

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 23-25 年度

総合研究報告書

研究代表者 上本 伸二

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 総合総括研究報告

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

II. 総合分担研究報告

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
臨床的ならびに基礎的研究
上本伸二・千葉 勉・上田佳秀・丸澤宏之・増田智先 ----- 39
2. 生体肝移植後の C 型肝炎ウイルス再感染に対する IFN 治療効果の検討
および新規治療法の開発
大段秀樹 ----- 57
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
(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 ----- 67
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
preemptive 抗ウイルス療法の意義に関する研究
森 正樹 ----- 73
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 ----- 77
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 ----- 87

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 95

I . 総合総括研究報告

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。

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ならびに有害事象の解析から、以下の点が明らかになった。ウイルス排除 (SVR)率は 43～48%であり、SVR の予測因子として、C 型肝炎ウイルス(HCV) 遺伝子型、血中 HCV-RNA 量、IL28B 遺伝子多型の組み合わせの 3 点が同定された。また、多様な重大な有害事象が生じていることが明らかとなった。中でも、肝移植症例特有の有害事象として慢性拒絶が 7 例 (6%) に、de novo 自己免疫性肝炎が 4 例に生じていた。慢性拒絶の危険因子として、治療中の免疫抑制剤の減量と治療開始前の線維化が軽度であることの 2 点が同定された。

以上のように、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 B 型肝炎ウイルス(HBV)再発予防法の効果を明らかにするため、京都大学で行われた HBs 抗原陽性レシピエントに対する肝移植例ならびに HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植例に対する B 型肝炎ウイルス再発予防法の効果について検討した。HBs 抗原陽性レシピエントに対しては、エンテカビルと高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン製剤(HBIG)の併用療法が従来のラミブジンと HBIG の併用療法と同等の効果と安全性を有することが明らかとなった。HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後のレシピエントにおいては HBIG による予防を行ってきたが、25%において HBV の活性化を認めた。原因として、HBs 抗体エスケープ変異株の出現が大きな問題であった。さらに、肝移植後 HBV 再発予防法を最適化することを目的とし、B 型肝炎ワクチンの効果について検討を行った。その結果、HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植レシピエント、ならびに HBV による急性肝不全症例に対しては、短期間で高率に HBs 抗体の獲得が可能であり、HBIG の中止が可能であった。肝移植後 HBV 対策法として、B 型肝炎ワクチンを含めた予防法を確立した。

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 プロテオーム
ジェノム 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

(H23-24 年度 研究分担者)

丸澤 宏之：京都大学大学院医学研究科
消化器内科学講座 講師

(H25 年度 研究分担者)

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、治療効果に關与するウイルス側、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-a. 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ならびに有害事象の解析

(1) 京都大学において、2001年から2011年6月までに行われた肝移植後C型肝炎再発に対する抗ウイルス治療施行例125例の治療効果と有害事象を明らかにし、これらに關与する因子について解析を行った。

(2) 広島大学において、2000年から2013年1月までにHCV關連肝疾患に対し肝移植を施行され、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剤併用療法を開始した。

(3) 大阪大学において、1999 年より2008 年の間に大阪大学にて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 1 g 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。

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+リバビリン治療の導入方法の確立と効果・安全性の解析

(1) 京都大学において、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、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) 広島大学において、肝移植後HCV再燃症例で術後2剤併用療法が無効であった2例にテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン治療を施行した。3剤併用療法は12週間施行後、ペグインターフェロン+リバビリンを36週間行った。免疫抑制剤は事前にシクロスポリンに変更、低容量から開始し、開始後は血中濃度モニタリングによる頻回の薬剤量調整を行った。

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HCV補助免疫療法の併用療法

従来のDFPP膜ではフィブリノーゲンの損失が大きく、肝移植中の使用時には問題となる。そこで広島大学において、肝移植中の使用目的に新規DFPPを旭化成メディカル株式会社の協力のもと開発した。本機器はISO10993に基づく安全試験を医療機器GLP施設で実施し、特に問題を認めなかった。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、フィブリノーゲンの損失を抑えつつ、従来品と同等の膜前後のウイルス除去能を持つこと確認した。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病日前に4時間のDFPPを施行し安全性確認(PhaseI)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, 術後血中HCV RNA 量を検討した.

2. 肝移植後 B 型肝炎についての臨床研究

2-a. HBs 抗原陽性レシピエントに対する高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン製剤 (HBIG) とエンテカビルの併用療法の効果

2002年9月から2010年12月までに当院にてHBIG+エンテカビルの予防投与を行ったHBs抗原陽性レシピエントに対する肝移植後の経過について解析した。

2-b. HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後 B 型肝炎ウイルス活性化の現状

1995年7月から2008年8月までに当院にてHBIGの予防投与を行ったHBc抗体陽性ドナーからHBs抗原陰性の肝移植レシピエント75例について、肝移植後のHBV活性化について解析を行った。

2-c. 肝移植後HBV再発予防としてのB型肝炎ワクチンの効果

京都大学にて2012年9月までにB型肝炎ワクチン投与を行った肝移植後症例55例 (HBV陽性レシピエント36例、HBc抗体陽性ドナーからの肝移植後レシピエント19例) の効果について解析を行った。

3. 肝移植後 C 型肝炎・B 型肝炎についての基礎研究

3-a. 次世代ゲノムアナライザーを用いたHBV遺伝子解析: 肝移植症例ならびにB型慢性肝炎症例の血中ならびに肝組織に存在するHBVクローンの多様性の特徴と薬剤耐性変異を持つHBVの存在様式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。血中ならびに肝組織から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の多様性や薬剤耐性変異を含む既知のHBV変異解析を行った。また、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、同様に次世代ゲノムアナライザー解析を行った。

3-b. 次世代ゲノムアナライザーを用いたHCV遺伝子解析: C型慢性肝炎症例においてもHBVの場合と同様に、血中ならびに肝組織に存在するHCVクローンの多様性の特徴ならびにインターフェロン治療前後の多様性の変化を明らかにするため、次世代ゲノムアナライザーを用いて解析を行った。さらに、HCV陽性肝移植症例の血中ならびに肝組織に存在するHCVクローンの多

様性の特徴ならびに肝移植後の変化を明らかにするため、同様に次世代ゲノムアナライザー解析を行った。

3-c. 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

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。

3-d. 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) HCV感染細胞を取り囲む肝非実質細胞とのクロストークを介した、感染細胞の変化の解析：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。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。次に、それが何に起因するか、生理活性を示すか否かについても

調べた。さらに、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。

(2) HCV感染初期過程の解析（特に酸素分圧の違いによるHCV感染様式の解析）：試験管内感染系として出来るだけ生体に近い条件でのHCV感染を調べる事を目的として、低酸素条件下におけるHCV感染、複製を調べた。次に、低酸素時において細胞表面に発現誘導されウイルス感染に関与する因子、ならびにその因子とHCV感染の分子機序を明らかにした。

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型肝炎に対するペグインターフェロン+リバビリン治療の効果ならびに有害事象の解析

(1) 京都大学において、肝移植後C型肝炎再発に対する抗ウイルス治療施行例125例のうち、現在治療中の症例8例を除く117例中、ウイルス排除(SVR)に至った症例は50例であり、SVR率は43%であった。有害事象による中止例は26例(22%)と高率であった。SVRの予測因子として、HCV遺伝子型が非1型であること、移植前のHCV-RNA量が低値であることの2点が同定された。有害事

象発現の予測因子は同定されなかった。

次に、有害事象を解析した結果、21例(17%)において、多様な重大な有害事象が生じていることが明らかとなった。中でも、肝移植症例特有の有害事象として慢性拒絶が7例(6%)に、de novo自己免疫性肝炎が4例に生じていた。慢性拒絶例7例中6例が致死的であった。慢性拒絶を発症した7例と、抗ウイルス治療を1年以上行い慢性拒絶を認めなかった76例を比較した結果、治療中の免疫抑制剤の減量と治療開始前の線維化が軽度であることの2点が危険因子として同定された。

(2) 広島大学において、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。累積生存率の検討では、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。 Kaplan-Meier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

死であった。 IL28B遺伝子多型とSVR率の関連に関して検討を行った。

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。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

($P=0.026$)。 IFN長期投与後再燃に寄与する因子の検討では長期投与完遂例でVirological Response(VR)が得られた症例は16例、その内SVR13例と再燃3例で寄与因子を比較した。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。

(3) 大阪大学における、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ついて解析した。

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。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、低用量 preemptive ペグインターフェロン+リバビリン治療施行 (P=0.001)、S 群 (P=0.026)、急性拒絶反応 (P<0.001) であった。

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+リバビリン治療の導入方法の確立と効果・安全性の解析

(1) 京都大学において、肝移植後C型肝炎症例9例に対して、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。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 (トラフ値 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。

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。

(2) 広島大学において、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・12週施行後、ペグインターフェロン+リバビリンを36週行い、4週目でウイルス陰性化を認めSVRを得た。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。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。副作用による中止時のテラプレビルのAUC24hは同量のテラプレビル投与を

行っている慢性肝炎患者の中央値の2倍であった。

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

生体肝移植後C型肝炎に対する抗ウイルス療法でSustained virologic response (SVR)が得られたのはIL28B遺伝子多型(rs8099917)がメジャーアレル(TT)型のレシピエントのみであった。C型肝炎に対する抗ウイルス療法でSVRが得られる条件は、IL28Bメジャーアレル型であること、肝IFN-stimulated genes (ISGs)の発現が低値であること、HCVのISDR mutationが1以下であることが重要であった。IL28Bメジャーアレル型では肝組織内のISGs発現は、IFN β とは無関係で、主にIFN λ 2/3により制御されている。一方、マイナーアレル型では、他の因子(IFN λ 4)の関与が示唆された。C型肝炎に対する抗ウイルス療法でSVR率の高いIL28B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 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 HCV 補助免疫療法の併用療法

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、感染を確認した。第2症例目での術中のHCV経過を図8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病日には血中に2.6log/mlのHCV-RNAを認め、HCVの再増殖を認めた。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 ± 0.41 → 6.58 ± 0.63 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→6.2, 3.9→3.0logIU/ml)。

2. 肝移植後B型肝炎についての臨床研究 2-a. HBs 抗原陽性レシピエントに対する高力価 HBs 抗体含有免疫グロブリン製剤 (HBIG) とエンテカビルの併用療法の効果

HBs 抗原陽性レシピエントに対する生体肝移植後に、HBIG+エンテカビルを使用したHBV活性化予防法を26例に行った。1年生存率ならびに3年生存率はいずれも73%であった。中央値25.1ヶ月の観察期間内にHBV再発は認めなかった。これらの予防薬による有害事象は認めなかった。HBIG+ラミブジンによる予防策を行った63例と比較して、生存率とHBV再発率のいずれも有意な違いを認めなかった。

2-b. HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後B型肝炎ウイルス活性化の現状

HBs 抗原陰性・HBc 抗体陽性ドナーからの肝移植後の長期経過について検討した。HBIGの予防投与を行ったHBc抗体陽性ドナーからの肝移植レシピエント75例中19例(25%)でHBV活性化を認めた。原因は、HBs抗体エスケープ変異株出現が7例、HBIGの投与中断

が 8 例、不明が 4 例であった。HBs 抗体エスケープ変異株は、肝移植後 15.7～54.9 ヶ月で活性化し、HBs 抗体と HBs 抗原が共に陽性であった。HBV 活性化早期にエンテカビルを投与した 4 例は全例で HBs 抗原が陰性化したのに対し、他の 3 例は B 型慢性肝炎へと移行した。以上より、HBIG 投与により HBs 抗体陽性が維持されている症例でも HBs 抗体エスケープ変異株による *de novo* B 型肝炎が生じること、発症早期のエンテカビル投与が効果的であることが明らかとなった。

2-c. 肝移植後HBV再発予防としてのB型肝炎ワクチンの効果

HBIGを中止する方法として、レシピエント自身の免疫反応によってHBs抗体の獲得することを目的に、B型肝炎ワクチン投与を行った。HBc抗体陽性ドナーから肝移植を受けたレシピエント19例、HBVによる急性肝不全レシピエント12例、ならびにHBVによる肝硬変レシピエント24例を対象とした。これらの症例に対して、B型肝炎ワクチン20 μ gを月1回投与し、HBs抗体価の推移を観察した。HBs抗体が200mIU/mL以上に上昇し、HBIGの投与を中止できた症例を成功例とした。その結果、B型肝炎ワクチン成功例は、HBc抗体陽性ドナーから肝移植を受けたレシピエント19例中14例(74%)、HBVによる急性肝不全レシピエント12例中10例(83%)、HBVによる肝硬

変レシピエント24例中10例(42%)であった。HBs抗体獲得までのB型肝炎ワクチン投与回数の中央値は、HBc抗体陽性ドナーから肝移植を受けたレシピエントでは3回(2-5回)、HBVによる急性肝不全レシピエントでは3回(1-12回)、HBVによる肝硬変レシピエントでは10回(3-32回)であった。

3. 肝移植後 C 型肝炎・B 型肝炎についての基礎研究

3-a. 次世代ゲノムアナライザーを用いたHBV遺伝子解析

HBV の次世代ゲノムアナライザー解析の結果、血中と肝組織に存在する HBV はいずれも多様性に富んでおり、大部分の多様性は 1 塩基変異であった。変異は HBV 遺伝子のすべての領域に認められた。抗 HBV 作用を持つ核酸アナログ製剤であるラミブジン、アデフォビル、エンテカビルに対する薬剤耐性変異やプレコア変異、コアプロモーター変異、HBs エスケープ変異を持つウイルスが各症例で種々の割合で存在していることが明らかとなった。これらの薬剤耐性変異株は、治療中の症例だけでなく、未治療症例においても存在しており、核酸アナログ投与によってこれらの耐性変異を持つ HBV が選択的に増殖することが薬剤耐性獲得のメカニズムであると推測された。

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 抗体陽性健康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。

3-b. 次世代ゲノムアナライザーを用いた HCV 遺伝子解析

C 型慢性肝炎症例においても HBV の場合と同様に、血中ならびに肝組織に存在する HCV クローンの次世代ゲノムアナライザー解析を行った。その結果、血中と肝組織に存在する HCV は多様性に富んでおり、いわゆる quasispecies の全容が明らかになった。Shannon entropy 値で計算される

genetic complexity について、治療前においてはインターフェロン感受性例と非感受性例では相違は認めなかった。しかしながら、治療開始 1 週間後には、インターフェロン感受性例では著明な genetic complexity の低下を認めることが明らかになった。さらに、HCV に対するプロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤などの DAA に対する薬剤耐性変異の存在について解析した結果、これらの薬剤を投与していない症例全例で種々の割合で薬剤耐性変異をもつ HCV が存在していることが明らかになった。

さらに、HCV 陽性肝移植症例における血中ならびに摘出肝組織における次世代ゲノムアナライザー解析を行った。その結果、血中と肝組織に存在する HCV はいずれも多様性に富んでいるが、ウイルスの配列やその割合は血中と肝組織でほぼ同一であった。特に、薬剤耐性変異やインターフェロン効果を規定する HCV 遺伝子の変異部位においては、存在するウイルス株の比率は血中と肝組織でほぼ同一であった。Shannon entropy 値で計算される血中の HCV の genetic complexity について解析した結果、肝移植前と比較して肝移植後 4 週間では著明な genetic complexity の低下を認めることが明らかになった。すなわち、肝移植後の HCV 再感染ならびに複製過程においては特定の HCV クローンが増加して

いると考えられた。次に、再感染・複製能の強い HCV の遺伝子配列の特徴について解析を行ったが、多くの症例に共通する特定の配列の変化は同定できなかった。一方、肝移植前にはすべての症例で HCV の構造蛋白質領域の遺伝子を欠く欠損 HCV が存在していたが、肝移植後の再感染・複製過程では欠損 HCV が検出されなくなり、全長配列の HCV が優位に増加することが明らかとなった

3-c. 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

臨床サンプルの大規模比較定量解析システムの構築に関しては、アミン特異的安定同位体標識タグである iTRAQ 試薬を導入し、一度に 4 検体を同時定量することが可能になった。また iTRAQ 試薬による定量解析を複数回行うことで、4 検体以上の比較定量を行うことが可能であるが、実際に、複数回の解析データを統合して解析を行うために、Proteome Discoverer (version 1. 3)を導入し、32 検体同時に解析することができることを確認した。

次に 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 検体について定量プロテオーム解析を行った。その結果、1833 個のタンパク質が同定された。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。

3-d. 移植後ウイルス血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) JFH1/HuH7 とヒト肝臓由来星細胞 (LX2) の混合培養により培地中に MIP-1beta の発現が観察された。MIP-1beta は CCR5 のリガンドとして働く事が知られている。CCR5 を産生する細胞に対する遊走実験を行ったところ、誘導産生された MIP-1beta に CCR5 産生細胞の誘引作用のある事が分かった。LX2 培養上清に分泌される IL-1alpha が HCV 感染細胞から MIP-1beta 産生を誘導する事が分かった。次に、肝星細胞の活性化と 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。さらに、HCV 感染細胞が産生する転写因子、C/EBPbeta が MIP-1beta 産生に関与している事を見いだした。混合培養により HCV 感染細胞から産生される因子は MIP-1beta 以外に、C/EBPbeta により転写活性化される他のサイトカイン (IL-6, IL-8,

CXCL2, MIP-1 α)なども存在した。これらの結果から、HCV感染細胞は肝星細胞とサイトカインを介したクロストークをしており、それが感染肝細胞の運命を決め、その結果ウイルスの産生に影響を与えると考えられた。

(2) 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を感染させ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。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。一方、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ことも明らかになった。このVLDLRを介したHCV感染にCD81は必要ない事が分かった。これらの結果から、生体内組織の酸素分圧を考慮すると、肝臓へのHCV感染は通常の条件下での培養細胞への感染とは異なる可能性が考えられた。

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+リバビリン療法の治療成績は満足できるものではなく、肝移植成績改善のために、より有効で有害事象の少ない治療法の確立が急務であると考えられた。治療効果予測因子の解析結果から、HCV遺伝子型非1bに対する治療成績は非常に良好であること、IL-28B遺伝子多型の組み合わせがSVR達成の因子となることなどが明らかとなり、個々の症例に応じた治療適応や治療法の検討が治療成績を向上させる可能性が示唆された。一方、肝移植後C型肝炎再発に対する治療によって多数の重篤な有害事象が生じることが明らかとなった。中でも、慢性拒絶反応とde novo自己免疫性肝炎が肝移植症例に特異的な有害事象として生じることがわかった。慢性拒絶は発症すると致死的であるため、予防ならびに早期発見が重要である。今回、慢性拒絶例の特徴として、治療中の免疫抑制剤減量と治療開始前の線維化が軽度であることの2点が明らかとなった。このことから、慢性拒絶を予防するためには、抗HCV治療中の免疫抑制剤減量を避けること、線維化が進んでいない状態での容易な抗HCV治療導入は行わないことが重要と考えられた。

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有害事象が多いことを明らかになったため、治療効果の改善のためには、テラプレビルを含むDAAの使用が望ましいと考えられた。DAA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可能性もある。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。

また本研究では、肝移植中DFPP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、また術後早期血中HCV量が術前値より低値に抑えられることが明らかとなった。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ため、術早期の抗HCV治療の追加が必要と考える。

2. 肝移植後B型肝炎についての臨床研究

HBs抗原陽性レシピエントに対する肝移植後にはHBIG+核酸アナログ製剤（エンテカビルまたはラミブジン）にてB型肝炎再発予防が可能である。一方、HBc抗体陽性ドナーからの肝移植レシピエントに対してHBIGの投与が行われてきたが、HBs抗体エスケープ変異株の活性化によりB型肝炎が発症することが明らかとなった。肝移植後HBV活性化に対するより適切な対策法の確立のため、B型肝炎ワクチンは非常に有効な方法であることが明らかとなった。特に、HBc抗体陽性ドナーからの肝移植レシピエント、ならびにHBVによる急性肝不全症例に対しては、短期間で高率にHBs抗体の獲得が可能であり、今後、積極的に導入すべきである。一方で、

HBV による肝硬変レシピエントに対する B 型肝炎ワクチンの効果は低く抗体獲得には長期間の投与を必要とするため、さらなる対策法が必要であると考えられる。

3. 肝移植後 C 型肝炎・B 型肝炎についての基礎研究

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 HCV ならびに HBV 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 *in vitro* での基礎研究を行い、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多くの新しい知見を得た。

肝移植前後の HBV ならびに HCV の次世代ゲノムアナライザーによる解析により、肝炎ウイルス遺伝子配列の包括的かつ大規模な解析が可能であった。まず、血中と肝組織中の HBV や HCV の存在様式は同様であることを明らかにし、血中でのウイルス遺伝子解析が有用であることが確認された。HBV、HCV ともに、薬剤耐性ウイルスが投与前から低頻度ながら存在する症例が多数認められた。これらの薬剤耐性ウイルスの存在が、肝移植後の予防薬投与下での HBV 再活性化や HCV 治療抵抗性と関連している可能性が予測される。今後、治療効果予測へとつなげていくことが期待できる。

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であることが明らかになっている。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、より正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。この 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が、肝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た。

E. 結論

肝移植後 C 型肝炎ならびに肝移植後 B 型肝炎対策の現状を明らかにした。これまでの肝移植後肝炎ウイルス対策の効果は十分とは言えず、さらに有効で有害事象の少ない対策法の検討が必要であることが明らかになった。

肝移植後 C 型肝炎に対しては、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、現時点での肝移植後 C 型肝炎に対する標準的治療法は DAA + ペグインターフェロン + リバビリン治療

へと変化した。その際には、免疫抑制剤の治療薬物モニタリングによる厳密な調節が必要である。

肝移植後 B 型肝炎の予防策は、これまでの HBIG + ラミブジンに、エンテカビルと B 型肝炎ワクチンを加え、さらに有効かつ安全な対策が可能となった。

また、臨床研究と基礎研究の両面から治療効果予測、有害事象予測が可能となってきた。以上の結果を組み合わせることによって、今後、より有効で有害事象の少ない対策法が可能となり、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

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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.
- 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.
- Kikuchi M, Okuda Y, Ueda Y, Nishioka Y, Uesugi M, Hashimoto E, Takahashi T,