

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25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590735
 研究課題名（和文）HCV関連肝移植における新たな細胞免疫療法の開発
 研究課題名（英文）To develop a new immune therapy for post liver transplantation hepatitis C.
 研究代表者
 高木 章乃夫 (TAKAKI AKINOBU)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：80359885

研究成果の概要（和文）：肝臓移植後 C 型肝炎患者において、免疫抑制分子の発現を解析、病状との関係につき明らかにした。肝臓の組織において、免疫力を抑制する働きと免疫力を強める働きの両方を持つ PD-L2 分子発現程度を免疫染色法によって検討、肝臓移植後 C 型肝炎患者において強く発現し、これには免疫抑制剤の働きが関係していることを明らかにした。また、血液中の免疫抑制性 T 細胞が重症 C 型肝炎再発患者で、より多く存在することを明らかにした。これらの免疫抑制分子の発現を抑制することで移植後 C 型肝炎の重症再発を防止できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Immune regulation related molecule PD-L2 expression in the liver biopsy specimens and regulatory T cell frequency in peripheral blood were analyzed in post transplantation hepatitis C patients. The PD-L2 expression in the liver specimen was stronger in post-transplantation hepatitis C patients than other etiology. The regulatory T cell frequency was higher in severe hepatitis C recurrent patients. We found that these immune regulatory molecules could be the target to reduce post-transplantation severe hepatitis C recurrence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器内科学

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：肝臓移植 C型肝炎

1. 研究開始当初の背景

(1) C型肝炎硬変による肝移植後のC型肝炎ウイルス (HCV) 再感染率はほぼ100%である。

(2) 肝移植後C型肝炎のインターフェロン治療によるウイルス駆除率は30%程度に過ぎない。

(3) 制御性T細胞 (Treg, Tr1) が拒絶反応に関与していることが腎移植などで報告されている。

2. 研究の目的

C型肝炎硬変生体肝移植後の経過とともに肝臓局所における免疫制御分子及び、拒絶と免疫寛容に關与する免疫学的マーカーの解析、HCV特異的免疫応答の解析を行い、移植後の肝炎と拒絶、HCV特異的免疫応答がどのようなバランスで病態を形成しているのか、明らかにする。

3. 研究の方法

C型肝炎硬変肝移植後患者において、

(1) 1年に1回のプロトコール肝生検時に採取した肝組織を用いて、免疫制御分子の発現を免疫組織染色で半定量する。

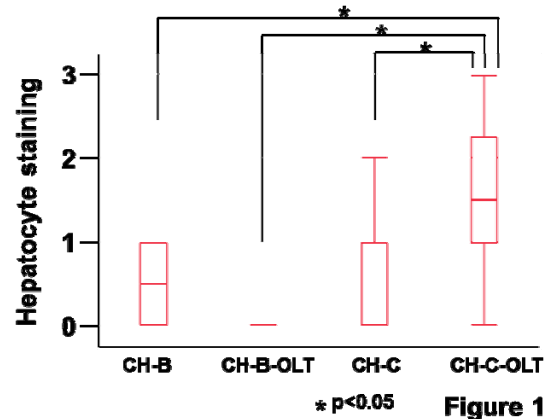
(2) 移植後1週目、1ヶ月目、以後1ヶ月毎の採血時に研究用採血を行い、Tregおよびアロ特異的CD4陽性T細胞の分画、マイクロキメリズムの定量により臨床的な拒絶反応として表出する閾値以下の拒絶反応を可視化する。HCV抗原特異的な免疫応答については、ELISPOT法によるウイルス抗原特異的なCD4陽性T細胞応答、を定量する。

(3) これらのデータを総合的に評価することで、1) 肝臓の炎症2) 拒絶3) ウイルス特異的免疫応答の程度、の関連を明白にする。

4. 研究成果

(1) 肝生検組織での免疫抑制分子PD-1 のリガンドPD-L2発現に関する検討：
生体肝移植後C型肝炎症例 (移植後C; 14例) ・

生体肝移植後B型肝炎症例 (移植後B; 8例) ・ 非移植後C型肝炎症例 (C; 48例) ・ 非移植後B型肝炎症例 (B; 15例) の肝生検組織でPD-L2発現を免疫組織染色法で検討した。PD-L2発現はB及び移植後Bの症例では低く、肝炎活動性の高いC及び移植後C全体で高かった。培養肝癌細胞株を用いて移植後に使用される免疫抑制剤がPD-L2発現に影響を与えているか検討した所、カルシニューリン阻害剤投与にてPD-L2の発現が亢進し、この作用はC型肝炎ウイルス蛋白を添加することでより強くなることが明らかになった。また、PD-L2の発現を亢進させたところ炎症反応に関与している接着分子ICAM-1の発現が亢進した。

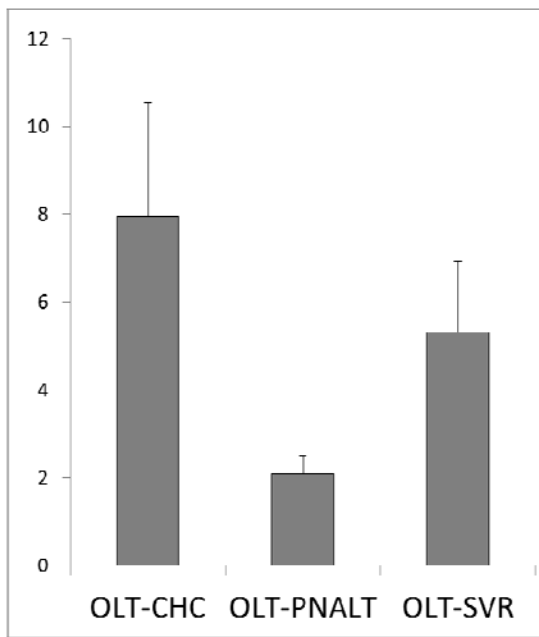


以上より、肝炎活動性の高いC型肝炎及び免疫抑制剤を使用する移植後C型肝炎にてはPD-L2発現が亢進し、炎症に関連する細胞接着分子発現が亢進し、肝炎重篤化に関与している可能性があると考えられた。

(2) 肝臓移植後C型肝炎患者の経過と制御性T細胞 (Treg, Tr1) の推移に関する検討：

生体肝移植後、活動性C型肝炎再燃症例 (活動C・OLT-CHC; 14例) ・ C型肝炎ウイルス陽性だが肝機能異常を示さない非活動性C型肝炎症例 (非活動C・OLT-PNALT; 12例) ・ C型肝炎ウイルスに再感染したもののインターフェロン治療によりウイルス駆除に成功した症例 (駆

除C・OLT-SVR；6例)につき、Treg, Tr1の末梢血における頻度と臨床経過との関連につき検討した。Tregは(駆除C)症例で(活動C)と比較して少ない傾向があった。Tr1は(非活動C)症例で(活動C)と比較して有意に低値を示した。C型肝炎ウイルス構成タンパクの一つであるNS3抗原特異的なCD4T細胞のインターフェロンガンマ応答は(駆除C)症例で高値であり、Tregと逆の相関を示した。



以上の結果より、肝移植後において、制御性T細胞のうち、Tregは活動性C型肝炎では高値で、ウイルス駆除により低下すること、Tr1はウイルス感染状態で肝炎のコントロールに関与すること、が明らかとなった。

(3) 総合的な判断：

移植後C型肝炎の進行にウイルス抗原と免疫抑制剤併用により誘導される肝細胞PD-L2発現が悪影響している可能性があり、動物モデルなどを用いて肝細胞でのPD-L2発現を抑制するような治療が可能か検討する必要がある。また、免疫制御性T細胞・ウイルス抗原特異的応答については、Tregが低くウイルス抗原特異的インターフェロンγ応答が高いことがウ

イルス駆除と関係していることが明らかになり、これらを調節する治療の可能性を検討する必要がある。また、Tr1細胞はウイルス駆除が出来ない状態であっても肝炎の進行をコントロールできる可能性があり、Tr1を低下させる治療の可能性を検討する必要がある。

しばしばインターフェロン治療も無効でコントロール困難な移植後C型肝炎の管理に免疫抑制剤の調節を含めた免疫制御系細胞の変化が重要であることが明らかになり、今後の治療の発展につながる可能性がある。

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)

[学会発表] (計4件)

1) Takaki A, Koike K, Yagi T, Sadamori H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Sato D, Utsumi M, Yasunaka T, Fujiwara T, Yamamoto K. : Sequential changes of regulatory T cell fraction after liver transplantation. AASLD2012 (Boston, USA) 11/9-13, 2012.

2) Koike K, Takaki A, Yagi T, Sadamori H, Shinoura S, Umeda Y, Yoshida R, Sato D, Utsumi M, Yasunaka T, Yamamoto K. :

Low frequency of Tr1 in peripheral blood correlated with persistent normal ALT in chronic hepatitis C after liver transplantation. UEGW2012 (Amsterdam, Holland) 10/20-24, 2012.

3) Takaki A, Koike K, Yagi T, Iwasaki Y, Sadamori H, Matsuda H, Yasunaka T, Miyake Y, Ikeda F, Kobashi H, Kazuhide Yamamoto. : Costimulatory molecule PD-L2 is expressed in the hepatocytes of patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation HCV2010 (Yokohama, Japan) 9/10-14, 2010

4) 高木章乃夫, 小池和子, 山本和秀 : C型肝炎ウイルス蛋白による樹状細胞機能変化の検討 ; 第96回日本消化器病学会総会 新潟 平成22年4月22日~4月24日 シンポジウム7 『C型肝炎：ウイルス感染の分子免疫機構』

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 章乃夫 (TAKAKI AKINOBU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授
研究者番号：80359885

(2) 研究分担者

八木 孝仁 (YAGI TAKAHITO)
岡山大学・岡山大学病院・教授
研究者番号：00304353

渡辺 信和 (WATANABE NOBUKAZU)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：10334278