

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590834

研究課題名（和文） 肝移植後のC型肝炎重症化機序におけるNK細胞の重要性と肝内免疫環境の解析

研究課題名（英文） Importance of NK cells and intrahepatic immune responses for the acceleration of hepatitis C after liver transplantation

研究代表者

山際 訓（YAMAGIWA SATOSHI）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10419327

研究成果の概要（和文）：ナチュラルキラー（NK）細胞や細胞傷害性T細胞の活性化に関与する活性化レセプターNKG2D に結合するリガンド発現の検討により、対照として解析した肝細胞癌ではリガンドの1つが高発現しており、その発現低下が術後の早期再発と関連することを報告した。肝組織中のサイトカイン・ケモカインの発現解析では、肝移植後の肝炎重症化の原因となりうる特徴的な変化を特定出来なかったものの、肝内 NK 細胞分画の違いや肝細胞におけるNK細胞活性化レセプターリガンド発現の違いが、移植後C型肝炎の重症化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The activating receptor natural killer group 2, member D (NKG2D) and its ligands play a crucial role in immune response to infections and tumors. Among the human NKG2D ligands, ULBP1 is prevalently expressed in hepatocellular carcinoma (HCC), but loss of its expression correlates with tumor progression and early recurrence. Although we could not find any significant changes in the gene expression profiles among the recurrent hepatitis C patients and chronic hepatitis C patients yet, our results suggest that the status of intrahepatic NK cell subsets and NK cell receptor ligand expressions might be associated with the rapid progression of recurrent hepatitis C infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎硬変に対する肝移植は高率にC型肝炎再発を来し、移植後数年以内に肝硬変へと進行する症例があるなど、肝移植後の急速な肝炎進行が移植成績を悪化させている。PEG化インターフェロンとリバビリン併用療法を移植後早期に、あるいは経過観察中の肝炎

再発時に施行することが標準化され、ある程度の効果が報告されているものの、その奏効率はいまだ低く、治療プロトコル完遂率も低い。そのため新たな治療戦略が求められている。

2. 研究の目的

免疫抑制剤、特にFK506やCyclosporine A

(CyA)により T細胞受容体情報伝達が特異的に阻害されている肝移植後における、C型肝炎再発の急速な肝炎進行機序の解明を目指したこれまでの肝内自然免疫応答に関する研究成果を踏まえ、本研究は肝移植後C型肝炎再発例に認められる肝内 natural killer (NK)細胞機能変化の実態を分子・細胞レベルで特定し、肝炎重症化機序への関与とそのメカニズムを明らかにすることを目的し、最終的にはNK細胞機能調節による肝炎進行の抑止を目指した新規免疫療法の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

(1)症例の選定、肝生検組織と末梢血の採取、臨床経過・治療データのまとめ

研究協力者である移植外科医の協力により、当機関で生体肝移植を施行されたC型肝炎症例と、通常のC型慢性肝炎症例について同意を得た上で肝切除・肝生検組織と末梢血の採取を実施した。

(2)肝組織中のNKG2Dリガンド発現

NK細胞や細胞傷害性T細胞の活性化に関する活性化レセプターNKG2Dに結合するリガンド発現について肝組織を用いた免疫組織化学染色法やreal-time PCR法による遺伝子発現解析、フローサイトメトリー (FACS)、Western blotting法および肝癌細胞株を用いた *in vitro* の検討を行った。検討したNKG2Dリガンドは、MHC class I-related chain A/B (MICA/B) UL-16 binding protein (ULBP) 1~4である。

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) の腫瘍細胞におけるNKG2Dリガンド発現の検討には、HCCの外科的切除標本を用い、生体肝移植ドナーの正常肝組織などを対照とした。

(3)肝組織におけるサイトカイン・ケモカインとそのレセプター発現

cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により同定された、肝移植後のC型肝炎肝組織において通常のC型慢性肝炎肝組織と比較して2倍以上の発現変動を認める遺伝子のうち、サイトカイン・ケモカインとそのレセプターを中心に肝切除組織および肝生検組織から抽出したmRNAを用いたreal-time PCR法により遺伝子発現の検討を実施した。

4. 研究成果

(1)症例の選定、肝生検組織と末梢血の採取、臨床経過・治療データのまとめ

肝移植後の免疫抑制剤使用状況を含む治療経過や肝炎重症度の判定を血液生化学検査とともに肝生検組織を用いて病理組織学

的に検討し、以下の解析に利用した。

(2)肝組織中のNKG2Dリガンド発現

①高分化型HCC 13例、中分化型HCC 24例、低分化型HCC 10例と前癌状態と考えられる異型結節 (dysplastic nodule; DN) 7例について、免疫組織染色による検討にてDNで7例中7例 (100%)、高分化型HCC 13例中10例 (76.9%)においてULBP1が高発現していたのに対し、低分化型HCCでは発現が有意に低下していた (10例中0例) ($P < 0.001$, $P = 0.003$)。しかしながら、real-time PCR法により検討した腫瘍組織におけるULBP1 mRNA発現については分化度による違いが認められなかった。一方、MICA/Bは血洞を中心として発現を認めたものの、ULBP2~4の発現は認められなかった (図1)。

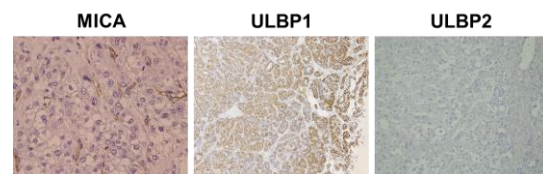


図1. HCCにおけるNKG2Dリガンド発現

ULBP1発現の有無と生存率および無再発生存期間を検討すると、生存率には有意差は認めなかったが、ULBP1陰性のHCC症例では無再発生存期間が有意に短縮していた ($P = 0.006$) (図2)。更に、Cox比例ハザードモデルによる解析ではULBP1陰性は早期再発と関連する有意な因子 ($P = 0.008$) として検出された。

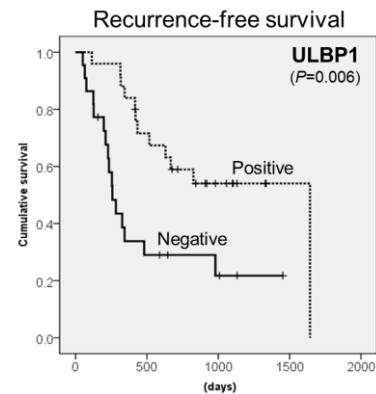


図2. ULBP1発現の有無と無再発生存

肝癌細胞株を用いた検討においても、高分化型・中分化型HCC由来の細胞株と比較して低分化型HCC由来のKYN-2ではULBP1の発現が有意に低下していた。肝癌細胞株においてもULBP1 mRNA発現に分化度による有意な発現差は認められなかったため、ULBP1発現調節への関与が報告されている20sプロテアソームについて、HCC組織と肝癌細胞株を用いて検討した。低分化型HCC組織と低分化HCC

由来 KYN-2 においては 20s プロテアソームが高発現しており、プロテアソーム阻害剤の添加により ULBP1 発現の低下した KYN-2 においても ULBP1 発現が増加したことから、低分化 HCC における ULBP1 発現低下にはプロテアソームの発現亢進が関与している可能性が示唆された。

②肝移植後の C 型肝炎肝組織中における NKG2D リガンド発現については、通常の C 型肝炎慢性肝炎例の組織中と比較して高発現しているものを認めたが、その原因検索を目的とした肝癌細胞株を用いた培養実験では免疫抑制剤添加による発現増強作用は確認できなかった。

(3)肝組織におけるサイトカイン・ケモカインとそのレセプター発現

cDNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により同定された、肝移植後の C 型肝炎肝組織において通常の C 型肝炎慢性肝炎肝組織と比較して 2 倍以上の発現変動を認める遺伝子のうち、CXCL9、CXCL10、CXCL13、IFNAR2 などサイトカイン・ケモカインとそのレセプターを中心に肝組織から抽出した mRNA を用いた real-time PCR 法による遺伝子発現の検討を実施した。CXCL10 などのケモカインの発現が肝移植後の C 型肝炎症例で通常の C 型肝炎慢性肝炎症例と比較して高い傾向をみとめたものの、それ以外に有意な発現の違いを認めた遺伝子は解析範囲内では同定されなかった。

(4)考察と今後の展望

NK 細胞活性化に重要な NKG2D リガンドの肝組織における発現の検討では、対照とした HCC においては MICA と ULBP1 が発現しているが ULBP2~4 の発現は認められないこと、特に ULBP1 は DN~高分化型 HCC には高発現しているものの、分化度が低下するに従い発現が低下し、ULBP1 発現の低下した HCC 症例は肝切除後の無再発生存期間が有意に短いことを明らかにした。HCC における ULBP1 発現低下の原因としてプロテアソーム発現の亢進が示唆されたが、ULBP1 発現低下は HCC に対する抗腫瘍免疫からの回避機構の 1 つと考えられるため、その機序の更なる解明は HCC に対する腫瘍免疫の賦活化を含む治療効果の改善のために重要である。プロテアソーム阻害剤の ULBP1 発現増強作用は、HCC に対するプロテアソーム阻害剤の作用機序に関する新たな知見と考えられた。

肝組織中のサイトカイン・ケモカインの発現解析では、移植後の C 型肝炎重症化の原因となりうる特徴的な変化を特定出来なかったものの、以前に報告した肝内 NK 細胞分画の違いや肝細胞における NKG2D リガンド発現

の違いが関与している可能性が示唆された。今後も本研究で得られた成果に基づいた、NK 細胞機能の調節による肝炎重症化の阻止が可能かどうかについて研究を継続したいと考えている。

本研究では肝移植後の C 型肝炎再発に着目して研究を計画・実施したが、近年、C 型肝炎を背景とする HCC に対する肝移植が増加している。しかしながら、移植後の HCC 再発への懸念からその適応は限られているのが現状である。移植後の HCC 再発の抑制には肝癌細胞に対する免疫監視機構の理解が重要であり、特に免疫抑制剤による T 細胞応答抑制下では NK 細胞機能の重要性が高いと考えられる。今後は、本研究で得られた知見とともに、最近の NK cell biology の進歩を背景として、移植前後の特に免疫抑制下における NK 細胞を中心とした免疫監視機構の詳細な評価と、肝癌細胞自体の免疫学的特性の検討により、再発リスクを高い精度で予測しうる生物学的評価法を確立し、HCC に対する肝移植の適応拡大の可能性を検討することを目的とし、最終的には再発抑止を目的とした新規免疫療法の開発につながる知見を目指した研究を予定したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J. Hepatol.* (査読有) 56(2): 381-8, 2012
- ② Fujimaki S, Matsuda Y, Wakai T, Sanpei A, Kubota M, Takamura M, Yamagiwa S, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y. Blockade of ataxia telangiectasia mutated sensitizes hepatoma cell lines to sorafenib by interfering with Akt signaling. *Cancer Lett.* (査読有) 319(1): 98-108, 2012.
- ③ Ohkoshi S, Yamagiwa S, Yano M, Takahashi H, Aoki YH, Waguri N, Igarashi K, Sugitani S, Takahashi T, Ishikawa T, Kamimura T, Wakabayashi H, Watanabe T, Matsuda Y, Aoyagi Y. Failure to achieve 2-log10 viral decrease in first four weeks of peg-IFNalpha-2b plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C with genotype 1b and high viral titer is

- useful in predicting non-response: evaluation of response-guided therapy. *Hepatogastroenterology*. (査読有) 58(107-108): 965-70, 2011
- ④ Aoki YH, Ohkoshi S, Yamagiwa S, Yano M, Takahashi H, Waguri N, Igarashi K, Sugitani S, Takahashi T, Ishikawa T, Kamimura T, Wakabayashi H, Watanabe T, Matsuda Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Characterization of elevated alanine aminotransferase levels during pegylated-interferon α -2b plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.* (査読有) 41(2): 118-25, 2011
- ⑤ Kawai H, Nomoto M, Suda T, Kamimura K, Tsuchiya A, Tamura Y, Yano M, Takamura M, Igarashi M, Wakai T, Yamagiwa S, Matsuda Y, Ohkoshi S, Kurosaki I, Shirai Y, Okada M, Aoyagi Y. Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Hepatol.* (査読有) 3(1):15-23, 2011
- ⑥ Ohkoshi S, Yamagiwa S, Yano M, Takahashi H, Aoki YH, Matsuda Y, Aoyagi Y. Very-Low-Dose Pegylated Interferon a2a Plus Ribavirin Therapy for Advanced Liver Cirrhosis Type C: A Possible Therapeutic Alternative without Splenic Intervention. *Case Rep. Gastroenterol.* (査読有) 4(2): 261-6, 2010
- ⑦ Osaki A, Kubota T, Suda T, Igarashi M, Nagasaki K, Tsuchiya A, Yano M, Tamura Y, Takamura M, Kawai H, Yamagiwa S, Kikuchi T, Nomoto M, Aoyagi Y. Shear wave velocity is a useful marker for managing nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* (査読有) 16(23): 2918-25, 2010
- ⑧ Sato K, Kawamura T, Yamagiwa S. The "Senobi" breathing exercise is recommended as first line treatment for obesity. *Biomed. Res.* (査読有) 31(4): 259-62, 2010
- ⑨ Takamura M, Yamagiwa S, Wakai T, Tamura Y, Kamimura H, Kato T, Tsuchiya A, Matsuda Y, Shirai Y, Ichida T, Ajioka Y, Aoyagi Y. Loss of liver-intestine cadherin in human intrahepatic cholangiocarcinoma promotes angiogenesis by up-regulating metal-responsive transcription factor-1 and placental growth factor. *Int. J. Oncol.* (査読有) 36(1): 245-54, 2010
- ⑩ Tsuchiya A, Kamimura H, Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Sato Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y. Clinicopathological analysis of CD133⁺ and NCAM⁺ human hepatic stem/progenitor cells in damaged livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatol. Res.* (査読有) 39(11): 1080-90, 2009
- ⑪ Tamura Y, Yamagiwa S, Aoki Y, Kurita S, Suda T, Ohkoshi S, Nomoto M, Aoyagi Y. The Niigata liver disease study group. Serum alpha-fetoprotein levels during and after Interferon therapy and the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.* (査読有) 54(11): 2530-7, 2009
- [学会発表] (計 8 件)
- ① Yamagiwa S, *et al.* Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. The 62nd annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011年11月7日 Moscone West Convention center (San Francisco, 米国)
- ② 山際 訓, 他. 肝細胞癌におけるNK細胞活性化レセプターリガンド発現低下とその臨床的意義. 第15回日本肝臓学会大会. 2011年10月20日. マリンメッセ福岡 (福岡市)
- ③ 山際 訓, 他. 自己免疫性肝炎急性発症時におけるAFPおよびAFP-L3分画の上昇. 第47回日本肝臓学会総会. 2011年6月3日. ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都港区)
- ④ 山際 訓, 他. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α -2a/Ribavirin併用療法における血清CXCL10値と治療効果の検討—新潟県多施設共同研究—. 第14回日本肝臓学会大会. 2010年10月13日. パシフィコ横浜 (横浜市)
- ⑤ 上村博輝, 山際 訓, 他. 肝細胞癌におけるNK細胞活性化レセプターリガンド発現とその調節による抗腫瘍効果増強の可能性. 第42回日本臨床分子形態学会総会. 2010年9月25日. 東レ総合研修センター (三島市)
- ⑥ 上村博輝, 山際 訓, 他. 肝細胞癌における分子標的としてのNK細胞活性化レセプターリガンドとその発現調節による抗腫瘍効果. 第46回日本肝臓学会総会. 2010年5月27日. 山形国際ホテル (山形市)

- ⑦ 上村博輝, 山際 訓, 他. C型肝炎の持続感染と抗腫瘍免疫機構からの逃避に関与するNK細胞活性化レセプターリガンド. 第96回日本消化器病学会総会. 2010年4月23日. 朱鷺メッセ(新潟市)
- ⑧ 山際 訓, 他. 肝移植後C型肝炎再発例における肝内NK細胞亜分画. 第27回日本肝移植研究会. 2009年7月10日. 東レ総合研修センター(三島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山際 訓 (YAMAGIWA SATOSHI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 10419327

(2) 研究分担者

高村 昌昭 (TAKAMURA MASAOKI)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号: 20422602
松田 康伸 (MATSUDA YASUNOBU)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 40334669
佐藤 好信 (SATO YOSHINOBU)
新潟大学・医歯学系・講師
研究者番号: 20313538

(3) 連携研究者

なし