

肝炎症例に比べ奏効率は低い。そこで本研究では、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ことを目的として解析を行った。さらに新規治療として 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。また最近我々は、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可能であることを明らかとした。この知見をもとに肝癌合併肝移植症例に対して、移植後肝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が、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血清 HCV RNA 量が著明に減少すること、その一部は術後血中 HCV RNA 陰性が続くことが明らかとなった。そこで物理的に血中から HCV RNA を除去できる二重濾過血漿交換療法 (Double filtration plasmapheresis : DFPP)を肝移植術中に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行い、その安全性および効果を検討した。

## B. 研究方法

1. 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の検討  
2000 年から 2013 年 1 月までに HCV

関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 (PEG/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 $\alpha$ +RBV を原則として行い、pegIFN $\alpha$ は週一回、RBVは 200mg/日から始め 800mg/日へ増量した。

2. 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 剤併用療法が無効であった 2 例に TVR を含む 3 剤併用療法 (PEG/RBV/TVR)を施行した。3 剤併用療法は 12 週間施行後、pegIFN $\alpha$ +RBV 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。

3. 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(PhaseI/II)(図1)。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。

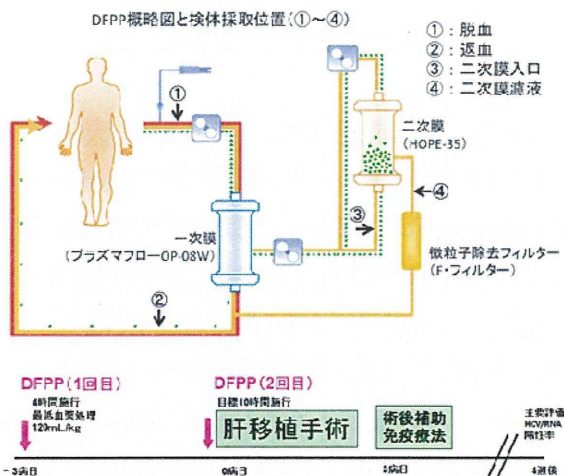


図1. DFPP 概略図とプロトコール

(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。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. 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の検討

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2)

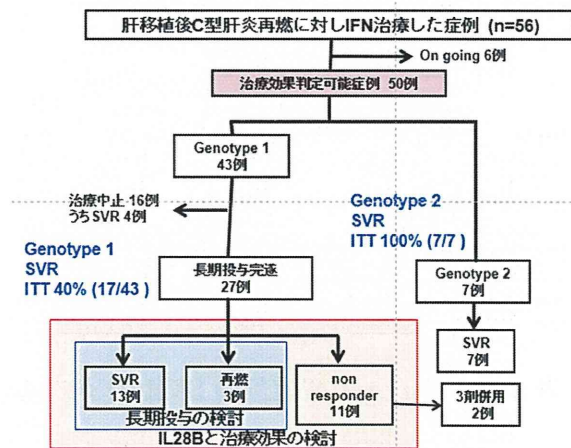


図2. 症例

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。(図 3)

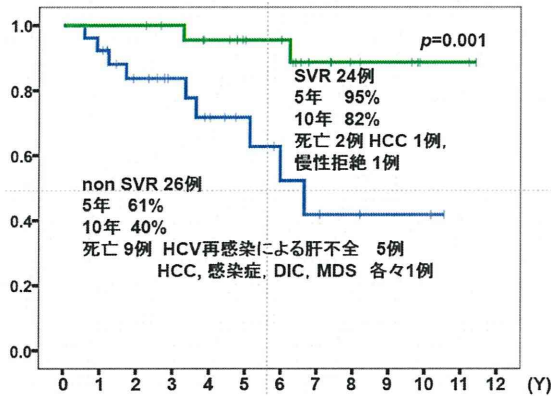


図 3. 累積生存率

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。(表 1)

	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 $\geq 70$ / <70 (%)	9 / 4	3 / 8	0.3
Adherence to RBV $\geq 50$ / <50 (%)	8 / 5	9 / 2	0.1

表 1. Genotype1 型症例の SVR 因子の検討

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 4)

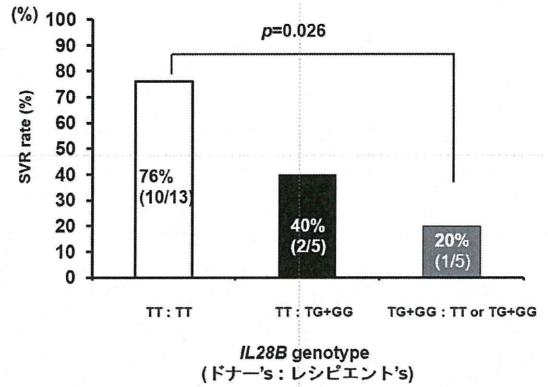


図 4. ドナー/レシピエントの IL28B 遺伝子多型の組み合わせ別 SVR 率

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。(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 SVR 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 $\geq 70$ / <70 (%)	9 / 4	3 / 0	0.9
Adherence to RBV $\geq 50$ / <50 (%)	6 / 7	0 / 3	0.2

表 2. IFN 長期投与後の再燃リスク因子

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

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, pegIFN  $\alpha$  + RBV を 36 週行い, 4 週目でウイルス陰性化を認め SVR を得た。(図 5)



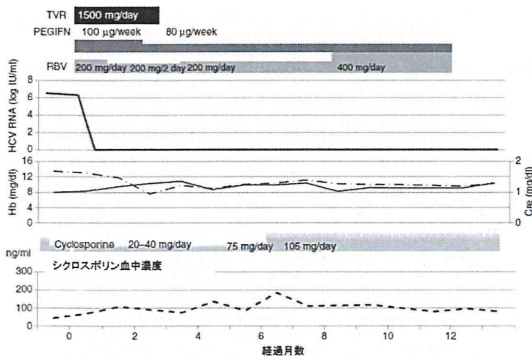


図 5. 3 剤併用療法 1 例目経過

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．（図 6）

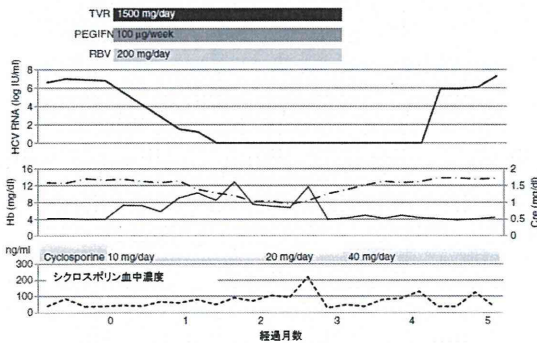


図 6. 3 剤併用療法 2 例目経過

副作用による中止時の TVR の AUC24h 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 7）

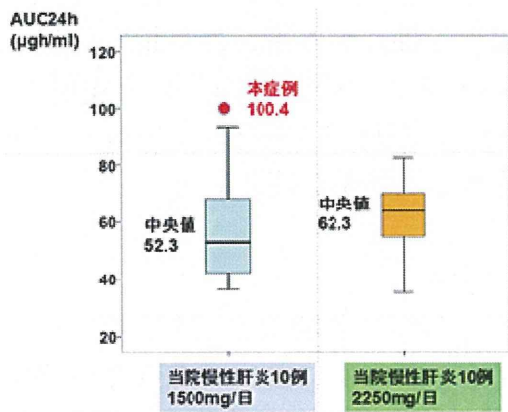


図 7. 慢性肝炎患者と 3 剤併用療法 2 例目の投与中止時の TVR 血中濃度の比較

### 3. 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．（表 3）

患者背景および治療成績		
	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
	手術時間	13時間
	DFPP施行時間	15時間
手術	手術時間	16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

表 3. 患者背景および治療成績

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  $5.34 \pm 0.41 \rightarrow 6.58 \pm 0.63 \text{ logIU/ml}$ ）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→6.2, 3.9→3.0logIU/ml)。

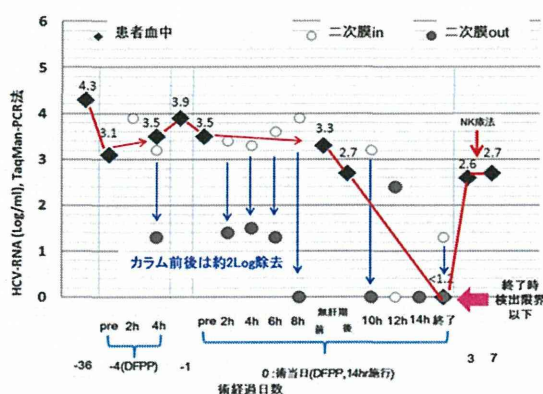


図 8. 第 2 症例目の術中・術後 HCV ウイルス量変化

#### 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 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、良好な結果が得られた。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。しかし本研究によりこれら薬剤の併用は免疫抑制剤のみならず、TVR の血中濃度を上昇させ、副作用を誘発することが明らかとなった。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および薬剤調整を組み込む必要があると考えられる。さらに将来的には、免疫抑制剤の影響を受けにくい第 2, 第 3 世代のプロテアーゼ阻害薬など新規 DAA を用いたプロトコルの開発が望まれる。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。現在の抗 HCV 治療においては IFN の使用が必須であるが、IFN は術後の慢性拒絶を惹起する恐れもあり、術早期には使用が難しい。そこで今後は DFPP と新規 DAA を用いた IFN フリー・プロトコルを組み合わせた治療が望まれる。

#### E. 結論

IFN 長期投与療法は HCV 慢性肝疾患に対する肝移植におい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。またテラプレビルを用いた 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実施において重要と考えられた。術中 DFPP による治療も将来有望であるが、新規 DAA を用いた周術期または術早期の IFN フリー・抗 HCV 治療の追加が望ましい。

## F. 研究発表

1. 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- $\gamma$  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. 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
8. 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
9. 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  $\alpha$ -2b to  $\alpha$ -2a and Ribavirin in Patients with Recurrence of Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection after Liver Transplantation: A Case Report. *Intervirolgy* 55(4) 306-10, 2012



10. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H.: Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol.* 2012 Feb;19(2):418-425.
  11. Yanai H, Chiba S, Ban T, Nakaima Y, Onoe T, Honda K, Ohdan H., Taniguchi T.: Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Jul 12;108(28):11542-11547.
  12. Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H.: Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation. *Transplantation.* 2011 Sep 15;92(5):575-580.
  13. Kawaoka T, Aikata H, Miyaki D, Murakami E, Azakami T, Takaki S, Nagaoki Y, Hashimoto Y, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H., Chayama K.: Eradication of hepatitis C virus genotype 1 after liver transplantation by interferon therapy before surgery: Report of three patients with analysis of interleukin-28 polymorphism, hepatitis C virus core region and interferon-sensitivity determining region. *Hepatology Res.* 2011 Nov;41(11):1126-1131
  14. Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H., Chayama K.: IL28B polymorphism may guide pegylated interferon plus ribavirin therapy even after curative treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat.* 2011 Oct;18(10):e550-560
  15. Tanaka Y, Tashiro H, Onoe T, Ide K, Ishiyama K, Ohdan H.: Optimization of immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living donor liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2012 Mar;44(2):555-559.
  16. 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
  17. 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
2. 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

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

11. 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

12. 大段秀樹: 肝移植後の肝癌/肝炎再発に対する免疫細胞療法. 第 47 回日本肝癌研究会, 静岡, 2011.7.28-29

13. 河岡友和, 高橋祥一, 三木大樹, 越智秀典, 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 治療と遺伝子多型の関連. 第 29 回日本肝移植研究会, 仙台, 2011.7.22-23

14. 大段秀樹: 肝癌/肝炎の根治を目指した肝移植後の免疫細胞療法. 第 39 回幹細胞治療フォーラム, 東京,

2011.7.21

15. 大段秀樹: 肝臓移植後の免疫モニタリングに基づく免疫抑制の最適化. 第 28 回日本 TDM 学会・学術大会, 広島, 2011.6.18-19

16. 田代裕尊, 相方浩, 谷本新学, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 茶山一彰, 大段秀樹: C 型慢性肝炎関連肝細胞癌切除後の PEG-IFN 療法による予後改善効果. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.6.2-3

17. 河岡友和, 相方浩, 宮木大輔, 村上英介, 長沖祐子, 高木慎太郎, 平賀伸彦, 柘植雅貴, 平松憲, 脇浩司, 三木大樹, 今村道雄, 川上由育, 高橋祥一, 越智秀典, 田代裕尊, 大段秀樹, 茶山一彰: HCV 関連肝細胞癌根治後 Peg-IFN+RBV 併用療法の効果予測因子からみた IFN 治療戦略. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011.6.2-3

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
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 金沢大学医薬保健研究域医学系 がん局所制御学 教授

研究要旨：

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) IL28B メジャーアレル型では肝組織内の ISGs 発現は, IFN $\beta$  とは無関係で, 主に IFN $\lambda$  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 $\lambda$  4) の関与が示唆された。
- (4) 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。

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再発との関係を明らかにすることで、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)が行われた 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

当施設では、肝臓内の ISGs に注目して IL28B 遺伝子多型と IFN 治療抵抗性との関係について検討を行ってきた。(Honda M, Sakai A, Yamashita T, et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010, 139: 499–509) (Honda M, Nakamura M, Tateno M, et al. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2010, 53: 817–826)

- ① C型肝炎患者の肝臓の遺伝子の発現を検討したところ、ISGs の発現が高い方が IFN 治療に抵抗性であることを明らかにした。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。ただし、この現象はあくまでジェノタイプ 1 型の HCV について言えることであり、ジェノタイプ 2 (セロタイプ 2) 型については ISGs の誘導はそれほどウイルスの消失と関連しないことが明らかとなった。
- ② 次に、IL28B の遺伝子多型と肝内の 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 マイナーアレル型は、メジャーアレル型に比べて肝内の ISGs の発現が高いことが判明した。同時にマイナーアレル型の肝臓では、治療前からインターフェロン $\alpha$ シグナルがより強く発現し、Wntシグナルが増え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アレル型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、メジャーアレル型であれば 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。

③ ISGs や IL28B 遺伝子多型 (SNP) が IFN の治療効果にどれだけ寄与する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ることが示唆された。当施設での検討の結果、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 ISGs の発現が低値であること、HCV の ISDR mutation が 1 以下であることが明確となった。

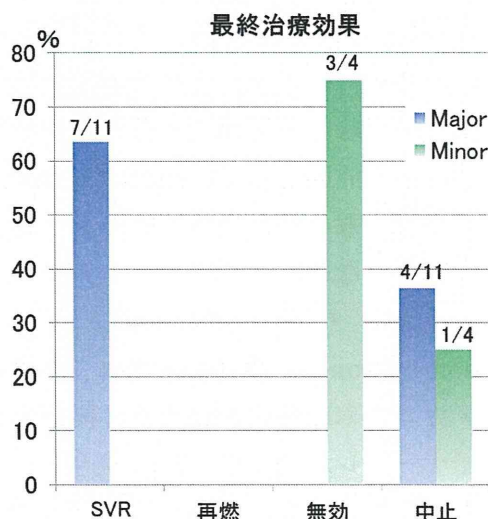
④ これらの結果をもとに、生体肝移植後 HCV 再感染例におけるレシピエントの IL28B 遺伝子多型(rs8099917 の SNP) と IFN の治療効果との関係について検討した。当科における生体肝移植後 HCV 再発症例におけるレシピエント自身の IL28B 遺伝子多型 (SNP) と Peg-IFN/RBV 療法の治療効果について検討した結果、下図に示した通り、IL-28B メジャーアレル型の Peg-IFN/RBV 療法の治療効果はきわめて良好であり、63.6% (7/11 例) で SVR が得られた。メジャーアレル症例の中には治療効果が期待できたにもかかわらず、やむを得ない理由で 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。この結果はこれまでの報告と比べて、より明瞭なものであり、ドナー側の因子を無視できるほどのインパクトがある。

次に、IL28B 遺伝子多型と治療後 HCC 再発との関係について詳細な検討を行った。

⑤ 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。多変量解析を行った結果、IL28B 遺伝子多型は早期 HCC 再発の有意な独立した予後規定因子と判定された。

⑥ 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。

⑦ 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。





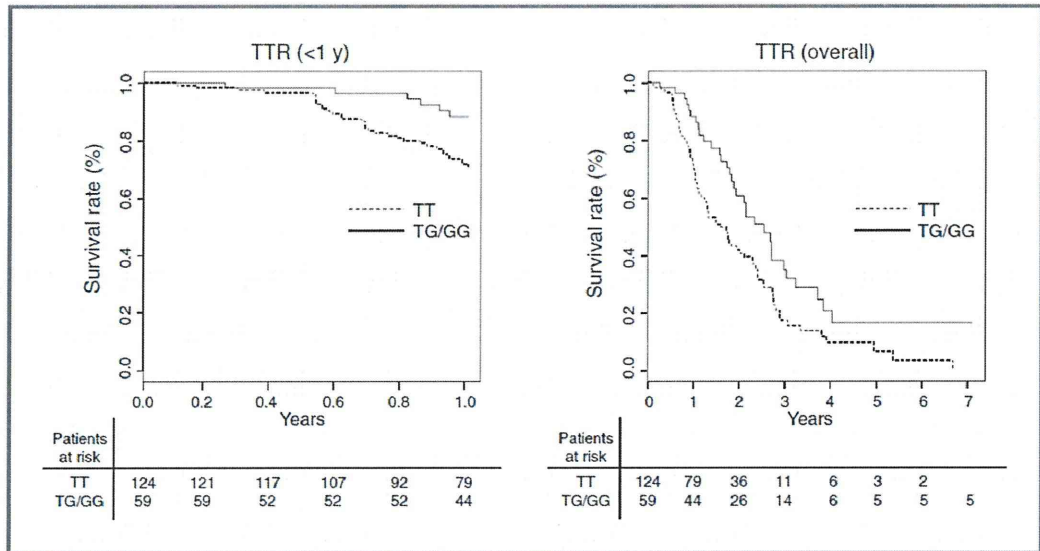


図3. C型肝炎におけるIL28B 遺伝子多型と肝細胞癌(HCC)術後の無再発生存期間の関係  
 TTR: Time to recurrence,  
 TT: IL28B major genotype (rs8099917), TG/GG: IL28B minor genotype (rs8099917)

#### D. 考察

C型ウイルス性肝炎レシピエントのIL28B 遺伝子多型については、メジャーアレル型の方が肝移植後のIFN/Ribavirin療法のSVR率が高く、肝の線維化も抑制されて有意に予後良好であるという結果は概ね受け入れられている。一方、ドナー(グラフト)のIL28B 遺伝子多型については相反する報告が見受けられる。レシピエントと同様にドナーの遺伝子多型がメジャー型の方がHCVに対してSVRが得られる可能性が高いものの、グラフト肝の線維化が早期に起こり、生命予後はマイナー型に比べてむしろ不良であると報告されている。その原因として、拒絶などの肝炎以外の要因も取りざたされているが、必ずしも明確ではない。

IL28B メジャーアレル型でも non-responder 症例が含まれており、そのメカニズムの解明を進める必要がある。マイナーアレル型ではISGs発現にIFN $\lambda$  2/3 以外のメカニズムの関与が示唆された。最近マイナーアレル型でIFN $\cdot\lambda$  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していきたい。

肝内のISGsは、主にIFN $\lambda$ によってその発現が制御され、IFN $\beta$ の影響を受けないことが明らかとなった。IFN $\beta$ はISGsの発現に影響を及ぼさないので、抗ウイルス活性においてはISGs-IFN $\lambda$ とは independent なメカニズムの存在が示唆される。今後、このメカニズムを明らかにする必要がある。

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ということが報告されており、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、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

### 1. 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  $\alpha$ -SMA positive cancer associated fibroblast. *Oncology Report* 30: 1561-1574, 2013

(2) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57: 1484-1497, 2013

(3) 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

(4) Yamashita T1, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, Kaneko S.

Gd-EOB-DTPA- enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Hepatology 2014 Feb 23. doi: 10.1002/hep.27093.

2. 学会発表

- (1) 柿木嘉平太, 酒井明人, 野村能元, 荒井邦明, 加賀谷尚史, 山下太郎, 酒井佳夫, 山下竜也, 水腰英四郎, 本多政夫, 岡田俊英, 高村博之, 谷卓, 太田哲生, 金子周一. 生体肝移植後 HCV 再感染例における IL28B 遺伝子多型と IFN 治療効果の検討. JDDW 福岡国際会議場 2011年10月20日
- (2) 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日

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当事項なし。



## 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 消化器外科 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) の有効性と、さらには、上記症例のゲノム解析 (IL28B-遺伝子多型: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、LDIR のプロトコールの有用性との関係は明らかではなく、今後の検討課題であると思われた。

### 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。そこで本研究においては、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 肝炎の再発予防の有効性について検討した。さらに、最近注目されている、ゲノム解析 (IL28B-遺伝子多型: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。

### B. 研究方法

(1) ステロイドフリー免疫抑制法と LDIR therapy の有用性  
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 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 (ペグインターフェロン  $\alpha$ -2b 0.5  $\mu$ g/kg/week+ribavirin 400mg/day) より開始し、副作用に応じて増減を行い、HCV RNA 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、HCV RNA 陽性、および組織学的に A2 あるいは F2 以上と定義した。

(2) IL28B-遺伝子多型:SNIP と、HCV 関連肝移植における抗ウイルス療法との関係  
1999 年より 2011 年の間に行われた成人間生体肝移植 123 例中、HCV 肝炎陽性 46 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39例を対象とした。上記の39症例中36例について、ゲノム解析(IL28B-遺伝子多型:SNIP)を施行した。研究(1)の結果とあわせ、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。

## C. 研究結果

### (1) ステロイドフリー免疫抑制法とLDIR therapyの有効性

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。

(2) IL28B-遺伝子多型:SNIPと、HCV関連肝移植における抗ウイルス療法との関係  
IL28B遺伝子多型の結果については、TT:30例、GT/GG:6例で、83%がMAJORであった。抗ウイルス療法の効果については、LDIRはIL28B遺伝子多型の結果に有意に関連しており、抗HCV治療のプロトコールによる治療効果については明らかでなかった。その一方で、ステロイドフリー免疫抑制療法については、移植直後のHCV-RNAの上昇を抑制することで、早期のHCV再発とFCHの発症を認めなかった。

## D. 考察

HCV陽性症例に対する肝移植後のHCV肝炎再発に対するステロイドフリー免疫抑制療

法および低用量 preemptive 抗ウイルス療法は、安全かつ有効性が期待できると考えられた。その一方で、ゲノム解析(IL28B-遺伝子多型:SNIP)を施行することで、肝移植後のウイルス治療効果にレシピエントIL28B遺伝子多型が有意に関与していたことが明らかになった。次に、ステロイドフリー免疫抑制法により、HCV肝炎早期再発頻度を抑制することが可能であり、HCV肝硬変・肝移植症例のウイルス治療に意義がある可能性が示唆された。また、Preemptiveにウイルス治療を開始することで、肝線維化の進行を抑制することが可能であったが、IL28B遺伝子多型の結果を考慮すると、その意義については明らかではなかった。

## E. 結論

ステロイドフリー免疫抑制療法および低用量 preemptive 抗ウイルス療法は安全ななプロトコールであった。また、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の結果と有意に関連しており、その意義については、今後の検討課題であると思われた。

## F. 研究発表

- 論文発表  
外国語論文
  - Marubashi S, Mori M, et al. Laparoscopy-assisted hybrid left-side donor hepatectomy. World J Surg 37(9):2202-2210, 2013
  - 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
  - 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

- 4) 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. 2012; 175(1): 138-148.
- 5) Marubashi S, Mori M, et al. Once-daily prolonged-release tacrolimus in de novo liver transplantation: a single center cohort study. Hepatogastroenterology. 2012; 59(116): 1184-1188.
- 6) Asaoka S, Mori M, et al. Intragraft transcriptome level of CXCL9 as biomarker of acute cellular rejection after liver transplantation. Journal Surg Res. 2012; 178(2): 1003-1114.
- 7) Marubashi S, Mori M, et al. Efficacy of Minimal Dosage of Calcineurin Inhibitor for Living Donor Liver Transplant Recipients with Preoperative Renal Dysfunction. Hepatogastroenterol. 2011; 58(106): 508-511.
- 8) Marubashi S, Mori M, et al. Donor hepatectomy for living donor liver transplantation: learning steps and surgical outcome. Dig Dis Sci. 2011; 56(8):2482-2490.
- 9) Kobayashi S, Mori M, et al. Successful adult ABO incompatible living donor liver transplantation: Experience with double infusion through the hepatic artery and portal vein. Hepatogastroenterol. 2011; 58(106): 503-507.

#### 日本語論文

- 1) 永野浩昭, 森 正樹, 他. 脳死肝移植の現状と問題点—これからの脳死移植— 日消病誌, 2011; 108(5): 735-742

#### 2. 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.
- 6) 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.

#### 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.
- 13) 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.
- 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) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 永野浩昭, 森 正樹, 他. 当院における脳死肝移植の経験とこれからの課題. 第 29 回日本肝移植研究会, 2011/7, 仙台.
- 20) 丸橋 繁, 森 正樹, 他. 肝移植成績向上のための取り組みと将来展望. 第 29 回日本肝移植研究会, 2011/7, 仙台.
- 21) 丸橋 繁, 森 正樹, 他. 我が国の肝移植の現状と将来. JDDW2011, 2011/10, 福岡.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 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：**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、試料の前処理、標識、質量分析、データ解析の各段階における多検体試料への対応、最適化を行い、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構築した。このシステムを用いて、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。

### B. 研究方法

#### ①臨床サンプルの大規模比較定量解析システムの構築

臨床サンプルの大規模定量プロテオーム解析を実施するために、サンプルの前処理、

標識、質量分析、データ解析の各段階における多検体試料への対応、最適化を行う必要がある。H23年度は、解析ソフト Proteome Discoverer 1.3 を導入し、多検体比較解析が可能な環境を整備した。H24、H25年度は実際の臨床サンプルを用いて、下記の方法で解析を行った。

#### ② 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・肝癌非発症サンプル、C型肝炎・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。

#### ③ 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。

#### ④ 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。

#### ⑤ 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りし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

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型肝炎・肝癌非発症サンプル 5 検体、C型肝炎・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型肝炎・肝癌非発症サンプルと C型肝炎・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・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