

濱崎 幸司 論文内容の要旨

主 論 文

Hepatocyte growth factor up-regulates interferon signaling in human hepatocytes
- A possible implications for interferon therapy after liver transplantation.

肝細胞増殖因子がヒト肝細胞のインターフェロンシグナルにもたらす影響
-肝移植後におけるインターフェロン治療への関連

濱崎 幸司、江口 晋、市川 辰樹、高槻 光寿、日高 匡章、
山之内 孝彰、宮崎 健介、猪熊 孝実、兼松 隆之

Interventional Medicine and Applied Science, Vol.3. Number 1. 2011 (in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

主任指導教員：兼松 隆之 教授

(教室主任代理：中尾 一彦 教授)

緒 言

C型肝炎ウイルス(HCV)は全世界で約3.3%もの感染率であり、HCV関連疾患は肝移植の原疾患で第1位を占めている。肝移植前にHCVを駆除できない場合移植後再感染は必発であり、肝炎発症後は移植後5～10年で10～25%が肝硬変に陥り、一旦肝硬変へ進行した場合、肝不全へ進展する危険性が約40%と高率になる。このように移植後HCV肝炎再発は長期グラフト機能維持に大きく関与する。

従って肝移植後にHCV再感染を未然に防ぐことが重要となる。現在Peg-IFN(IFN) + Ribavirin(RBV)併用療法が抗HCV療法の主流であるが、近年の治療戦略の改良により、慢性肝炎におけるsustained virological response(SVR)は50-80%と比較的良好になってきた。しかし肝移植後に抗ウイルス療法を開始する適切な時期については、統一された見解が得られていない。そこには、我が国で広く行われている部分肝移植後に起きる肝再生、そして術後に投与される免疫抑制剤が大きく関与していると考えられる。

我々はIFN誘導抗ウイルス蛋白の一つであるdouble-stranded RNA-dependent protein kinase(PKR)と、それを誘導するシグナル伝達経路のJak-STAT経路に着目し、ヒト培養肝細胞を用いて、IFNシグナルに対する肝再生、そして免疫抑制剤の影響をin vitroにて検討した。

対象と方法

正常ヒト肝細胞(NhHeps)(Lonza, Switzerland)を10% fatal bovine serumを加えたRPMI1680で37°C、5%CO₂の環境下で培養した。

実験1：IFN- α 誘導蛋白の一つであり、IFN- α の抗ウイルス活性の一端を担うPKRの発現について、肝再生が与える影響を、HGFとNhHepsを用いて検討した。

NhHepsを 1×10^5 個/well播種し、pilot studyで至適条件と定めた5ng/mlのrecombinant-human hepatocyte growth Factor (r-hHGF)で48時間培養。その後IFN 100IUを加え、24時間培養した。培養細胞から得られた蛋白成分をNupage 4-12%Bis-Tris Gels(Invitrogen)で電気泳動を行い、Hybond-P PVDF Membrane(Amersham Biosciences)に蛋白質の転写を行なった。抗体と反応させた後、Hyperfilm-ECL(Amersham Biosciences)に感光させ現像し、PKRのBand発現の強弱を検討した。

実験2：肝再生刺激下における、PKRの発現と免疫抑制剤との関連について検討した。

NhHepsを実験1同様播種し、rHGF 5ng/mlを加え48時間培養後、Cyclosporine A(CyA)(10 μ M, 100 μ M)、Tacrolims(Tac)(1 μ M, 10 μ M)、さらにMethylprednisolone(PLS)を16時間処理後、IFNで処理した。その後は実験1同様に処理し、Western blottingを行った。

Bandの強弱をImage Jで測定し、実験1ではHGF(-)/IFN(-)群を、実験2ではHGF(-)/免疫抑制剤(-)群をコントロールとして算出したDensity Index(DI)を比較検討した。

結 果

実験1：HGF投与群と非投与群を比較すると、DI(平均値)はHGF(+)/HGF(-)=2.42/1.73と、HGF投与群で有意に増強していた($p < 0.005$)。

実験2：HGF投与群のDI(平均値)は、FK：1.17、CyA：1.36、PLS：1.42と非投与群に比しPKR発現は増強していた。HGF非投与群では、FK：0.74、CyA：0.92、PLS：0.99とPKRの発現はFK>CyA>PLSの順に抑制されていた。

考 察

今回の検討から、HGFにもたらされる肝細胞増殖刺激により、IFNの抗ウイルス作用は増強するものの、その効果は免疫抑制剤投与で減弱することが示され、移植後早期の肝再生が盛んな時期にIFN治療を開始しても著しい遜色はない、と考えられた。またIFN治療に抵抗性を示すHCV関連疾患群において、HGFの追加投与でIFN治療効果が増強する可能性が示唆された。

免疫抑制剤については、HGF投与群・非投与群それぞれでPKR発現に差異があることから、免疫抑制剤選択によってIFN治療の抗ウイルス作用が異なってくる事が示唆された。HCVに対するIFN治療という観点からは、CyAでの免疫抑制剤の選択が最も適切ではないか、と考えられる。

以上より、HCV関連疾患での肝移植後抗ウイルス療法は、ウイルス量が最も少ない術後早期から、CyA投与下でのIFN治療開始が有効である、と推察された。