し、ウイルス血症の要因のひとつになると考えられる。

F. 研究発表

[論文発表]

1. 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
2. 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
 3. 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.

[学会発表]

1. 宇治野 真之、西辻 裕紀、清水 洋子、山本 裕美、鈴木 律子、月本 あつ子、日紫喜 隆行、高久 洋、下遠野 邦忠・低酸素培養条件下における新たな HCV 感染様式・第 61 回日本ウイルス学会学術集会・神戸国際会場・平成 25 年 11 月 10-12 日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

該当なし

