

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591487
 研究課題名（和文） 免疫抑制剤がインターフェロンの肝細胞内シグナル伝達に与える影響
 研究課題名（英文） The influence of immunosuppressant to interferon signaling in hepatocyte
 研究代表者
 市川 辰樹（Ichikawa Tatsuki）
 長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：80346949

研究成果の概要：タクロリムスとサイクロスポリンがインターフェロンの肝細胞内のシグナルに与える影響を検討したところ、両方にインターフェロンの抗 HCV 作用を抑制する効果があるが、タクロリムスにおいて一層強いものであった。その機序は STAT-1 のリン酸化と核移行をタクロリムスが抑制することにより抗ウイルス蛋白 PKR の発現を抑制されることに関係すると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・移植

キーワード：肝移植

1. 研究開始当初の背景

近年、末期肝疾患に対する治療として肝移植が我が国でも浸透してきている。肝移植の成功率はタクロリムス(FK5066)やサイクロスポリン(CyA)などの強力な免疫抑制剤の使用により70%を超え、有効な治療として認められている。そして肝移植成功率が向上した後の移植の成否は手術の後に起こる原疾患の再発コントロールにかかっている。C型肝炎ウイルス(HCV)関連肝疾患は肝移植の過半数を占

めているが HCV も移植後、グラブに再感染する。近年 HCV 関連肝疾患移植後の生存率が悪化しており原因の一つとして免疫抑制剤の関与が推測されている(Hepatology 2002;36:202-210)。また HCV の移植後再感染に対する治療は C 型慢性肝炎と同様にインターフェロン(IFN)療法しかない。しかし肝移植後における IFN の抗ウイルス効果は明らかに慢性肝炎例より悪い(Liver Transplantation 2005;11:479-489)。肝移植後の HCV 再感染

は治療効果が十分でないことに加え、HCV 再感染は移植肝に急速な線維化の進行が出現するため (**Liver Transplantation 2005; 11: 479-489**)、移植肝と生命の予後を左右する重大な問題となっている。

2. 研究の目的

IFN の HCV ウイルスに対する抗ウイルス作用は免疫系を介さない肝細胞内の抗ウイルス蛋白による直接的な作用 (治療 2 日までの早期相) によるものと免疫系を介して感染細胞を排除する機序 (2 日目以降の後期相) が考えられている。肝移植後の免疫抑制剤投与下での IFN の抗ウイルス作用が免疫系の細胞による感染細胞排除において影響を受けることは想像に難くない。しかし早期相での影響は未知の分野である。早期相とは IFN が肝細胞内で発現する抗ウイルス蛋白により HCV の増殖を抑制する phase とされている。グルココルチコイド (PSL) に関しては IFN の肝細胞内シグナル伝達を抑制することが報告されている (**Journal of Immunology 2003; 170: 4833-4839**) が、FK506, CyA, Mycophenolate Mofetil (MMF) が肝細胞内シグナルに対して与える影響の基礎的検討はなく、PSL と各々の組み合わせについても同様である。

ところで、CyA については近年注目すべき基礎的検討が報告されている (**Hepatology 2003;38:1282-8, Gastroenterology 2005; 129: 1031-41**)。これらの報告は CyA が肝細胞内で HCV の増殖を抑制する可能性を示唆するものであり、その作用は FK506 には認められていない。カルシニューリン阻害剤として使用が必然である二剤であるがその生物学的活性には違いが認められ興味深い。

以上の現状を踏まえ、本研究では培養肝細胞を用い免疫抑制剤添加状態での IFN 刺

激による抗ウイルス作用減弱のメカニズムを解明し、各種免疫抑制剤と IFN 治療の適合性、つまり IFN の作用を妨げるものがないかを検討する。この検討では IFN 治療の早期相に相当する細胞内の状態を反映すると考えられる。肝移植後 HCV 再感染に対する IFN 療法下における至適な免疫抑制療法のプロトコール開発を目指す。

3. 研究の方法

実験にはヒト肝細胞由来細胞株とヒト肝癌細胞株、HCV レプリコンが恒久的に導入されている肝癌細胞株を用いた。抗ウイルス蛋白 PKR と Jak-1、STAT-1 リン酸化はウエスタンブロット、核移行は免疫蛍光染色で評価した。IFN 感受性プロモーター配列 (ISRE) をもつレポーター遺伝子を使い、薬剤のプロモーターに与える影響を検討した。HCV レプリコン量はルシフェラーゼ活性の測定で代用した。

4. 研究成果

(1) タクロリムス (FK506) の前処置は IFN 誘導性抗ウイルス蛋白 PKR と STAT-1 の発現は減少した。サイクロスポリン (CyA) での抑制効果は明らかでなかった。

(2) FK506 による IFN シグナルへの影響は STAT-1 と STAT-2 のチロシンリン酸化の減弱として現れた。またリン酸化 STAT-1 の核内移行も FK506 で抑制されていた (ウエスタンブロット法と免疫蛍光染色法)。

(3) IFN 誘導性の Jak-1 のリン酸化には FK506 の影響はなかった。

(4) IFN 誘導性に ISRE の活性は上昇するが、FK506 により、その活性は減弱し、CyA では抑制効果は明らかではなかった。

(5)HCVレプリコンを用いた実験でもIFNの抗 HCV 作用はタクロリムスで阻害された。また CyA は単独で抗 HCV 効果をもち、IFN併用でもその抗 HCV 効果に変化はなかった。

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 8 件)

Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Takeshita S, Shibata H, Ozawa E, Akiyama M, Miura S, Eguchi K. Predictive value of the phosphorylation of signal transducers and activators of transcription in the outcome of interferon therapy for chronic hepatitis C. *Intervirology*, 51, 394-9, 2008, 査読有

Nakamura H, Usa T, Motomura M, Ichikawa T, Nakao K, Kawasaki E, Tanaka M, Ishikawa K, Eguchi K. Prevalence of interrelated autoantibodies in thyroid diseases and autoimmune disorders. *J Endocrinol Invest* 31, 861-5, 2008, 査読有

Akiyama M, Miyaaki H, Miura S, Shibata H, Fujimoto M, Takeshita S, Ozawa E, Ichikawa T, Nakao K, Eguchi K. Significance of trans-hepatic arterial chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus. *Oncol Rep* 20, 353-7, 2008, 査読有

Goto T, Ishikawa H, Matsumoto K, Nishimura D, Kusaba M, Taura N, Shibata H, Miyaaki H, Ichikawa T, Hamasaki K, Nakao K, Maeshima Y, Eguchi K. Tum-1, a

tumstatin fragment, gene delivery into hepatocellular carcinoma suppresses tumor growth through inhibiting angiogenesis. *Int J Oncol*. 33:33-40. 2008, 査読有

Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transpl*, 14,292-8, 2008, 査読有

Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Yatsushashi H, Furukawa R, Ohba K, Omagari K, Kusumoto Y, Yanagi K, Inoue O, Kinoshita N, Ishibashi H, Yano M, Eguchi K. Clinicopathological study of nonalcoholic fatty liver disease in Japan: the risk factors for fibrosis. *Liver int*. 28, 519-24, 2008 査読有

Eguchi S, Takatsuki M, Soyama A, Hidaka M, Tokai H, Hamasaki K, Miyazaki K, Tajima Y, Ichikawa T, Kanematsu T. Intentional conversion from tacrolimus to cyclosporine for HCV-positive patients on preemptive interferon therapy after living donor liver transplantation. *Ann Transplant* 12, 11-5, 2007, 査読有

Kusaba M, Nakao K, Goto T, Nishimura D, Kawashimo H, Shibata H, Motoyoshi Y, Taura N, Ichikawa T, Hamasaki K, Eguchi

K Abrogation of constitutive STAT3 activity sensitizes human hepatoma cells to TRAIL-mediated apoptosis. J Hepatol. 2007.47, 546-55, 2007 査読有

〔学会発表〕(計3件)

市川辰樹、肝移植例における肝炎ウイルス対策の検討、日本肝臓学会第12回大会、2008.10.2、東京

Ichikawa T、Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporine A, on interferon induced anti-viral protein in human hepatocyte cell、44th Annual Meeting of the Europe Association for the Study of the Liver、2008.4.22、ミラノ(イタリア)

市川辰樹、長崎大学での生体肝移植に対するチーム医療-内科の立場から、第37回日本肝臓学会西部会、2007.10.7、長崎

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川辰樹 (Ichikawa Tastuki)
長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：80346949

(2) 研究分担者

中尾一彦 (Nakao Kazuhiko)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00264218

(3) 連携研究者