

・総合分担研究報告

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

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 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
研究分担者 増田智先 九州大学病院 薬剤部 教授

研究要旨

肝移植後 C 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、京都大学にてこれまでに行われた 125 例の抗ウイルス治療症例について解析を行った。ウイルス排除(SVR)率は 43%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。治療中止率は 22%と高率であったが、有害事象の予測因子は同定されなかった。有害事象の現状について解析を行った。その結果、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。

これらの解析から、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。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。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。

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 型肝炎ならびに B 型肝炎再発や治療効果に関与するウイルス側因子の解析のため、HBV と HCV の双方について、次世代ゲノムアナライザーによる包括的なウイルス遺伝子配列の解析を行った。HCV については、血中と肝組織に存在する HCV は多様性に富んでいること、血中と肝組織中の HCV の存在様式は類似していること、肝移植後には特定の HCV クローンが増加していること、DAA に対する薬剤耐性ウイルスは治療前から低頻度ながら存在していることが明らかとなった。HBV に関しては、B 型慢性肝炎症例では血中と肝組織に存在する HBV は多様性に富んでいる一方で、HBs 抗原陰性・HBc 抗体陽性ドナーの肝臓内の 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。また、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も明らかとなった。

A. 研究目的

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

ら HCV 陽性レシピエントに対する肝移植後は、大部分の症例で C 型肝炎が再発し、再発後は免疫抑制剤などの影響を受け急速に進行することが明らかとなっている。この進行を抑制し予後を改善させるためには抗ウイルス治療が不可欠であるが、現在のところ、移植後 C 型肝炎の標準的治療法は確立されていない。移植後 C 型肝炎は、免疫

抑制剤の使用など通常のC型肝炎とは異なる点が多く、これまでのペグインターフェロン+リバビリン治療による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た。さらに、新規抗HCV薬であるdirect acting antiviral agents (DAA)は、代謝酵素が同じであるカルシニューリン阻害剤との薬物相互作用があり、免疫抑制剤の血中濃度を顕著に上昇させることが問題となる。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。そこで、本研究では、肝移植後C型肝炎の病態及び治療のこれまでの実態を解析し、さらに新規抗HCV薬の使用方法を確立し有効性と安全性を確認することによって、肝移植後C型肝炎の最適な治療法を確立し、標準化することを目的とした。

また、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。この問題に対し、B型肝炎ワクチン投与により能動免疫を誘導することによりHBIGの減量や中止の試みを行ってきた。今回、エンテカビルならびにB型肝炎ワクチンの有効性を明らかにし、最適な肝移植後HBV再発予防法を確立することを目的とし、

さらに、次世代ゲノムアナライザーを用いることにより、多様なウイルス・クローンの集合体である肝炎ウイルス感染の全体像の把握が可能である。この手法を用いることにより、肝移植後のウイルス変異の多様性とそのダイナミズムを明らかにできると考えられる。今回、肝移植前後のHCVならびにHBVの変化を包括的に解析し、肝移植後の肝炎ウイルス対策に応用可能なウイルス配列の特徴を同定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 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：京都大学にて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. 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

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。

3. 肝移植後B型肝炎予防策の現状とエンテカビル、HBVワクチンの有効性の解析

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。さらに、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。また、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。

4. 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。

5. 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。

(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

1. 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：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. 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

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150-200ng/mL、ピーク値>500ng/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したが、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ールを完遂できた。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。

3. 肝移植後B型肝炎予防策の現状とHBVワクチンの有効性の解析

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。

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。

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。

4. 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。

5. 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。

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り積極的な治療適応とするなど、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。

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。

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、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

1. 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. Nishikawa H, Nishijima N, Arimoto A, Inuzuka T, Kita R, Kimura T, Osaki Y: Effect of nucleoside analog use in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* (in press)
5. Ueda Y, Yoshizawa A, Y Ogura, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Chiba T, Uemoto S. Plasma cell hepatitis induced by the termination of antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Hepatol Res*. (in press)
6. 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)
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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
11. 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
12. Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T,

- Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T: Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing: PLoS One 7:e35052:2012.
13. Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H, Saito S, Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, Chiba T: Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy: a single center study. J Gastroenterol 47:444-451:2012.
 14. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T: Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. J Viral Hepat 19:32-38:2012.
 15. Kim SK, Marusawa H, Eso Y, Nishikawa H, Ueda Y, Kita R, Kimura T, Chiba T, Osaki Y, Kudo M: Clinical characteristics of non-B non-C hepatocellular carcinoma: A single-center retrospective study. Digestion 84:43-49:2011.
 16. Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing. PLoS One 6:e24907:2011.
 17. Chung H, Watanabe T, Kudo M, Chiba T. Correlation between hyporesponsiveness to Toll-like receptor ligands and liver dysfunction in patients with chronic hepatitis C virus infection. J Viral Hepat 18:e561-567:2011.
 18. Ueda Y, Marusawa H, Egawa H, Okamoto S, Ogura Y, Oike F, Nishijima N, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. De novo activation of HBV with escape mutations from hepatitis B surface antibody after living donor liver transplantation. Antivir Ther 16:479-487:2011.
2. 学会発表
 1. 齊藤 俊一、上本伸二他：Association and Dissociation between Portal Venous and Biliary Ramifications. European Society for Surgical Research, 46th Annual Congress, 2011.5, Aachen, Germany.
 2. 上本伸二他：肝癌に対する移植の適応とタイミング. 第 111 回日本外科学会, 2011.5.25, 東京(紙上開催) .
 3. 海道利実、上本伸二他：再発肝細胞癌に対する肝移植の意義. 第 111 回日本外科学会, 2011.5.26, 東京(紙上開催) .
 4. 飯田 拓、上本伸二他：Outcome of adult liver transplant recipients with preoperative portal vein thrombosis . ILTS2011, 2011.6.22-25, Valencia, Spain.
 5. 小倉靖弘、上本伸二他：Outcomes and risk factors of liver re-transplantation: single center experiences. ILTS2011, 2011.6.22-25, Valencia, Spain.
 6. 上田佳秀、海道利実、小倉靖弘、森章、小川晃平、吉澤淳、秦浩一郎、

- 八木真太郎、宮川文、羽賀博典、丸澤宏之、千葉勉、上本伸二：HCV 陽性レシピエントに対する肝移植後の長期予後。第 29 回日本肝移植研究会, 2011.7.23, 仙台。
7. 上本伸二他：肝癌集学的治療の中で肝移植の役割。第 47 回日本肝癌研究会, 2011.7.28-29, 静岡。
 8. 小倉靖弘、上本伸二他：LDLT Strategies and Procedures at Kyoto University. CAST2011, 2011.9.25-28, Seoul, Korea.
 9. 小倉靖弘、上本伸二他：Complications of liver transplantation recipient. CAST2011, 2011.9.25-28, Seoul, Korea.
 10. 富山浩司、上本伸二他：生体肝移植における MELD スコアと予後の検討。第 47 回日本移植学会, 2011.10.6, 東京。
 11. 上田佳秀、海道利美、小倉靖弘、小川晃平、吉澤淳、秦浩一郎、八木真太郎、江川裕人、千葉勉、上本伸二：肝移植における肝臓内科医の役割。第 47 回日本移植学会, 2011.10.6, 東京。
 12. 藤本康弘、上本伸二他：肝移植における免疫寛容。第 47 回日本移植学会, 2011.10.6, 東京。
 13. 小倉靖弘、上本伸二他：当院の血液型不適合成人生体肝移植術の検討。第 47 回日本移植学会, 2011.10.6, 東京。
 14. 海道利美、上本伸二他：Pre- and perioperative risk factors affecting infection after living donor liver transplantation. IASGO2011, 2011.11.11-12, 東京。
 15. 上本伸二他：Current status of liver transplantation for liver cirrhosis and unsolved problem. IASGO2011, 2011.11.11-12, 東京。
 16. 海道利美、上本伸二他：Change and innovation in living donor liver transplantation in Kyoto University. 15th International Congress of the Egyptian Hepato-Pancreato-Biliary Society. 2012.2.10, Egypt.
 17. Naoshi Nishida, Takeshi Nagasaka, C.Richard Boland, Tsutomu Chiba, Ajay Goel: Characterization of step-wise accumulation of DNA methylation alterations during human hepatocarcinogenesis. 2011 DDW, 2011.5.9, Chicago, USA.
 18. 西島規浩、上田佳秀、丸澤宏之：HBV ゲノム多様性の次世代ゲノムアナライザー解析。第 47 回日本肝臓学会総会, 2011.6.2, 東京。
 19. 上田佳秀、西島規浩、丸澤宏之、上本伸二、千葉勉：HBs 抗体エスケープ変異を有する HBV の自然発生頻度と病態形成への関与。第 47 回日本肝臓学会総会, 2011.6.2, 東京。
 20. 西田直生志、福田善弘、千葉勉：C 型肝炎関連発癌の初期段階における癌抑制遺伝子の異常メチル化の役割。第 47 回日本肝臓学会総会, 2011.6.2, 東京。
 21. 池田敦之、丸澤宏之、千葉勉：肝癌の発生母地としての肝硬変に潜在する遺伝子異常の次世代ゲノム解析。第 70 回日本癌学会学術総会, 2011.10.4, 名古屋。
 22. Yoshihide Ueda, Hiroyuki Marusawa, Toshimi Kaido, Yasuhiro Ogura, Kohei Ogawa, Atsushi Yoshizawa, Koichiro Hata, Tsutomu Chiba, Shinji Uemoto: Safety and efficacy of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. The Liver Meeting

- 2011(AASLD), 2011.11.5, San Francisco, USA.
23. Norihiro Nishijima, Hiroyuki Marsusawa, Yoshihide Ueda, Akihiro Nasu, Ken Takahashi, Yukio Osaki, Shinji Uemoto, Tsutomu Chiba: Preexisting resistant mutants and dynamics of resistant populations of HBV to nucleoside analogues determined by massively-parallel ultra-deep sequencing. The Liver Meeting 2011(AASLD), 2011.11.7, San Francisco, USA.
 24. 上田佳秀, 千葉 勉, 上本伸二: 肝移植後 C 型肝炎再発対策の現状と今後の展望 . 第 39 回日本肝臓学会西部会, 2012.12.9, 岡山 .
 25. Kaido T, Uemoto S, et al : LDLT for HCC: Validation of our expanded criteria. 10th IHPBA, July 4, 2012, Paris, France.
 26. Kaido T, Uemoto S, et al : Our new perioperative nutritional therapy in liver transplantation. Annual Congress of Korea YeungNam Society for Parenteral and Enteral Nutrition , June 23, 2012, Busan, Korea .
 27. Ogura Y, Uemoto S, et al : Treatment of hepatic epithelioid hemangioendothelioma with extra-hepatic lesion by combination of living donor liver transplantation and early introduction of thalidomide and rapamycin. The ILTS 18th Annual International Congress, May 16-19, 2012, San Francisco, U.S.A.
 28. 小川晃平、上本伸二他：肝細胞癌治療における肝移植の現状と方向性 . 第 112 回日本外科学会学術集会 2012 年 4 月 11 日-13 日 , 千葉.
 29. 八木眞太郎、上本伸二他：Small-for-size 肝移植に対する一酸化窒素を使った臓器保存の効果 . 第 112 回日本外科学会学術集会 , 2012.4.11-13 , 千葉 .
 30. 海道利実、上本伸二他：再発予防の観点から見た肝細胞癌集学的治療における肝移植の意義 . 第 98 回日本消化器病学会 , 2012.4.20 , 東京 .
 31. 海道利実、上本伸二他：肝癌治療における肝移植の意義 . 第 24 回日本肝胆膵外科学会学術集会 , 2012.5.30-6.1, 大阪 .
 32. 海道利実、上本伸二他：臓器移植法改正後、脳死肝移植医療はどう変わったか？ 第 24 回日本肝胆膵外科学会学術集会 , 2012.5.30-6.1, 大阪 .
 33. 中村育夫、上本伸二他：レシピエント肝内門脈、臍静脈による、生体肝移植右葉グラフト V5V8 の血管再建の工夫 . 第 24 回日本肝胆膵外科学会学術集会 , 2012.5.30-6.1, 大阪 .
 34. 海道利実、上本伸二他：臓器移植法改正後の急性肝不全に対する移植 strategy の変化 . 第 38 回日本急性肝不全研究会 , 2012.6.6, 金沢 .
 35. 海道利実、上本伸二他：ワークショップ肝細胞癌の個別化医療 腫瘍の個数とサイズを超えて 肝癌肝移植の個別化治療における腫瘍マーカーの意義 . 第 48 回日本肝臓学会総会 , 2012.6.7-6.8, 金沢 .
 36. 海道利実、上本伸二他：ワークショップ脳死肝移植の現状と我が国における今後の肝移植の展開 法改正後の脳死肝移植医療の現状と変化 . 第 48 回日本肝臓学会総会 , 2012.6.7-6.8, 金沢 .
 37. 海道利実、上本伸二他：シンポジウム 長期生存の観点から見た肝細胞癌治療戦略における肝移植の意義 . 第 48 回日本肝臓学会総会 ,

- 2012.6.7-6.8, 金沢 .
38. 小川晃平、上本伸二他：Rituximab 及び局所注入療法を用いた血液型不適合生体肝移植成績 . 第 30 回日本肝移植研究会 , 2012.6.14-6.15, 福岡 .
 39. 海道利実、上本伸二他：シンポジウム 肝臓移植における Best criteria in Japan の確立に向けて . 第 30 回日本肝移植研究会 , 2012.6.14-6.15, 福岡 .
 40. 森章、上本伸二他：原発性胆汁性肝硬変に対する肝移植後の中長期成績 . 第 30 回日本肝移植研究会 , 2012.6.14, 福岡 .
 41. 八木眞太郎、上本伸二他：Small-for-size 肝移植に対する一酸化窒素による臓器保存の効果 . 第 30 回日本肝移植研究会 , 2012.6.14, 福岡 .
 42. 岡村裕輔、上本伸二他：生体肝移植後 , カルシニューリン阻害剤が原因で発症し治療に難渋した血栓性微小血管障害症 (TMA) の 1 例 . 第 67 回日本消化器外科学会総会 , 2012.7.20, 富山 .
 43. 小川晃平、上本伸二他：肝機能からみた肝細胞癌に対する治療戦略 肝細胞癌に対する肝移植治療成績 . 第 67 回日本消化器外科学会総会 , 2012.7.20, 富山 .
 44. 海道利実、上本伸二他：肝細胞癌に対する肝移植の現状と問題点 . 第 48 回日本肝臓研究会 , 2012.7.21, 金沢 .
 45. 海道利実、上本伸二他：シンポジウム 臓器移植法改正後の脳死肝移植症例の検証 . 第 48 回日本移植学会総会 , 2012.9.21, 名古屋 .
 46. 小倉靖弘、上本伸二他：生体肝移植とサリドマイド、ラパマイシンの術後早期導入を行った肝外病変を有する肝類上皮血管内皮腫の一例 . 第 48 回日本移植学会総会 , 2012.9.21, 名古屋 .
 47. 岩永康裕、上本伸二他：当院における臍島移植の現状と将来展望 . 第 50 回日本人工臓器学会総会 , 2012.11.24, 福岡 .
 48. 海道利実、上本伸二他：シンポジウム Keynote lecture 肝臓移植における免疫抑制療法の現状と今後の展開 . 第 39 回日本臓器保存生物医学会 , 2012.11.16-17, 福島 .
 49. 海道利実、上本伸二他：パネルディスカッション臓器移植後の感染症とその対策 肝臓移植後細菌感染症に対する予知・予防対策 早期経腸栄養と PCT 測定の有用性 . 第 25 回日本外科感染症学会学術集会 , 2012.11.21-22, 千葉 .
 50. 上田佳秀、丸澤宏之、上本伸二、千葉 勉：肝臓移植後 C 型肝炎再発対策の現状と問題点 . 第 109 回日本内科学会総会 , 2012.4.14, 京都 .
 51. 渡部則彦、青木信裕、池田亜希：新規疾患モデルによる自己免疫性肝炎 (AIH) の病態機構の解明 . 第 98 回日本消化器病学会総会 , 2012.4.20, 東京 .
 52. 恵荘裕嗣、金 秀基、丸澤宏之、大崎往夫、千葉 勉：改良型 PIVKA-II 測定試薬「NX.PVKA..R」の肝細胞癌診断における有用性 . 第 98 回日本消化器病学会総会 , 2012.4.20, 東京 .
 53. 栗田 亮、児玉裕三、千葉 勉：生体肝臓移植後胆管狭窄に対するチューブステントの胆管内留置法の成績 . 第 83 回日本消化器内視鏡学会総会 , 2012.5.14, 東京 .
 54. Ryutaro Maruoka, Nobuhiro Aoki, Masahiro Kido, Satoru Iwamoto, Hisayo Nishiura, Aki Ikeda, Tsutomu Chiba, Norihiko Watanabe: Splenectomy overcomes therapeutic insufficiency of corticosteroids and induces prolonged

- remission of autoimmune hepatitis in mice. DDW2012, 2012.5.21, San Diego, USA.
55. Takahiro Shimizu, Hiroyuki Marusawa, Tsutomu Chiba: Activation-induced cytidine deaminase links chronic inflammation to genetic instability leading to carcinogenesis. Keystone Symposia 2012, 2012.5.23, Dublin, Ireland.
 56. 金 秀基、上田佳秀、丸澤宏之、羽賀博典、上本伸二、千葉 勉：肝移植後 C 型肝炎治療の重大な有害事象 - 慢性拒絶と de novo 自己免疫性肝炎 - 第 48 回日本肝臓学会総会・ワークショップ , 2012.6.8, 金沢 .
 57. 那須章洋、丸澤宏之、千葉 勉：本邦における薬剤耐性 HCV クローンの潜在頻度の次世代シーケンサー解析 . 第 48 回日本肝臓学会総会・ワークショップ , 2012.6.8, 金沢 .
 58. 恵莊裕嗣、金 秀基、丸澤宏之、千葉 勉、木村 達、大崎往夫：新規 PIVKA- 測定試薬 " NX - PVKA-R " の肝細胞癌診断における有用性 . 第 48 回日本肝臓学会総会・オープンワークショップ , 2012.6.7, 金沢 .
 59. 上田佳秀、丸澤宏之、羽賀博典、上本伸二、千葉 勉：原因不明の肝硬変症例に対する肝移植後の NASH 発症 . 第 48 回日本肝臓学会総会・ワークショップ , 2012.6.7, 金沢 .
 60. 金 秀基、上田 佳秀、海道 利実、小倉 靖弘、小川 晃平、吉澤 淳、秦 浩一郎、藤本 康弘、伊藤 孝司、丸澤 宏之、宮川 文、羽賀 博典、千葉 勉、上本 伸二：肝移植後 C 型肝炎治療の現状と問題点 . 第 30 回日本肝移植研究会・シンポジウム , 2012.6.14, 福岡 .
 61. 上田 佳秀、吉澤 淳、海道 利実、小倉 靖弘、岡本 晋弥、小川 晃平、秦 浩一郎、藤本 康弘、伊藤 孝司、丸澤 宏之、宮川 文、羽賀 博典、千葉 勉、上本 伸二：肝移植後 HBV 対策の現状と問題点 . 第 30 回日本肝移植研究会・シンポジウム , 2012.6.14, 福岡 .
 62. 金 秀基、上田佳秀、上本伸二：肝移植後 C 型肝炎治療における脾摘の意義 . JDDW2012 第 16 回日本肝臓学会大会・パネルディスカッション , 2012.10.10, 神戸 .
 63. 池田敦之、丸澤宏之、千葉 勉：次世代シーケンサーの肝疾患診療への応用 ~ 肝発癌のゲノム診断 ~ . JDDW2012 第 16 回日本肝臓学会大会・シンポジウム , 2012.10.11, 神戸 .
 64. 高橋 健、那須章洋、丸澤宏之：C 型肝炎ウイルス薬剤耐性クローンの次世代ゲノムアナライザー解析 . JDDW2012 第 54 回日本消化器病学会大会・シンポジウム , 2012.10.10, 神戸 .
 65. 荒澤壮一、上田佳秀、西島規浩、木村勇斗、米門秀行、上尾太郎、丸澤宏之、千葉 勉：HBs 抗原陰性を示し HBV-DNA 陽性肝細胞癌症例のウイルスゲノム解析 . JDDW2012 第 16 回日本肝臓学会大会 , 2012.10.10, 神戸 .
 66. 高橋 健、上田佳秀：B 型肝炎再活性化における HBs 抗体の意義と活性化ウイルスのゲノム解析 . 第 99 回日本消化器病学会総会・ワークショップ , 2013.3.22, 鹿児島 .
 67. 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
型肝硬変治療における肝移植の意義
- 現状の評価と挑戦 -
68. 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
69. 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.
70. 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
71. 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)
72. 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)
73. 栗山勝利、栗田 亮、児玉裕三. 生
体肝移植後の胆管吻合部狭窄に対す
る内視鏡治療の現況. 第 40 回日本肝
臓学会西部会・パネルディスカッシ
ョン 岐阜 2013 年 12 月 6 日
74. 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。)

該当事項なし。

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

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：C 型肝炎慢性患者では生体肝移植後、移植肝への C 型肝炎ウイルス (HCV) の再感染が生じる。このため、C 型肝炎慢性疾患に対する生体肝移植の予後は、他疾患に対するものよりやや不良である。そのため PEG-IFN/リバビリン (RBV) 併用療法によるウイルス排除が試みられている。当院での肝移植後 C 型肝炎再燃に対する IFN 治療効果の検討では、SVR 群の 10 年生存率 82% に対し non SVR 群では 40% と、non SVR 症例で有意に生存率が不良であり、C 型肝炎慢性患者に対する肝移植では術後 SVR の獲得が非常に重要であることが改めて示された。しかし PEG-IFN/リバビリン (RBV) 併用療法に対し難治性の症例も多く存在する。当院での検討では、術後 PEG-IFN/RBV 療法による SVR 獲得の因子として、長期投与完遂および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 (rs8099917) が明らかとなった。また、長期投与後の再燃のリスクとして RBV の低容量投与が明らかとなった。新規治療法として 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 2 例の術後 PEG-IFN/RBV 併用療法が無効であった肝移植後 HCV 再燃患者に導入し、その治療成績を検討した。2 例とも導入早期にウイルス消失が得られ、有効性が認められた。1 例は SVR が得られたが、1 例は副作用で中止後早期に HCV 再燃を認めた。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。また他の新規治療法として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を 2 例に対して行った。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、2 例ともに術 1 ヶ月後血中 HCV RNA が再検出され、再感染を確認した。しかし、補助療法非施行例では術後 2 週間値が術前値を大きく超えていたのに対し、補助療法施行例では 2 例ともに術前値以下に抑制されていたことより、本補助療法は少なくとも短期的には免疫抑制下での術後 HCV 再感染および増殖を抑制する傾向があると考えられた。今後、これらの治療を組み合わせた治療の展開が期待される。

A. 研究目的

C 型肝炎関連肝疾患症例に対する肝移植の問題点は、肝移植後の C 型肝炎の再発である。肝移植術後の C 型肝炎ウイルス (HCV) の出現はほぼ必発であり、さらに肝炎再発は graft loss の重要な要因

の一つとなりうる。肝移植術後 C 型肝炎再感染対策としては、PEG-IFN+リバビリン (RBV) 療法が現在のところ標準治療であるが、肝移植術後はステロイドや免疫抑制剤を使用している、ウイルス量が多い、などの理由により、通常の C 型

肝炎症例に比べ奏効率は低い。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 +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。

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 +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(Phase I)を行い、肝移植手術中はDFPP施行による安全性と有効性を検討した(Phase I/II)(図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。

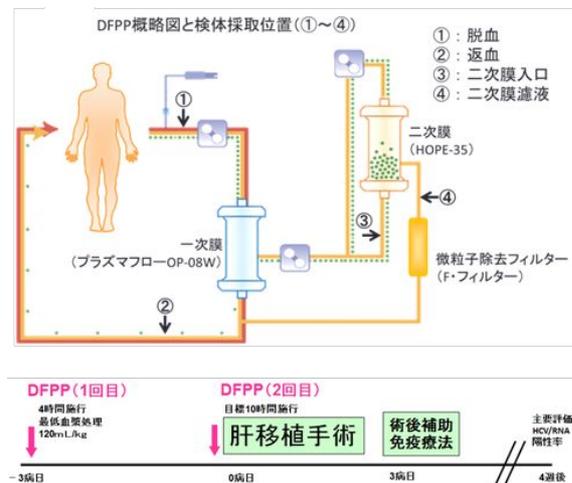


図1. DFPP 概略図とプロトコール

(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)

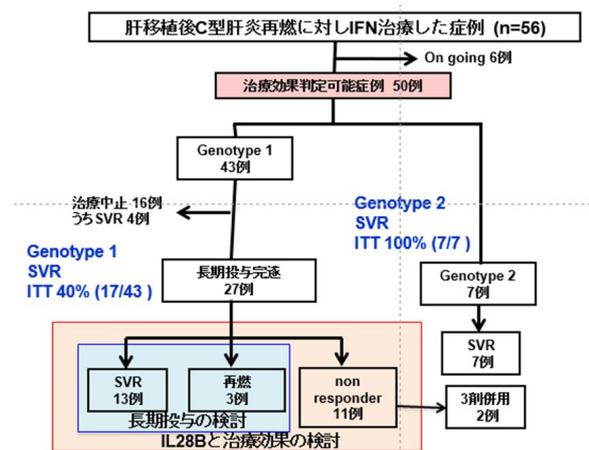


図2. 症例

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)

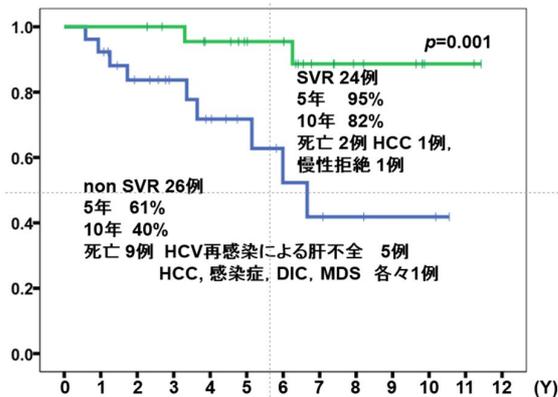


図 3 . 累積生存率

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 ≥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

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)

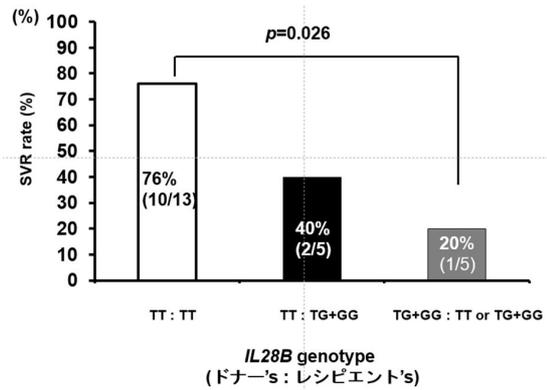


図 4 . ドナー/レシピエントの IL28B 遺伝子多型の組み合わせ別 SVR 率

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

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 +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)

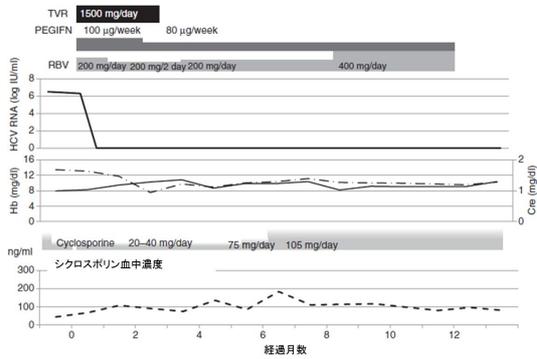


図 5. 3 剤併用療法 1 例目経過

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)

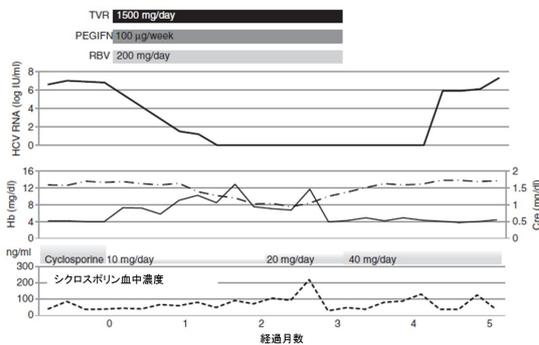


図 6. 3 剤併用療法 2 例目経過

副作用による中止時の TVR の 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 7)

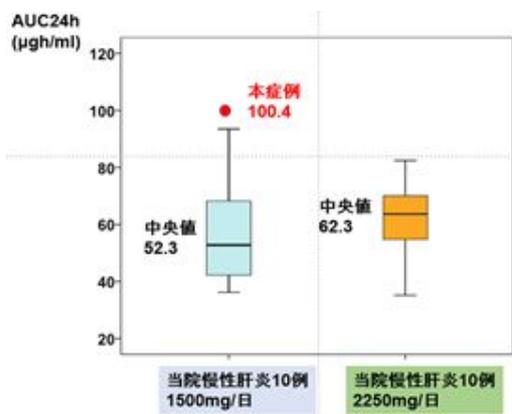


図 7. 慢性肝炎患者と 3 剤併用療法 2 例目の投与中止時の TVR 血中濃度の比較

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	4時間
手術	手術時間	13時間	16時間
	DFPP施行時間	13時間	15時間
	血漿処理量	23L	14L
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 ± 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)。

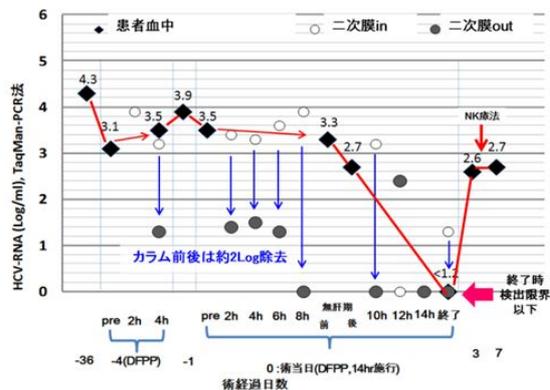


図 8 . 第 2 症例目の術中・術後 HCV ウィルス量変化

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事が示された。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- 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. 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 α -2b to α -2a and Ribavirin in Patients with Recurrence of Hepatitis C Virus Genotype 1 Infection after Liver Transplantation: A Case Report. *Intervirology* 55(4) 306-10, 2012

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. *Hepatol 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 とは無関係で、主に IFN 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 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)

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。

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 α 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。

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のかを多変量解析で検討したところ、ともに有意な規定因子と判定され、両者がそれぞれ独立した治療効果予測因子とな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。

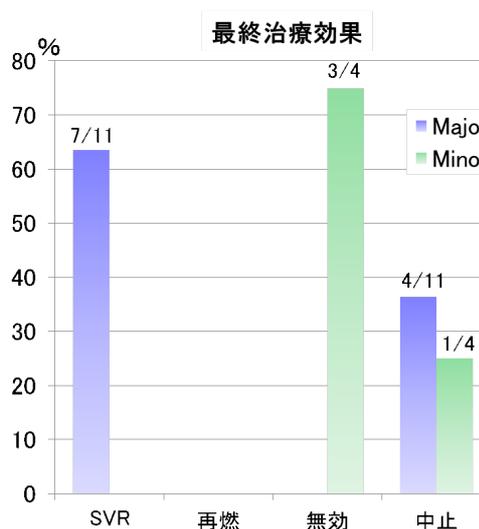
これらの結果をもとに、生体肝移植後 HCV 再感染例におけるレシピエントの IL28B 遺伝子多型(rs8099917 の SNP) と IFN の治療効果との関係について検討した。当科における生体肝移植後 HCV 再発症例におけるレシピエント自身の IL28B 遺伝子多型 (SNP) と Peg-IFN/RBV 療法の治療効果について検討した結果、下図に示した通り、IL-28B メジャーアレル型の Peg-IFN/RBV 療法の治療効果はきわめて良好であり、63.6% (7/11 例) で SVR が得られた。メジャーアレル症例の中には治療効果が期待できたにもかかわらず、やむを得ない理由で IFN 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。

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。

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。



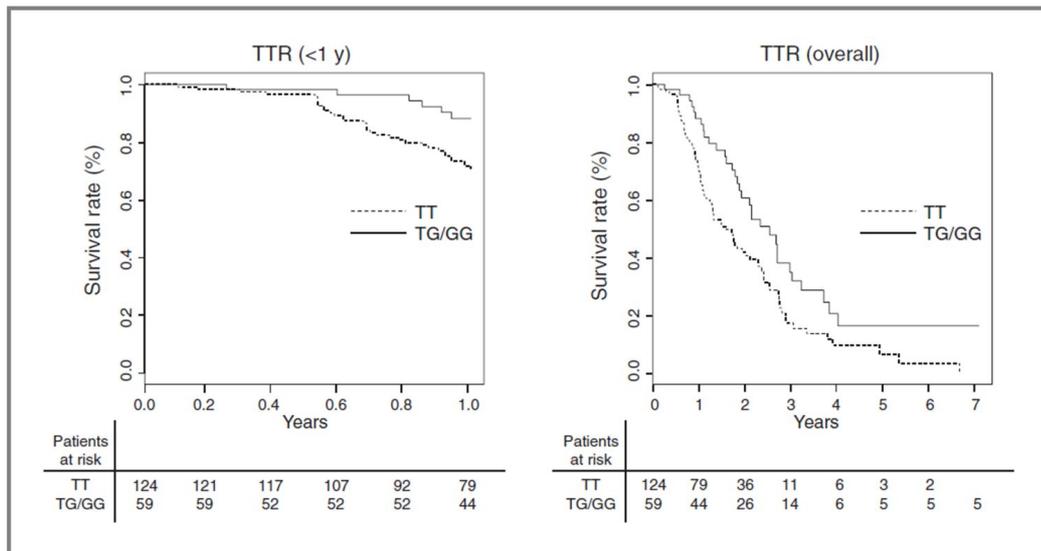


図3. C型肝炎におけるIL28B 遺伝子多型と肝細胞癌(HCC)術後の無再発生存期間の関係
TTR: Time to recurrence,
TT: IL28B major genotype (rs8099917), TG/GG: IL28B minor genotype (rs8099917)

D. 考察

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

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-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によってその発現が制御され、IFNの影響を受けないことが明らかとなった。IFNはISGsの発現に影響を及ぼさないため、抗ウイルス活性においてはISGs-IFN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する。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 α -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 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 -2b 0.5 μg/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連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る。

F. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

- 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
- 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. Intra-graft 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. 9 th 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

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。

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。

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

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

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。

D . 考察

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

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構築し、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

1. 論文発表

1. Kume H, Muraoka S, Kuga T, Adachi J,

Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Kodera Y, Matsushita K, Fukuoka J, Masuda T, Ishihama Y, Matsubara H, Nomura F, Tomonaga T. 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. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, Hoshino I, Nishimori T, Matsubara H and Tomonaga T. 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. Shiromizu T, Adachi J, Watanabe S, Murakami T, Kuga T, Muraoka S, and Tomonaga T. Identification of Missing Proteins in the neXtProt Database and Unregistered Phosphopeptides in the PhosphoSitePlus Database As Part of the Chromosome-Centric Human Proteome Project. *Journal of Proteome Research*, 12 (6):2414-2421, 2013.
4. Muraoka S, Kume H, Adachi J, Shiromizu T, Watanabe S, Masuda T, Ishihama Y, and Tomonaga T. 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.
5. Narumi R, Tatsuo Murakami, Kuga T, Adachi J, Shiromizu T, Muraoka S, Kume H, Kodera Y, Matsumoto M, Nakayama K, Miyamoto Y, Ishitobi M, Inaji H, Kato K and Tomonaga T. A Strategy for Large-Scale Phosphoproteomics and SRM-Based Validation of Human Breast Cancer Tissue Samples. *Journal of Proteome Research*, 11 (11), 5311-5322,

- 2012.
6. Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Adachi J, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Kodera Y, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K and Tomonaga T.
 7. Strategy for SRM-based Verification of Biomarker Candidates Discovered by iTRAQ Method in Limited Breast Cancer Tissue Samples. *Journal of Proteome Research*, 11 (8), 4201–4210, 2012.
 8. Guo F., Hiroshima K., Wu D., Satoh M., Abulazi M., Yoshino I., Tomonaga T, Nomura F., Nakatani Y. Prohibitin in squamous cell carcinoma of the lung: Its expression and possible clinical significance. *Human pathology*, 43, 1282-1288, 2012.
 9. Katada K., Tomonaga T, Satoh M., Matsushita K., Tonoike Y., Kodera Y., Hanazawa T., Nomura F., Okamoto Y. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. *J Proteomics*, 75:1803-1815, 2012.
 10. Hosako M., Muto T., Nakamura Y., Tsuta K., Tochigi N., Tsuda H., Asamura H., Tomonaga T, Kawai A., Kondo T. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J Proteomics*, 75, 833-44, 2012.
 11. Abulaizi M., Tomonaga T, Satoh M., Sogawa K., Matsushita K., Kodera Y., Obul J., Takano S., Yoshitomi H., Miyazaki M., Nomura F. The Application of a Three-Step Proteome Analysis for Identification of New Biomarkers of Pancreatic Cancer. *Int J Proteomics*, Article ID 628787, 2011.
 12. Wu D., Matsushita K., Matsubara H., Nomura F., Tomonaga T. An alternative splicing isoform of eukaryotic initiation factor 4H promotes tumorigenesis in vivo and is a potential therapeutic target for human cancer. *Int J Cancer*, 128, 1018-30, 2011.
 13. Tonoike Y., Matsushita K., Tomonaga T, Katada K., Tanaka N., Shimada H., Nakatani, Y., Okamoto, Y., Nomura, F. Adhesion molecule periplakin is involved in cellular movement and attachment in pharyngeal squamous cancer cells. *BMC Cell Biol*, 12, 41, 2011.
 14. Sogawa K., Kodera Y., Noda K., Ishizuka Y., Yamada M., Umemura H., Maruyama, K., Tomonaga, T, Yokosuka, O., Nomura, F. The measurement of a fibrinogen alpha C-chain 5.9kDa fragment (FIC 5.9) using MALDI-TOF MS and a stable isotope-labeled peptide standard dilution. *Clin Chim Acta*, 412, 1094-1099, 2011.
 15. Muto T., Taniguchi H., Kushima R., Tsuda H., Yonemori H., Chen C., Sugihara, Y., Sakamoto, K., Kobori, Y., Palmer, H., Nakamura, Y., Tomonaga, T, Tanaka, H., Mizushima, H., Fujita, S., Kondo, T. Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis. *J Proteomics*, 74, 858-873, 2011.
2. 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. Adachi J, Higo D, Watanabe S, Kuwano M, Hashimoto Y and Tomonaga T “ATP Accessibility Screening (AAS), a high-throughput and high-resolution kinase analysis platform for signaling research” 2nd Copenhagen Bioscience Conference, Copenhagen, Denmark, 2-5 December, 2012.
 12. Adachi J, Kuga T, Shiromizu T, Kume H, Muraoka S, Hashiguchi K, Narumi R,

- Watanabe S, Kuwano M, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T “Phosphorylation dynamics in an early response of DNA damage signaling” HUPO2012 11th World Congress, Boston, U.S.A., 9-13 September, 2012.
13. Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Kodera Y, Tomonaga T “A strategy for SRM-based systematic validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in breast cancer tissue samples.” HUPO2012 11th World Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.
 14. Shiromizu T, Adachi J, Tomonaga T “Quantitative proteomic profiling of orthotopic xenograft mouse model of colorectal cancer metastasis.” HUPO2012 11th World Congress, Boston, USA, September 9-13, 2012.
 15. Adachi J, Narumi R, Sano S, Kuga T, Shiromizu T, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T ”Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network” Asia Oceania Human Proteome Organization (AOHUPO) 6th congress, Beijing, China, 5-7 May, 2012.
 16. Muraoka S, Kume H, Watanabe S, Kuwano M, Sato M, Kawasaki N, Adachi J, Ishitobi M, Inaji H, Miyamoto Y, Kato K, Kodera Y, Tomonaga T “A strategy for SRM-based large-scale validation of biomarker candidates discovered by iTRAQ method in limited breast cancer tissue samples.” Asia Oceania Human proteome organization 6th Congress, Beijing, China, May 5-7, 2012.
 17. Kawasaki N, Hirano K, Hara Y, Adachi J, Shiromizu T and Tomonaga T “Biomarker Discovery for Triglyceride Deposit Cardiomyovascuopathy using Proteome and Transcriptome Analysis.” THE FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM on Triglyceride Deposit Cardiomyovascuopathy & Neutral Lipid Storage Disease, Kyoto, November 26, 2011.
 18. Watanabe S, Tagami S, Sano S, Yoshizawa-Kumagaye K, Tsunemi M, Okochi M and Tomonaga T “Absolute quantitation of plasma biomarker peptides for Alzheimer disease at pico-molar level using SRM coupled with stable isotope standards and capture by anti-peptide antibodies.” HUPO2011 10th World Congress, Geneva, Switzerland, 4-7 September, 2011.
 19. Adachi J, Narumi R, Sano S, Kuga T, Shiromizu T, Matsumoto M, Nakayama KI, Ikura M, Ikura T, Takata M Tomonaga T “Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network.” HUPO2011, Geneva, Switzerland, 4-7 September, 2011.
 20. Shiromizu T, Narumi R, Kuga T, Adachi J, Matsubara H, Matsumoto M, Nakayama K, Tomonaga T, “Phosphoproteomic analysis of clinical colon cancer specimen; Exploring a novel factor of cancer metastasis” HUPO 2011, Geneva, Swiss, September 2011.
 21. 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
 22. 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 Iα 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
 23. 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
24. 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
 25. 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
 26. 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
 27. 橋口一成, 足立 淳, 渡邊史生, 朝永毅: Quantitative proteome and phosphoproteome analyses of chromatin proteins upon oxidative base damage. 第36回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月11-14日
 28. 渡部 亮介, 足立 淳, 朝長 毅: Global quantitative phospho-proteomic analysis on the mTOR-mediated signaling pathway. 第35回日本分子生物学会, 福岡, 2012年12月11-14日
 29. 原康 洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 2012年12月11-14日
 30. 久米秀明, 村岡 賢, 小寺義男, 松下一之, 松原久裕, 朝長 毅: 大規模プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索とその検証. 第71回日本癌学会, 札幌, 2012年9月19-21日
 31. 村岡 賢, 久米秀明, 足立 淳, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: A strategy for validation of biomarker candidates combining iTRAQ and SRM/MRM assay in breast cancer tissue samples 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 32. 久家貴寿, 久米秀明, 足立 淳, 星野敢, 松原久裕, 朝長 毅: オミックス技術を駆使した新規大腸癌関連タンパク質の同定. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 33. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 久米秀明, 村岡 賢, 中山敬一, 井倉毅, 高田穰, 朝長 毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 34. 村上達夫, 久家貴寿, 足立 淳, 白水 崇, 中山敬一, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: ヒト乳がん組織の大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM をベースにした検証法. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 35. 白水 崇, 足立 淳, 朝長 毅: "Proteomic analysis of highly metastatic colorectal cancer cells established from orthotopic metastatic mouse model." 第71回日本癌学会学術総会, 北海道, 2012年9月19-21日
 36. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012年9月19-21日
 37. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 久米秀明, 村岡 賢, 橋口一成, 鳴海良平, 渡邊史生, 桑野晶喜, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: DNA 損傷初期応答シグナル解析から創薬標的の探索へ. 第10回北里疾患プロテオーム研究会, 神奈川, 2012年8月23日
 38. 久米秀明, 渡邊史生, 村岡 賢, 石濱泰, 小寺義男, 松下一之, 松原久裕, 朝長 毅: 大腸癌組織膜タンパク質の大規模プロテオーム解析によるバイオマーカー探索とその検証. 第10回日本プロテオーム学会, 東京, 2012年7月26-27日

39. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 福岡順也, 朝長 毅:細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 日本ヒトプロテオーム機構第 10 回大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
40. 村岡 賢, 久米 秀明, 渡邊 史生, 桑野 晶喜, 足立 淳, 佐藤 三佐子, 川崎 直子, 石濱 泰, 石飛 真人, 稲治 英生, 小寺 義男, 宮本 泰豪, 加藤 菊也, 朝長 毅:乳癌膜タンパク質の大規模 iTRAQ-shotgun と SRM 解析によるバイオマーカータンパク質の検証 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
41. 久家貴寿, 久米秀明, 川崎直子, 足立 淳, 星野 敢, 松原久裕, 朝長 毅:大腸癌手術標本の発現解析とインタラクトーム解析による新規癌関連タンパク質の同定. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
42. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 久米秀明, 村岡 賢, 橋口一成, 鳴海良平, 渡邊史夫, 桑野晶喜, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉毅, 高田穰, 朝長毅:リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
43. 村上達夫, 久家貴寿, 足立 淳, 白水 崇, 宮本泰豪, 加藤菊也, 石飛真人, 稲治英生, 小寺義男, 朝長 毅:大規模リン酸化プロテオーム解析と SRM/MRM によるヒト乳癌組織の検証法. 日本プロテオーム学会 2012 年会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
44. 朝長 毅:真のバイオマーカーの発見を目指して. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
45. 白水 崇, 足立 淳, 朝長 毅:同所性移植モデルによる大腸癌転移性株の定量的プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 2012 年 7 月 26-27 日
46. 足立 淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水 崇, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉毅, 高田穰, 朝長 毅:リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索. 34 回日本分子生物学年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
47. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長 毅:細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索. 34 回日本分子生物学年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
48. 久米秀明, 鳴海良平, 渡邊史生, 石濱 泰, 松原久裕, 小寺義男, 福岡順也, 朝長 毅:大腸癌組織膜タンパク質の大規模プロテオーム解析によるバイオマーカー探索と SRM/MRM 法を用いた定量法の確立および診断への応用. 34 回日本分子生物学年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
49. 久家貴寿, 足立 淳, 白水 崇, 村上達夫, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 福岡順也, 朝長 毅:定量的リン酸化プロテオミクスとバイオインフォマティクスを用いた大腸がんリン酸化シグナル伝達機構の包括的理解. 34 回日本分子生物学年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
50. 村岡 賢, 久米秀明, 渡邊史生, 川崎直子, 足立 淳, 鳴海良平, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅:乳癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析と SRM/MRM を用いたバイオマーカー候補タンパク質の検証および予後予測診断への応用. 34 回日本分子生物学年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
51. 村上達夫, 鳴海良平, 久家貴寿, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅:SRM/MRM 法を用いたリン酸化ペプチドの定量法の確立. 34 回日本分子生物学年会, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日.
52. 川崎直子, 平野賢一, 原 康洋, 足立 淳, 白水 崇, 朝長 毅:プロテオミクス、ト

- ランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心血管症のバイオマーカー探索 . 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日 .
53. 渡邊史生, 田上真次, 佐野聖三, 熊谷久美子, 常見雅彦, 大河内正康, 朝長 毅: Immuno-SRM/MRM を用いた新規アルツハイマー病血漿バイオマーカーペプチド APL1 β の絶対定量法の確立と臨床応用 . 34 回日本分子生物学会年會, 横浜, 2011 年 12 月 13-16 日
 54. 朝長 毅: 近年のプロテオーム解析技術の進歩と循環器病研究への応用 . 第 11 回 Cardiovascular Frontier Conference, 東京, 2011 年 11 月 19 日 .
 55. 朝長 毅: 大規模定量プロテオミクスによる疾患バイオマーカー探索 . 第 131 回質量分析関西談話会, 大阪, 2011 年 11 月 12 日 .
 56. 足立 淳, 久家貴寿, 白水 崇, 中山敬一, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: Global phosphorylation and ubiquitination dynamics in DNA-damage response network . 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日 .
 57. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索 . 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日 .
 58. 久米秀明, 松原久裕, 小寺義男, 朝長 毅: 膜タンパク質の大規模プロテオーム解析による大腸癌バイオマーカーの探索と SRM 法を用いた検証 . 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日 .
 59. 久家貴寿, 足立 淳, 白水 崇, 松原久裕, 中山敬一, 小寺義男, 朝長 毅: 大腸癌の定量的リン酸化プロテオーム解析 . 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日 .
 60. 白水 崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立 淳, 松原久裕, 松本雅紀, 中山敬一, 朝長 毅: Phosphoproteomic analysis of human colorectal cancer tissues for exploring a novel cancer metastatic biomarker . 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日 .
 61. Satoshi Muraoka, Hideaki Kume, Jun Adachi, Yasuhide Miyamoto, Kikuya Kato, Yoshio Kodera, Takeshi Tomonaga: A strategy for Shotgun Proteomics and SRM-based systematic validation of membrane proteins in breast cancer tissues . 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日 .
 62. 足立 淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水 崇, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: リン酸化プロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索 . 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011 年 10 月 3-5 日 .
 63. 朝長 毅: 大規模定量プロテオミクスを用いた疾患バイオマーカー探索と SRM を基盤とした実用化へのアプローチ . 第 9 回北里疾患プロテオーム研究会, 東京, 2011 年 7 月 27 日
 64. 朝長 毅: 定量プロテオミクス . 日本プロテオーム学会 2011 年會, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日 .
 65. 足立 淳, 鳴海良平, 佐野聖三, 久家貴寿, 白水 崇, 松本雅記, 中山敬一, 井倉正枝, 井倉 毅, 高田 穰, 朝長 毅: DNA 損傷応答におけるリン酸化・ユビキチン化プロテオーム定量解析 . 日本プロテオーム学会 2011 年會 新潟 2011 年 7 月 28-30 日 .
 66. 原 康洋, 宮本泰豪, 加藤菊也, 朝長 毅: 細気管支肺胞上皮癌のプロテオーム解析によるバイオマーカー探索 . 日本プロテオーム学会 2011 年會, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日 .
 67. 久家貴寿, 鳴海良平, 村上達夫, 足立 淳,

- 白水 崇, 小寺義男, 松原久裕, 松本雅記, 中山敬一, 朝長 毅: 大腸がん手術組織標本の定量的リン酸化プロテオーム解析. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
68. 越中屋里香, 久家貴寿, 足立 淳, 朝長 毅: 大腸癌組織の細胞核プロテオーム解析による染色体不安定性に関連するタンパク質の探索. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
69. 久米秀明, 鳴海良平, 渡邊史生, 石濱 泰, 松原久裕, 小寺義男, 朝長 毅: 大腸癌バイオマーカーとなる膜タンパク質の大規模プロテオーム解析と SRM による検証. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
70. 白水 崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立 淳, 松原久裕, 松本雅紀, 中山敬一, 朝長 毅: ヒト大腸癌臨床検体を用いたリン酸化プロテオーム解析による新規転移因子の探索. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
71. 村岡 賢, 久米秀明, 渡邊史生, 川崎直子, 足立 淳, 鳴海良平, 石飛真人, 稲治英生, 宮本泰豪, 加藤菊也, 小寺義男, 朝長 毅: 乳癌膜タンパク質の大規模プロテオーム解析と SRM 解析による検証. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
72. 川崎直子, 平野賢一, 原 康洋, 足立 淳, 朝長 毅: プロテオミクス、トランスクリプトミクスを用いた中性脂肪蓄積心筋血管症のバイオマーカー探索. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
73. 渡邊史生, 田上真次, 佐野聖三, 熊谷久美子, 常見雅彦, 大河内正康, 朝長 毅: SISCAPA-SRM を用いた血漿中に pM レベルで存在するアルツハイマー病バイオマーカーペプチド APL1 β の絶対定量. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
74. 佐野聖三, 田上真次, 大河内正康, 熊谷久美子, 常見雅彦, 小寺義男, 朝長 毅: SISCAPA-SRM を用いた血漿中のアルツハイマー病バイオマーカーペプチド APL1 β 定量のための前処理法の検討. 日本プロテオーム学会 2011 年会, 新潟, 2011 年 7 月 28-30 日.
75. 白水 崇, 鳴海良平, 久家貴寿, 足立 淳, 松原久裕, 松本雅紀, 中山敬一, 朝長 毅: 大規模リン酸化プロテオーム解析による癌転移に関わる新規リン酸化シグナルの探索. 第 63 回日本細胞生物学会大会, 札幌, 2011 年 6 月 27-29 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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。研究の初年度はウイルスゲノム複製を促進する宿主因子を単離するために、herpes simplex virus の thymidine kinase (TK) 遺伝子を HCV ゲノムに組み込み、それを用いて宿主因子を探索する系を考えたが、TK 遺伝子を組み込んだウイルスゲノムの産生が計画通りに進まなかったために中断し、現在は新たなスクリーニング系を構築中である。一方、ウイルス感染初期過程の解析を行い、培養の通常条件に比べ、低酸素条件下で培養するとウイルス感染が増加する事を見いだした。新たに見いだした本感染系はこれまでの感染系とは異なり、CD81 の存在を必要としない。生体内組織の酸素分圧を考慮すると、肝臓への HCV 感染は通常条件での培養細胞への感染とは異なる可能性が考えられた。

HCV に感染した肝組織においては、各種サイトカイン等の産生により、周辺環境が変化する可能性がある。特に生体内の HCV 感染肝細胞が取り巻く周辺の非肝実質細胞との相互作用を介して、ウイルス複製が変化する可能性を調べた。具体的には HCV 感染肝細胞と星細胞とを混合培養する事による各種サイトカイン産生を調べ、それらが HCV 感染に与える影響について調べた。その結果、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る結果を得た。

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

ビル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、インターフェロン投与がなくて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や耐性ウイルス出現の問題があるために、有効性については慎重に対処する必要がある。

種々の宿主因子が HCV の増殖に関

与している。その中からウイルスの複製に中心的に働く宿主因子が明らかになれば、その因子を標的にしてウイルス血症に対処する方策を開発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。そこで、HCV 感染肝細胞を取り巻く周辺細胞が、HCV 増殖と産生にどのような効果を与えるかを調べる意義は大きい。また、生体内の肝組織の酸素暴露を培養細胞で模擬し、その条件下における HCV 感染を調べることにより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

1. herpes simplex virus の thymidine kinase (TK) 遺伝子を組み込んだ HCV ゲノムの構築と、それを用いた HCV ゲノム複製制御宿主因子単離の試み。

HCV フルゲノムに TK 遺伝子を組み込んだ組み換えゲノムを構築して、それが自立的に複製する細胞を単離する。細胞が樹立されたら、それに HCV 感染が起こらない細胞から得た cDNA ライブラリーの発現プラスミドを導入し、その後細胞をガンシクロビルで処理し、TK を発現しない細胞 (HCV ゲノム複製が抑制されたと考えられる) を得る。それらの細胞から導入した cDNA を回収してその遺

伝子を特定する。この遺伝子は HCV ゲノム複製を負に制御すると考えられるので、その機能を解明する事により、HCV ゲノム複製の詳細を明らかにする。

2. 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。

肝星細胞は類洞と肝細胞の間に介在する間質細胞であり、解剖学的には細胞の突起が肝実質細胞とコンタクトしている。HCV 感染細胞を取り巻く環境がウイルスの増殖を制御している可能性が考えられるために、両者の混合培養によるこれまでに予備的解析から HCV 感染細胞と星細胞を混合培養した場合に、サイトカイン産生を介したクロストークが見られたので、以下の研究方法でその詳細を明らかにした。

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

を行った。レプリコン細胞としては HCV1b 型ゲノムに由来する NNC、JFH1 サブゲノムレプリコン細胞等を用いた。

3. 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、ウイルス感染実験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。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。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、(1) 低酸素条件下における HCV 感染、複製を調べる。HuH7.5 を低酸素条件で培養し、ウイルス感染性の違いを調べる。(2) 低酸素時において細胞表面に発現誘導され、ウイルス感染に関与する因子を明らかにする。(3) その因子と HCV 感染の分子機序を明らかにする。

（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)TK 遺伝子を組み込んだ HCV レプリコンの作成とそれを用いた HCV 複製阻害因子の探索の試み。

TK 遺伝子を組み込んだ HCV ゲノムを発現するプラスミドを構築した。本プラスミドを細胞に導入し、ウイルスゲノム複製細胞を単離する試みをしたが、目的の細胞は得られなかった。TK 遺伝子領域に種々の欠失を導入した場合、TK 活性が失われたものだけは細胞の回収が可能であった。TK を HCV レプリコン細胞に別途発現させた場合にも、レプリコン細胞を単離できるので、単に TK 活性があるために TK/HCV 組み換えレプリコン細胞が単離できないというわけではない。原因が不明であるために本実験の遂行は中断した。

(2)HCV 感染肝細胞と肝星細胞とのクロストークによるサイトカイン産生。

(i)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。

両細胞を混合培養する事により培養液中に MIP-1beta が放出された。細胞の接着によるのではなく、培養上清を介した現象であった。LX2 細胞の培養上清を JFH1/HuH7 に添加したときに MIP-1beta 産生が観察され、逆に JFH1/HuH7 の上清を LX2 に添加しても産生増加は見られなかった。

(ii)培養上清に産生される MIP1-beta は生理活性を有する。

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。

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

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。

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

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。

(v)HCV レプリコン細胞では LX2 と混合培養しても MIP-1beta 産生増加は観察されない。HCV 感染細胞に IL-1alpha を添加すると MIP-1beta 産生が亢進した。しかし HCV ゲノムレプリコン細胞ではその様な事は観察されなかった。その原因として、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。さらに解析

を進め、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-1alpha) なども存在した。

(3) 低酸素条件下においては 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 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。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。

(i) 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。

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

低酸素条件下で発現誘導される

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

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

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

(iv) 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 が不必要な事が分かった。

D . 考察

HCV 産生は宿主の種々の要因で制御されている。ウイルス複製に直接正に働く因子や、抑制的に働く因子の存在が明らかにされている。TK 遺伝子を組み込んだ HCV ゲノムを構築して、ウイルスゲノム複製を制御している宿主因子の探索を試みたが、アッセイ系の樹立が困難であったために、スクリーニングに至らなかった。一方、ウイルス血症を引き起こす要因を探るために、HCV 感染肝細胞を取り巻く環境が HCV の増殖にどのような影響を与えるかについて研究を進めた。

HCV 感染肝実質細胞を肝星細胞 (LX2) を混合培養したところ、HCV 感染細胞から MIP-1beta の産生が観察された。MIP-1beta は CCR5 を発現している細胞障害性 T 細胞を誘引する働きがある。これらのことから、星細胞の働きにより HCV 感染細胞周辺に細胞障害性 T 細胞が引き寄せられ、感染細胞を破壊する可能性が考えられた。詳細な解析の結果、混合培養により MIP-1beta の他に IL-6, IL-8, CXCL2, MIP-1alpha 等も誘導される事を見だし、これらがウイルス産生に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

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

増加には CD81 が必要でない事から、これまで報告された HCV 感染様式とは異なる感染機構が存在するといえる。

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

E . 結論

HCV 血症要因を明らかにすべく、HCV の複製制御機構の解析を行った。HCV 感染肝細胞を肝星細胞と混合培養することにより、感染細胞から IL-6, IL-8, MIP1beta が産生されることが分かった。ウイルス産生制御には感染細胞を取りまく環境についての理解も重要である事が分かった。これらのサイトカイン産生がウイルス血症にどのような効果を発揮するか興味を持たれる。

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寄与すると考えられる。

F . 研究発表

1. 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.
4. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. *Microbiol Immunol*. 56(1) :1-9. 2012
5. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res*. 163(1) :390-395, 2012
6. Weng L, Tian X, Gao Y, Watashi K, Shimotohno K, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Different mechanisms of hepatitis C virus RNA polymerase activation by cyclophilin A and B in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1820(12) :1886-1892, 2012
7. Hirata Y, Ikeda K, Sudoh M, Tokunaga Y, Suzuki A, Weng L, Ohta M, Tobita Y, Okano Ozeki K, Kawasaki K, Tsukuda T, Katsume A, Aoki Y, Umehara T, Sekiguchi S, Toyoda T, Shimotohno K, Soga T, Nishijima M, Taguchi R, Kohara M. Self-enhancement of hepatitis C virus replication by promotion of specific sphingolipid biosynthesis. *PLoS Pathog*. 8(8) :e1002860, 2012

2. 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
2. 西辻 裕紀、清水 裕子、宇治野 真之、舟見 健児、川上 志保、瀬谷 司、下遠野 邦忠・HCV感染培養肝細胞は肝星状細胞と共培養する事によりMIP-1 beta 産生を誘導する・文部科学省新学術領域

研究 がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム・平成25年1月30日・東京

3. 西辻 裕紀、舟見 健児、清水 裕子、宇治野 真之、山本 祐美、鈴木 律子、川上 志保、瀬谷 司、高久 洋、下遠野 邦忠・HCV感染肝細胞は肝星状細胞と共培養する事によりMIP-1 beta産生をあげる・第60回日本ウイルス学会学術集会・大阪・平成24年11月13日

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

