移植肝生着に寄与する分子の探索と新規治療戦略の開発に関する研究

2015

新家　遥

目　　次

総 論 の 部

緒　言

肝臓移植術は末期肝不全患者に対する根治治療法として、1960 年代より開始された。その後免疫抑制薬の開発に伴って移植医療は急速に普及し、現在では国内だけでも年間 400 件を超える肝移植が行われている。しかし、術後に生じる様々な合併症は移植片（グラフト）の生着のみならず患者の予後を大きく左右する重大な問題となる。拒絶反応は、臓器を受けとる患者（レシピエント）のリンパ球が他人の臓器であるグラフトを非自己として認識し排除しようとするために生じる反応であり、様々な免疫抑制薬が開発されその使用法が確立されている現在においても、未だグラフトの生着を妨げる主要な要因となっている。また、拒絶反応を避けるために免疫抑制薬を使用することによって、ウイルスや細菌、真菌などに感染する危険性が高まることも患者の予後に大きく影響を及ぼす。感染症は、肝臓移植後の院内死亡原因の約 6 割を占めることが報告される[1]など、早急に解決すべき問題の一つとされている。さらに、肝臓移植後の免疫抑制薬として主に使用されているタクロリムスのもつ毒性も腎障害や神経障害など合併症を引き起こす一因となる。特に急性の障害として、腎機能の指標である血清クレアチニン値のわずかな上昇がその後の死亡率に大きく影響することや[2]、急性腎障害が進展し慢性腎臓病へと至った場合においては、死亡のリスクが 4.5 倍にも上昇すること[3]など、タクロリムス誘発性の腎障害が生命予後に与える影響がこれまでに数多く報告されている。従って、肝臓移植術後合併症の適切な診断とそれに基づく早期の対処は、移植医療の成績向上に貢献すると言える。

これら合併症により生じる肝機能不全を検出するため、日常診療ではアラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase, ALT）やアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartic aminotransferase, AST）、ビリルビン値などの生化学的検査値が肝機能の指標として用いられている。しかしながら、これらの値はいずれも肝細胞の破壊や胆汁うっ滞など障害が起きた結果を反映するにすぎず、何が原因でこのような現象が生じているかまではわからないのが現状である。また、原因を特定するには肝生検を行い、病理組織学的な評価を行う必要があるが、専門性の高い病理医でなければ見分けがつかない症例も少なくない。例えば診断の結果が拒絶反応であれば免疫抑制薬を増量する必要があるが、感染症であれば反対に免疫抑制薬を減量しなければならず、万が一判断を誤ると全く反対の対処をすることとなり大変危険である。そのため、肝臓で生じていることを的確に診断、あるいは何が今後起ころうとしているのかを予測し得る指標が必要である。

このような背景の下、著者は術後合併症の的確な診断及び早期の対処を行うにあたり有

用な分子生物学的指標を探索することを通して、肝臓移植後患者の生命予後改善を目指し、以下の検討を行った。第Ⅰ章では、免疫抑制薬として使用されるタクロリムスにより生じる腎障害を検出するための非侵襲的な指標の探索を行い、その有用性を評価した。また、第Ⅱ章では感染症の中でもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)感染症発症に繋がる危険因子の探索を行い、タクロリムス経口投与による術後管理に注意を要する患者の特徴を見出した。さらに第Ⅲ章では、術前の移植片における遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することにより、急性拒絶反応発症に関連する分子機構の一端を解明した。

以下、本研究により得られた結果を論述する。

第 I 章　肝臓移植後患者におけるタクロリムス誘発性腎障害検出のための尿中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)の有用性

カルシニューリン阻害薬であるタクロリムスは、肝臓移植後患者における免疫抑制薬として広く用いられているが、個体内あるいは個体間の変動が大きいことに加え、治療域が 5-15 ng/mL と狭いことが知られており、使用にあたって血中濃度モニタリング (therapeutic drug monitoring, TDM)が必須となる。血中濃度が治療域を上回る患者では、腎障害や神経障害など副作用のリスクが高まることが報告されている[4, 5]。中でも、急性腎障害 (acute kidney injury, AKI)は肝臓移植後に高頻度で生じるのみならず、患者の予後を左右する合併症として問題となっている[6, 7]。

日常診療で腎機能の指標として用いられている血清クレアチニン (serum creatinine, Scr)値は主に糸球体ろ過能を反映するため、薬剤による影響を最も受けやすい部位とされる近位尿細管上皮細胞での障害を反映する指標としては感度が低く、また食餌や筋肉量など腎機能以外の因子による変動も受けるため、薬剤誘発性の腎障害に対して特異性が高くないことが問題として指摘されている[8]。そのため、AKI を反映する高感度で特異性の高い指標が求められ、様々な研究が進められてきた。これまでに実験動物ならびに臨床患者における検討の結果、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)[9, 10]、liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP)[11, 12]など複数の分子について、AKI の指標としての有用性が報告されている。一方で、2007 年には AKI を分類する基準として Acute Kidney Injury Network (AKIN) criteria が発表された[13]。これによると、48 時間以内の Scr 値の変化を指標とし、0.3 mg/dL 以上もしくは 1.5 倍以上の値へ上昇した場合に AKI とみなされる。しかしながら、肝臓移植術施行後の患者の中には、Scr 値が緩やかに上昇するために AKIN criteria には当てはまらないものの、タクロリムス誘発性腎障害が疑われる例が少なくない。

このような背景のもと、本章では肝臓移植後患者におけるタクロリムス誘発性腎障害検出のための指標を探索することを目的とし、これまでに AKI を反映する尿中バイオマーカーとして報告されている 7 分子の挙動を比較することでその有用性を評価した。

第 1 節 タクロリムス誘発性腎障害により生じるバイオマーカーの尿中濃度変化

対象とした 93 例の患者から基準に従って患者を除外し、述べ 31 例の患者検体を用いて検討を行った。このうち、腎機能に変化が認められなかった患者 (AKI-free)は 11 例、タクロリムス誘発性腎障害であると診断された患者 (AKI)は 20 例であった。健康成人男性 8 例により構成される Healthy volunteer 群においては、肝臓移植術を施行された患者群に比して年齢が有意に低く ($p = 0.026$)、術前の血清クレアチニン (Scr)値が有意に高値を示した ($p = 0.024$)。しかし Scr 値と併せて腎機能の指標として使用される血中尿素窒素値 (blood urea nitrogen, BUN)や推定糸球体ろ過量 (estimated glomerular filtration rate, eGFR)については差が認められていないことから、この結果は腎機能の差を表すものではなく筋肉量の差を反映しているものと推察している。一方で、AKI 群において AKI-free 群と比較して、肝疾患の重症度を表す指標である Child-Pugh スコアが顕著に高値を示した ($p = 0.037$)。この結果は、タクロリムス誘発性腎障害を発症した患者は、術前の肝機能障害の程度がより重度であったことを示す。このことから、肝疾患の重症度が高い患者においては肝腎連関等により腎臓にも少なからず悪影響が及んでおり、その結果タクロリムスの毒性による腎臓への障害を受けやすくなっている可能性が示唆された。これまでに、肝臓移植術前の肝機能状態が術後 AKI 発症の危険性を高めるという報告もなされていることから[22, 23]、妥当な結果であると考える。なお、観察期間中のタクロリムスの総投与量及び平均血中濃度に有意な差は認められなかった。

上記患者群及び健康成人より採取した尿検体を用いて、移植後タクロリムス投与前における各バイオマーカーの尿中濃度を測定した。その結果、AKI 群において NGAL、MCP-1、L-FABP 及び IL-18 の尿中濃度が Healthy volunteer 群と比較して顕著に高値を示した。また、オステオポンチン及びクラスタリンの尿中濃度は AKI 群において有意に低値であった。これら分子は、術直後からタクロリムスによる腎障害の生じやすさを予測し得る可能性は示唆されるが、移植術そのものの影響により尿中への漏出量が変化している可能性も考えられる。特に、AKI 群及び AKI-free 群との間で差が認められていない IL-18、オステオポンチン、クラスタリンについては、移植術を施行されたことにより生じる尿中への漏出量変化を主に反映しており、腎障害の生じやすさを予測する指標としては有用性に欠けると考えられる。一方で MCP-1 については、Healthy volunteer 群と比較して AKI-free 群の濃度が有意に高値を示すだけでなく、AKI 群において AKI-free 群に比してさらに高値を示していることから、術前の潜在的な腎障害あるいは移植術そのものによる腎臓へのダメージの程度を反映し、肝臓移植術後のタクロリムス誘発性腎障害の生じやすさを予測する指標になり得ると考えられる。NGAL 及び L-FABP については AKI-free 群と AKI 群との間に有意な差は認められていないものの AKI 群において上昇傾向が認められ、術後に生じる AKI を検出し得る可能性も否定できない結果であった。

続いて、術後に生じたタクロリムス誘発性腎障害を的確に反映し得るかについて検討を加えるため、タクロリムス投与後に AKI 群より採取した尿検体のうち AKI と診断されている期間の尿検体及び AKI-free 群より採取した尿検体を用いてバイオマーカー濃度を測定し、2群間で比較した。その結果、NGAL、MCP-1 及び L-FABP の 3 分子の濃度は、AKI 群において AKI-free 群と比較して有意に高値を示し、肝臓移植術施行後に生じたタクロリムス誘発性腎障害を反映する指標として有用である可能性が示された。

第 2 節 タクロリムス誘発性腎障害を反映するバイオマーカーとしての有用性評価

本検討において測定対象とした 7 分子について、タクロリムス誘発性腎障害を反映するバイオマーカーとしての有用性をさらに評価するため、receiver operating characteristics (ROC) 解析を行った。ROC 解析は、臨床研究においては独立変数とアウトカムとの関係の強さを評価する方法として、すなわち診断や検査の有用性を検討する手法として利用されている[24]。独立変数とアウトカムとの関係性を ROC 曲線として描き、その曲線下面積 (AUC)を比較することで診断指標の有用性を評価することができ、AUC が 1 に近いほど有用性が高いと言える。ROC 解析の結果、NGAL の AUC が 0.876 ($p < 0.001$)と算出され、今回測定した 7 分子の中で最も大きい値を示した。次いで MCP-1 が 0.781 ($p < 0.001$)であった。タクロリムス誘発性腎障害の診断指標としての感度、特異度についても、NGAL はそれぞれ 0.78、0.86 と良好な値を示した。これらの結果から、今回測定対象とした 7 つのバイオマーカー候補のうち、肝臓移植術施行後のタクロリムス誘発性腎障害を反映する非侵襲的な指標として、尿中 NGAL が最も有用であることが明らかとなった。

第 3 節 シスプラチン誘発性腎障害を反映するバイオマーカーとしての有用性評価

第2節までの検討により、タクロリムス誘発性腎障害を反映するバイオマーカーとして尿中 NGAL が有用であることが示唆された。一方で、著者の所属研究室ではラットを用いた検討によって、白金系抗がん剤シスプラチン誘発性の腎障害を検出するためのバイオマーカーとして尿中 MCP-1 が有用である可能性を報告している[14]。シスプラチン誘発性腎障害は、薬剤誘発性腎障害の中でもその発現機序解明を目指した検討が多くなされており、典型的な尿細管上皮細胞障害のモデルとして汎用される。そこで本節では、障害を誘発する薬剤によって有用であるバイオーカーが異なる可能性について評価を行うため、シスプラチン誘発性腎障害を反映する指標としての尿中 NGAL の有用性について検討を加えた。

著者の所属研究室における動物モデルを用いた検討によってシスプラチン誘発性腎障害の指標として有用であることが示された MCP-1 及びその比較対象として用いた kidney injury molecule-1 (KIM-1)に NGAL を合わせた 3 分子間で、臨床患者での有用性を比較した。まず、AKI と判断された期間に採取した 30 検体及びその他の 12 検体を用いて、各バイオマーカー濃度の比較を行った。その結果、KIM-1 及び MCP-1 については AKI (+)群において有意に高値を示した一方で NGAL については両群間で差は認められず、尿中 NGAL はシスプラチン誘発性腎障害を反映する指標としては有用性が低いことが示唆された。続いて第 2 節と同様に、ROC 解析を行うことにより各分子のバイオマーカーとしての有用性を評価した。その結果、ROC 曲線における AUC の値が KIM-1 は 0.858、MCP-1 は 0.850 と良好な値を示した一方で、NGAL は 0.608 と算出された。これらの結果より、ラットを用いた検討と同様に臨床患者においてもシスプラチン誘発性腎障害を反映するバイオマーカーとしては尿中 MCP-1 の有用性が高く、NGAL の有用性は劣ることが明らかとなった。これにより、薬剤性腎障害の中でも障害を引き起こす要因となる薬剤によって、有用なバイオマーカーが異なることが示唆された。

第 4 節　Scr 値及び尿中 NGAL 濃度の経時的変化と血中タクロリムス濃度との関連

尿中へ漏出してくる NGAL 濃度の変化と Scr 値及び血中タクロリムス濃度変化との時間的な関連を明らかにするため、AKI と診断された時期に応じて 4 グループに分け、それぞれの濃度変化を経時的に観察した。AKI-free の患者においては、タクロリムス血中濃度が観察期間を通してほぼ目標血中濃度域に含まれており、良好にコントロールされていた。これらの症例においては、Scr の値もあまり大きく変化することなく基準値 (男性: 0.65~1.09 mg/dL, 女性: 0.46~0.82 mg/dL)の範囲内で推移し、尿中 NGAL 濃度についても ROC 曲線から算出されたカットオフ値である 61.0 ng/mg creatinine をほぼ上回ることがなかった。一方で、術後 5 日目までに AKI と診断された患者群については、術直後からタクロリムス血中濃度が大きく上昇し、治療域の上限である 15 ng/mL を上回り、それに伴って Scr 値も大きく変動していた。尿中 NGAL の濃度についても、術直後は AKI-free 群とほぼ同等であったにも関わらず、その後すぐにカットオフ値を上回り、観察期間中は高値を維持していたことが明らかとなった。術後 6-10 日の間に AKI と診断された患者群においても同様に、AKI と診断された時期にタクロリムス血中濃度が急上昇する傾向が観察され、それに少し遅れて Scr 値も上昇していた。尿中 NGAL 濃度についても、AKI と診断される期間に先駆けて上昇傾向が認められ、さらに観察期間を通して常にカットオフ値以上の高値を示していた。加えて、術後 11 日目以降に AKI と診断された患者群でも同様の結果が示されており、タクロリムス血中濃度の上昇に伴って Scr 値及び尿中 NGAL 濃度の上昇が観察された。これらの結果

より、Scr 値の変化はタクロリムス血中濃度の変化に伴って生じることが改めて確認でき、それに加えて尿中NGAL濃度の変化はタクロリムスによる腎障害、特にScr値の上昇をリアルタイムに反映するマーカーとなり得ることが示唆された。すなわち、尿中NGAL濃度を測定することによりその時点でタクロリムスによって腎臓に障害が生じているか否かを非侵襲的にかつ迅速に判別することができ、その結果に基づいてタクロリムスの投与設計を最適化する指標となり得る可能性が示された。

第5節 尿中NGAL濃度によるタクロリムス誘発性腎障害発症の予測性評価

これまでの検討結果より、尿中 NGAL 濃度を測定することでタクロリムス誘発性腎障害を的確に検出できる可能性が示された。しかしながら、タクロリムスの血中濃度推移と同時に変化しているのであれば、TDMに追加して尿中NGAL濃度を測定する必要性は低い。そこで、術直後あるいはタクロリムス投与後のある時点において尿中 NGAL 濃度を測定することにより、その後のタクロリムス誘発性腎障害の発症を予測し得るかについて検討を加えた。AKI群の患者のうち、術後1週間の間にAKIと診断された患者8例と、2週間目に診断された患者 5 例を対象とした。その結果、両群間で有意な差は認められなかったが、AKI群の方が若干高値を示す傾向が観察された。この値を用いて改めてROC解析によりカットオフ値を求めたところ、12.8 ng/mg creatinineと算出された。タクロリムス投与前にカットオフ値を上回っていた患者14例のうちその後実際にAKIと診断された患者は57.1%を占め、術直後の尿中NGAL濃度が高値を示した場合、その後7日以内にタクロリムス誘発性腎障害を発症する可能性が有意に高いことが示唆された ($p = 0.0446$)。さらに、術後2週間目にAKIと診断された患者について、術後7日目の尿中NGAL濃度をAKI-free群と比較した。その結果、AKI 群において有意に高値を示していた ($p = 0.0006$)。術後 7 日目の尿中NGAL濃度についても、ROC曲線よりカットオフ値を算出した結果62.6 ng/mg creatinineと算出され、カットオフ値を上回っていた患者のうちAKIと診断された患者は83.3%を占めていた。今回対象とした患者群は少数であるためさらに規模を拡大した検討が必要ではあるが、尿中NGAL濃度を測定することは、その後7日以内に生じるタクロリムス誘発性腎障害を予測する指標として有用であることが示唆された。

考察

末期肝不全患者において、肝不全に伴う凝固能異常、浮腫や肝性脳症の他に、臓器同士の連関によって生じる腎機能低下や呼吸機能異常など様々な症状を合併することが報告されている[25, 26]。それに加えて肝臓移植術そのものも侵襲性が極めて高く、腎臓をはじめとした他臓器へ虚血再灌流障害などの負担を与える[27]。McCaulerらは肝臓移植術後の患者において、Scr 値の最大値が 3 mg/dL を超えた場合、死に至る危険性が有意に高まることを報告している[28]。また Fraley らも、肝臓移植後患者において AKI と診断された場合の死亡率は 41%と高値を示す一方で、AKI と診断されていない患者については 5%にとどまることを明らかにする[29]など、肝臓移植術施行後患者における腎機能の低下は患者の予後を大きく左右する重大な問題であることが示されている。さらに、肝臓移植後に生じる AKI の主な原因の一つとなるのが、免疫抑制薬として使用されるカルシニューリン阻害薬であることもこれまでに報告されており[22, 28]、カルシニューリン阻害薬、特に肝臓移植後患者において主に使用されるタクロリムスが原因となって誘発される腎障害を回避することは、肝臓移植術施行後患者の予後改善に繋がると期待される。

これまでに、心臓血管手術後の患者や重度感染症患者など虚血性の AKI を発症した患者において有用な診断指標の探索を目的とした研究が多数報告されてきた。そこでこれまで主に虚血性 AKI のバイオマーカーとしての有用性が報告されている 7 種の分子について濃度測定を行い、肝臓移植術後患者におけるタクロリムス誘発性腎障害の検出に適した指標の探索を試みた結果、尿中 NGAL が最も有用なバイオマーカーとなり得ることを明らかとした。NGAL は、好中球分泌顆粒中の gelatinase B と共有結合している未知のタンパク質として 1993 年に Kjeldsen らによって同定された[30]。その後 2002 年、2005 年にそれぞれ腎臓の分化誘導活性や腎保護活性を有することが報告され[31, 32]、これまで腎障害に関与するタンパク質として研究が進められてきている。臨床患者検体を用いた検討においても、心臓手術後[10, 33]や肝臓移植後の患者[34]における虚血性の腎障害、あるいはシスプラチン誘発性腎障害[35]や造影剤による腎障害[36]など急性の尿細管壊死に対して、有用な診断指標となり得る可能性が報告されてきている。しかし、タクロリムス誘発性の腎障害と NGAL の尿中への漏出量増加との関連を示した報告は本研究が初めてであり、タクロリムスによる腎障害において NGAL が尿中へ漏出する詳細な機序は不明である。一方、今回測定対象とした 7 つのバイオマーカーのうち、MCP-1、L-FABP 及び IL-18 については近位尿細管上皮細胞の障害を主に反映し、一方で NGAL、オステオポンチンそしてクラスタリンは近位尿細管と併せて遠位尿細管における障害をも検出し得ることが報告されている[37]。特に腎障害時における NGAL の産生部位は近位尿細管ではなく遠位尿細管が主であることがこれまでの検討により明らかとなっている[38]。タクロリムス誘発性腎障害は近位尿細管上皮細胞における障害のみならず、遠位尿細管における異物輸送能を低下させ得る障害が生じることが示されていることから[39]、遠位尿細管における障害も併せて反映

することのできる指標が、タクロリムス誘発性腎障害の検出には有用であることが推察される。そのため、本章により得られたタクロリムス誘発性腎障害を反映するバイオマーカーとして NGAL が最も有用であるという結果は妥当であると考えられる。

薬剤性の AKI についてはシスプラチン誘発性腎障害がその典型例として研究が進められ、発症メカニズムの一部が明らかにされている。著者の所属研究室も含めた複数の研究グループによって、シスプラチン誘発性腎障害は近位直尿細管を障害の起点とすること[40]や、近位尿細管における上皮細胞障害は Scr 値の上昇や糸球体ろ過速度 (glomerular filtration rate, GFR)の低下に先駆けて生じることなどが示されている[41]。さらに近年、著者の所属研究室においてラット腎臓から単離した近位尿細管を用いたマイクロアレイ解析を行うことにより、シスプラチン誘発性腎障害を反映するバイオマーカーとして尿中へ漏出する MCP-1 が有用であることを見出した[14]。それに加えて第 3 節にも示す通り、京都大学医学部附属病院呼吸器内科においてシスプラチンを中心としたがん化学療法を施行された肺がん患者においても、シスプラチン誘発性腎障害を的確に検出するバイオマーカーとして尿中 MCP-1 が有用である可能性が示された一方で、NGAL はシスプラチン誘発性腎障害を反映する指標としては有用性が劣ることを明らかとした[42]。カルシニューリン阻害薬による腎障害の発症機序については、近位直尿細管への障害が生じること[43]に加えて、腎臓へ流入する血管である輸入細動脈を収縮させる作用をもつこと[44]や、前述の通り遠位尿細管においても障害を生じることが明らかとなっており、シスプラチンによる障害とは発症機序が異なることが示唆されている。そのため、これら障害の発現機序の違いによって、有用となるバイオマーカーが異なることが推察された。

肝臓移植後患者においてタクロリムス投与量設計の最適化を目指すにあたり、腎障害を的確に診断するだけでなく、早期に予測することができればより迅速な対処に繋がる。Wagener ら[34]は、肝臓移植術後 3 時間目の尿中 NGAL 濃度とクレアチニン値の比 (urinary NGAL/urine creatinine ratio)によって、その後生じる AKI を予測し得ることを報告している。本研究においても、NGAL のタクロリムス誘発性腎障害に対する早期予測性について検討を行った。対象症例数は 5 例と少ないながら、術後 2 週間目に AKI を発症した患者において、術後 7 日目の尿中 NGAL 濃度が AKI-free 群と比較して有意に高値を示したことから、尿中 NGAL 濃度が既存の臨床診断よりも早期にタクロリムスによる腎障害を検出し得る可能性を見出した。

以上本章では、肝臓移植術施行後患者におけるタクロリムス誘発性腎障害を的確に反映するバイオマーカーとして尿中 NGAL が有用であることを明らかにした。肝移植後に尿中 NGAL 濃度を測定することで、非侵襲的な副作用モニタリング及びそれに基づく速やかな対処が可能となると考える。

第 II 章　生体肝移植後患者における Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)治療薬の使用に及ぼす cytochrome P450 (CYP)3A5 遺伝子多型の影響

肝臓移植術は、肝硬変や自己免疫性肝炎、胆道閉鎖症などによる末期肝不全患者に対する唯一の根治治療法として施行されている。これまでに様々な免疫抑制薬が開発され、その使用法の改善により移植片の生着率が向上しているが、その一方で、移植後の感染症は患者の主要な死亡原因として位置づけられている[45]。京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科において生体肝移植術を施行された成人患者の院内死亡原因のうち、感染症の占める割合は 62.5%にも上る[46]。術後の感染症は急性拒絶反応や移植片不全に繋がる恐れがある[31, 47]ため、早急に解決すべき重大な問題である。これまでの報告において、菌血症の原因菌の約半数はグラム陽性菌であり[48]、血液感染を起こしているグラム陽性菌のうち 81%がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)であることが明らかとなっている[49]。さらには、MRSA 感染症を発症することにより術後 1 年目の生存率が 94.1%から 74.1%にまで低下するとも報告されていることから[50]、MRSA 感染症の発症を抑制することが肝臓移植後患者の予後を大きく改善し得ると考える。また、本邦において MRSA 治療の第一選択薬として使用されるバンコマイシンは、その副作用としてしばしば重篤な腎障害が問題となる。バンコマイシンによる腎障害は頻度が高く、またそれによりタクロリムスの投与量を減量せざるを得ない症例も少なくないため、結果としてグラフトの生着を妨げる要因にもなり得る。バンコマイシン誘発性腎障害を引き起こす危険因子として、バンコマイシンの投与量が多いことや高いトラフ値が長期に渡って継続することの他に、腎毒性をもつ薬剤や昇圧剤の併用、集中治療室(intensive care unit, ICU)への入室、あるいは ICU 入室患者における病態の重症度を示す APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) II スコアが高値であることなどが挙げられる[51]。肝臓移植後の患者は、ICU への入室や腎毒性をもつ薬剤の一つであるタクロリムスの併用が不可避であることなどリスクとなり得る要因を多数合わせ持つため、バンコマイシン誘発性腎障害を生じる危険性が極めて高い。そのため、肝臓移植術施行後患者においては MRSA 治療薬の使用を避けることが望ましいが、前述の通り MRSA 感染症に罹患する割合は依然として高く、これらの薬剤を使用せざるを得ないのが現状である。そこで本章では、肝臓移植術後における MRSA 感染症発症の危険性を高める因子を抽出することで、肝臓移植後患者の周術期における薬物治療の最適化を目指した。

MRSA 感染のリスクを高める可能性のある因子として、まず免疫抑制薬であるタクロリムスの使用が挙げられる。移植後の患者においては、他人の臓器である肝臓を非自己として認識し排除（拒絶）しようとする免疫機構を抑制することで移植片を生着させなければならない。そのためにタクロリムスをはじめとする免疫抑制薬が用いられるが、その一方で免疫機構を抑制していることにより易感染の状態となることは避けられない。そこでタクロリムスの

投与量設計を最適化することが重要となるが、タクロリムスは個体内及び個体間の変動が大きいことから血中濃度モニタリング (therapeutic drug monitoring, TDM)を行いながら投与量を調節する必要がある。タクロリムスの個体内あるいは個体間変動を生み出す要因として、肝臓及び小腸における代謝酵素であるシトクロム P450 (cytochrome P450, CYP) 3A5 の遺伝子多型が大きく関わっていることが広く知られている。著者の所属研究室ではこれまでに、生体肝移植後患者においてタクロリムスの血中濃度／投与量 (C/D)比にグラフト肝及び小腸における *CYP3A5* 遺伝子多型が大きく関わっていることを報告している[52-55]。*CYP3A5*3* アレルは、mRNA のスプライシング異常を生じ、代謝能を欠損したタンパク質を作り出す。この *CYP3A5* 遺伝子多型が、肝臓あるいは腎臓移植後の患者における感染症合併に関与するという報告もなされており、重要な因子であることが示されている[56, 57]。

その他に、グラフト肝の大きさも感染症発症に影響を与える因子となり得ることがこれまでの報告から示唆されている。レシピエントの体重に占めるグラフト肝重量 (graft-to-recipient body weight ratio, GRWR)の小さいグラフトは代謝能が低いためタクロリムスの血中濃度が高くなる結果、易感染となる可能性が報告されている[58]。しかしその一方で、Shirouzu ら[59]の報告によると、GRWR が 0.8%を超える大きな右葉グラフトを移植された患者は、術後に門脈圧の上昇によって腹水が多量となり、その結果グラフト肝が十分に機能せず感染する割合が有意に高値を示すとされている。グラフトの大小と MRSA 感染との関連について未だ議論の余地はあるものの、重要な因子となり得ることは十分に考えられる。

このような背景の下、本章ではタクロリムス血中濃度及びグラフトの大きさ、*CYP3A5* 遺伝子多型が生体肝移植後の患者における MRSA 治療薬の使用頻度にどのような影響を与えるかについてレトロスペクティブに評価した。

第 1 節 タクロリムス血中トラフ濃度と MRSA 治療薬使用頻度との関連

本章において解析対象とした 191 例の患者のうち、40.3%にあたる 77 例の患者が肝移植後 40 日以内にバンコマイシンもしくはテイコプラニンによる抗 MRSA 治療を施された。治療開始日の中央値は術後 8 日目であった。レシピエントの年齢、性別、体重には Control 群と MRSA 群との間に差は認められなかった。一方、MRSA 群において Control 群に比して GRWR の値が有意に低値を示し ($p = 0.002$)、また MRSA 群において左葉グラフトを移植された症例の割合が顕著に高い ($p = 0.033$)ことが明らかとなった。さらに GRWR が 0.8%未満の小さいサイズのグラフトを移植された症例の割合も MRSA 群において有意に高いことが示された ($p = 0.001$)。また肝移植後の感染症発症に、免疫抑制薬であるタクロリムスの血中濃度が高値を維持することにより生じる過剰免疫抑制の状態が関連することが予想されたため、Control 群と MRSA 群との間でタクロリムスの平均血中トラフ濃度を比較した。その結果、当初の予想に反し、MRSA 群におけるタクロリムス血中トラフ濃度が Control 群に比して有意に低い結果となった。これは観察期間を通して常に同じ傾向を示していた。観察期間後半の両群間における平均血中濃度の大きな差は、感染が生じたことによりタクロリムスの投与量を減量した結果を反映している可能性が考えられる。術後 8 日目以降、MRSA 群では Control 群と比較して有意に投与量が低値を示している。しかしその一方で、術後 7 日目までは投与量に差はなく、タクロリムス血中濃度は MRSA 群において有意に低値を示していた。このことから、術後早期にタクロリムスの血中トラフ濃度が低い場合、MRSA 感染症発症のリスクが高まる可能性が示唆された。

今回検討した背景因子のうちグラフトの大きさまたはグラフトタイプが、MRSA 治療薬の使用頻度に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、生存曲線を描くことによってさらに評価を加えた。その結果、GRWR が 0.8%以上の大きいグラフトを移植された症例では MRSA 治療薬の使用頻度が有意に低いことが明らかとなった ($p = 0.024$)。同様に、グラフトタイプについても 2 群に分けて生存曲線を描いた結果、右葉グラフトを移植された症例において左葉グラフトを移植された症例と比較して、MRSA 治療薬の使用頻度が有意に低いことが示された ($p = 0.023$)。これらの結果より、GRWR が 0.8%未満の小さいグラフトもしくは左葉グラフトを移植された症例では、術後 40 日以内に MRSA 感染症を引き起こす危険性が高くなる可能性が示唆された。

第 2 節 *CYP3A5* 遺伝子多型が MRSA 治療薬の使用頻度に与える影響

CYP3A5 はタクロリムスの代謝過程において中心的な役割を担い、その機能の違いは MRSA 感染のリスク因子となり得ることが推察される。そこで *CYP3A5* の遺伝子多型についても Control 群及び MRSA 群の間で比較を行った。グラフト肝における遺伝子型及びレシ

ピエントの小腸における遺伝子型いずれにおいても、MRSA 治療を施行される頻度に両群間での差は認められなかった (p = 0.292, 0.162)。さらに *CYP3A5* 遺伝子多型について、ドナー及びレシピエントがそれぞれ持つアレルを組み合わせて評価した。機能型アレルである *CYP3A5*1/*1* もしくは **1/*3* の遺伝子型をグラフト肝及びレシピエントの小腸いずれにおいても持つ組み合わせの場合、その症例を*1 グループとして分類した。また、*CYP3A5*3/*3* の遺伝子型（欠損型）をドナーとレシピエントのどちらか一方もしくは両方に持つ場合を*3 グループとした。このような分類のもと、Control 群及び MRSA 群における症例数の分布を評価した場合においても、2 群間で差は認められなかった (p = 0.198)。これらの結果から、*CYP3A5* 遺伝子多型については肝臓移植術施行後の MRSA 治療薬使用頻度に影響を及ぼさない、もしくはその寄与は小さい可能性が示された。

第3節　生体肝移植術施行後患者における MRSA 治療薬の使用に影響を及ぼす危険因子の探索

これまでの検討において、MRSA 治療薬の使用頻度に影響を与える可能性を持つ因子個々について関連性を評価してきた。続いて、これらの要因すべてについてロジスティック回帰分析を行うことで、それぞれの因子の MRSA 治療薬使用頻度に及ぼす影響の大きさを評価した。グラフト肝の生着あるいは肝機能の回復に伴い、術後経過に応じてリスク因子が異なる可能性を考慮して、術後 7 日目までに MRSA 治療薬を使用した患者 34 例及び術後 8 日目以降に MRSA 治療薬を使用した患者 43 例に分けて検討を行った。なお、タクロリムス血中トラフ濃度は、術後 7 日目までの平均値を用いた。また、*CYP3A5**1 としているのは、肝臓及び小腸いずれにおいても *CYP3A5* 遺伝子多型が機能型である組み合わせを選択している。GRWR、グラフトタイプ及びタクロリムス血中トラフ濃度について、術後 7 日目までの MRSA 治療薬使用頻度への影響は確認されなかった。一方、肝臓及び小腸いずれも機能型の *CYP3A5* を持つ*1 グループの患者において、*3 グループと比較して MRSA 治療薬の使用頻度が 4.5 倍に上昇することが明らかとなった (p = 0.023)。*1 グループにおいてはタクロリムス血中濃度が低値を示す傾向にあることがこれまでの報告から示されている。今回対象とした患者群においても、術後7日目までの平均血中濃度を 2 群間で比較すると MRSA 群において有意に低値を示した。その一方で、本節における多変量解析の結果、タクロリムス血中トラフ濃度は p = 0.153 と術後 7 日目までの MRSA 治療薬使用のリスク因子としては抽出されなかった。さらに、*CYP3A5* 遺伝子多型によって分類し、*1 グループと*3 グループとの間で血中トラフ濃度を比較しても両群間で差は認められないことから、*CYP3A5* 遺伝子多型が血中トラフ濃度とは独立してリスク因子となり得る可能性が示唆された。続いて、術後 8 日目以降の MRSA 治療薬の使用頻度には、GRWR 及び術後 7 日目までのタクロリムス血中トラフ濃度が影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、GRWR が

0.8%未満の小さいグラフト肝を移植された患者もしくは術後早期のタクロリムス血中濃度が低値を示す患者において、術後 8 日目以降の MRSA 感染リスクが有意に高まる可能性が示唆される結果となった。

グラフトタイプについても 2 群間で比較した際には有意な差が認められ、MRSA 治療薬の使用頻度に影響を与えることが示唆された一方で、多変量解析の結果では両群間に差は認められず、単変量解析の結果と異なる傾向が示された。この相違が生じた理由として、グラフトサイズが交絡となっている可能性が考えられる。右葉グラフトを移植された 138 名の患者のうち 90.6%にあたる 125 名の患者において、GRWR が 0.8%以上となる大きなグラフトを移植されていた。つまり、真に MRSA 治療薬の使用頻度へ影響を与えている因子はグラフトの大きさであり、グラフトタイプは術後 MRSA 感染の危険因子とならない可能性が示された。

考察

術後の MRSA 感染に対する危険因子として術前からの MRSA の保菌や抗菌薬の使用、侵襲的な処置の有無、疾患の重症度などが報告されており、周術期の菌への暴露しやすさが大きく寄与していることがこれまでに明らかとなっている[60-62]。しかしながら、肝臓移植術施行後の患者において、特に緊急性の高い手術の場合、MRSA の保菌の有無を含め周術期の全身状態をコントロールすることは困難である。それに加え、肝臓移植という長時間に渡り極めて侵襲性の高い手術を受けているのみならず、術後免疫抑制薬の使用が不可避であることから、MRSA 感染のリスクが高いことは言うまでもない。しかし一方で、腎機能低下を引き起こす危険因子も複数併せ持つことから、MRSA 治療薬であるバンコマイシンやテイコプラニンの使用は可能な限り避けるべきである。そこで本章では、どのような背景因子を持つ患者が MRSA 治療薬を処方される頻度が高いのかを明らかにして発症リスクを可能な限り低減することで、周術期の薬物治療の最適化に繋がると考え検討を行った。

まず患者の持つ基本的な背景因子を比較した結果、グラフトの大きさ及びグラフトタイプが術後 MRSA 治療薬使用頻度を高めるリスク因子となる可能性が示唆された。Hellinger らの報告[63]によると、レシピエントの体重に対するグラフト肝重量の占める割合が 0.01 を下回る場合、術後感染症のリスクが有意に高くなるだけでなく、術後 1 年以内のグラフト不全もしくは死亡のリスクも有意に上昇することが示されている。また、Kiuchi らの報告[58, 64]では小さいサイズのグラフトを移植すると、肝臓における代謝能あるいは合成能が不十分となることが明らかとなっている。すなわち、同量のタクロリムスを投与した場合でも、サイズの小さいグラフトを移植された患者においてはその他の患者に比して、タクロリムス血中濃度が高値を示す可能性があることが示されている。その一方で、サイズの大きなグラフト肝を移植された患者においては、腹水が多量になる結果、術後感染症のリスクが高まるという結果も報告されている[59]。 Hill らの報告[65]においても、有意な差ではないものの GRWR が 0.8%を上回る症例の方が感染症を合併する割合が高いことが示されるなど、グラフトの大きさと術後感染症のリスクとの関連については未だ議論の余地がある。本章においても、グラフトの大きさが肝臓移植術後の MRSA 感染のリスクとなり得るか否かについて検討を行った結果、MRSA 治療薬を投与された患者において GRWR が有意に小さいことが明らかとなった。すなわち、GRWR が 0.8%未満の小さいグラフト肝は、肝臓移植術後の MRSA 感染症発症の危険因子となり得る可能性が示された。さらに同時に、左葉グラフトを選択することも、術後に抗 MRSA 治療を施される危険性を高めることを示唆する結果を得た。しかしこの結果については、右葉グラフトを移植された患者のうち 90%を超える症例において、グラフト肝の大きさが GRWR 0.8%以上と大きいサイズであったことが明らかとなり、交絡となっている可能性が示唆された。これらの結果より、グラフトタイプではなくグラフトサイズが術後 MRSA 感染症のリスクになり得る可能性が示された。Kiuchi らの報告[58]にもある通り、サイ

ズの小さいグラフトは薬物の代謝能が低く、タクロリムスの血中濃度が高値を示す傾向にあることが予想される。しかし今回対象とした患者群において、グラフトサイズの大きい群と小さい群との間でタクロリムス血中濃度を比較しても有意な差は認められなかったため、グラフトが小さいことが MRSA 感染症発症の危険因子となり得る詳細な理由については不明である。また、サイズの小さいグラフトを移植された症例では門脈圧が高くなる傾向があり、その圧の高さを解消するために脾臓を摘出する症例が少なくない。リンパ球や抗体を産生する臓器である脾臓を摘出すると易感染性となることが知られていることから、結果としてグラフトサイズの小さい症例では術後感染症を発症する危険性が高まることが推察される。しかしその一方で、脾臓摘出後の患者における敗血症の起因菌として最も多いのは肺炎球菌であると言われており、ブドウ球菌なども検出はされるものの脾摘との関連性は明らかとなっていない[66]ためさらなる詳細な検討が必要であると考える。

続いて、術後感染症の発症に大きく関与することが推察されるタクロリムス血中濃度が MRSA 治療薬使用頻度に及ぼす影響について検討した。血中濃度が高いほど、過剰免疫抑制の状態となり感染症のリスクが高まると考えられる。Control 群と MRSA 群との間でタクロリムスの血中トラフ濃度を比較した結果 MRSA 群において有意に低値を示しており、予想に反する結果となった。この相違について明確な理由は不明であるが、以下の可能性が考えられる。一つは、タクロリムスの活性代謝物 (31-*O*-desmethyltacrolimus, M-II)の蓄積により過剰免疫抑制の状態を引き起こしている可能性である。著者の所属研究室においても、*CYP3A5*1* アレルを持つ患者群において胆汁中の M-II 濃度がその他の患者群と比較して有意に高いことを明らかにしており[67]、また Muraki ら[56]もこの結果を引用して、*CYP3A5*1* アレルを持つ患者において感染症のリスクが高い理由として M-II 濃度の差が考えられると考察している。二つ目としては、白血球内のタクロリムス濃度の差に起因する可能性である。著者の所属研究室では末梢血白血球に発現する multidrug resistance 1 (MDR1)の mRNA 量が高値を示す患者群においては、タクロリムスの血中濃度が高値を示しているにも関わらず急性拒絶反応を発症する頻度が高くなることを報告している[68]。つまり末梢血白血球における MDR1 の発現量は、タクロリムスの免疫抑制効果に対する感受性因子となることを示唆している。そのため、タクロリムス血中濃度が低値を示している群でも、白血球中濃度が高値を示していれば感染症発症の頻度が反対に高まる可能性が考えられる。本検討において対象とした患者群は、小腸及び肝臓における MDR1 の mRNA 発現量に差は認められなかったが、末梢血白血球における mRNA 発現量については検討できておらず詳細は不明である。最後に、タクロリムスのトラフ濃度が低値を示す一方でピーク値が高値を示していることにより、過剰免疫抑制の状態に陥っている可能性である。直接測定した結果は示されていないが、腎移植患者を対象とした報告において、感染症の危険性を高める要因の一つとしてタクロリムスのピーク値が高くなっている可能性が考察されている[57]。しかしこの点に関しては、タクロリムスの血中濃度曲線下面積（AUC）が遺伝子多型に関わらず同じであるという前提がなければ成り立たないが、一般的に初回通過効果

の大きい薬物は代謝酵素の活性が高い症例ほど小腸及び肝臓で速やかに代謝された結果、その AUC は小さくなる傾向にあると考えられるため、ピーク値が高値を示している可能性は低いと言える。このような点に着目して今後さらなる詳細な検討が必要であると考える。その際、トラフ値だけでなくピーク値あるいは活性代謝物濃度を測定すると採血ポイントを増やすことになるため、患者の不利益とならないよう考慮する必要がある。また本検討では、術前からの保菌の状態や疾患の重症度など、これまでに MRSA 感染の危険因子として報告されている要因について考慮していないため、これらの要因が間接的にタクロリムスの血中濃度低下を引き起こしている可能性も否定しきれず、今後さらなる検討が必要である。

さらに、タクロリムス体内動態の個体内・個体間変動に影響を及ぼす因子の一つとして広く知られている、肝臓及び小腸での代謝を司る *CYP3A5* の遺伝子多型についても検討を行った。機能型アレルである *CYP3A5*1/*1* もしくは**1/*3* の遺伝子型を肝臓及び小腸いずれにおいても持つ*1 グループの患者では、少なくともどちらか一方の遺伝子型が *CYP3A5*3/*3* である*3 グループの患者と比較してタクロリムス血中トラフ濃度が低くなることが報告されている[69, 70]。これに加えて、通常量のタクロリムス投与群に比べて低用量のタクロリムスを投与された患者群において感染症の頻度が有意に低かったとの報告[71]もあることから、*3 グループでは血中濃度が高値となり過剰免疫抑制の状態が引き起こされた結果、術後の MRSA 感染症発症のリスクが高まることが予想される。そこで、肝臓及び小腸における *CYP3A5* 遺伝子多型が肝移植後の抗 MRSA 薬使用頻度に与える影響について検討した結果、当初の予想に反して、肝臓及び小腸共に機能型の *CYP3A5* を持つ*1 グループにおいて、術後 7 日目までの MRSA 治療薬の使用頻度が高くなることが明らかとなった。一方で本章において得られた結果と同様に、*CYP3A5* の機能型アレルを持つ群において欠損型アレルを持つ群と比較して、感染症を合併するリスクが有意に高くなる結果を示した報告もなされている[56]。今回得られた結果はタクロリムスの代謝能に着目して考えると予想に反する結果となるが、タクロリムス血中濃度とは独立して *CYP3A5* 遺伝子多型が MRSA 治療薬の使用頻度に影響を与える可能性も十分に考えられる。これらの結果も含めて考えると、*CYP3A5* の遺伝子多型はタクロリムスの体内動態を予測する因子としてだけでなく、MRSA 感染症発症の危険因子となり得る可能性を見出した。

著者の所属研究室では近年、*CYP3A5* が機能型の遺伝子型を持つ*1 グループの患者群では欠損型を持つ*3 グループの患者群と比較して、急性拒絶反応発症のリスクが高まる可能性を報告している[72]。これと本章において得られた結果を合わせて考えると、*1 グループにおいては急性拒絶反応及び術後 MRSA 感染症いずれの危険性も高い可能性が示唆され、タクロリムス経口投与による術後管理には注意を要することが推察される。そのため、このような患者群においては、血中や肝局所におけるピーク値とトラフ値の差を小さく、あるいは代謝物 M-II の蓄積を抑えることを目的として、タクロリムスの徐放性製剤を選択することや静脈内投与に切り替えること、あるいはタクロリムスではなく mammalian target of rapamycin (mTOR)阻害薬などその他の免疫抑制薬を使用するなどの対策を講じる必要が

あると考える。京都大学医学部附属病院では 2013 年 12 月より肝臓移植術施行直後はタクロリムスの静脈内投与によって治療開始するプロトコルを導入している。今後は新プロトコルを導入された患者群においても同様の検討を追加する必要があると考えている。

以上本章では、タクロリムス血中トラフ濃度が低値を示す症例、サイズの小さいグラフトを移植された症例あるいは *CYP3A5*1/*1* もしくは **1/*3* 遺伝子多型をドナー及びレシピエントどちらもが持つ症例においては、肝臓移植術後の MRSA 感染症を発症する危険性が高くなる可能性を明らかにした。今後、手術時間や術前の保菌状態など、今回の検討で考慮していない因子に関しても合わせて評価する必要はあると考えるが、本検討結果は臓器移植後患者における周術期の最適な薬物治療へ繋がる、有益な知見を提供するものと考える。

第Ⅲ章　生体肝移植後患者における拒絶反応発症に寄与する危険因子の探索

生体肝移植術は末期肝不全に対する根治治療として広く用いられている。これまでに様々な免疫抑制薬の開発、使用法の改善により移植肝の生着率は向上している一方で、拒絶反応は未だ小児、成人いずれにおいても患者の予後を大きく左右する重大な合併症の一つとして位置づけられている[73, 74]。拒絶反応はその発症機序により大きく 2 つに分けることができ、それぞれ急性拒絶反応、慢性拒絶反応と呼ばれる。慢性拒絶反応は抗原抗体反応を中心とする体液性免疫を主とする反応で、これに対する有効な薬物治療法は未だ確立されておらず、根治治療法としては再移植しか残されていないのが現状である。T 細胞などリンパ球を中心とした細胞性免疫を主とする急性拒絶反応は、強い免疫抑制療法により改善するとされており、タクロリムスをはじめとした様々な免疫抑制薬が使用される。タクロリムスは体内動態の個体内・個体間差が大きい薬物として知られており、使用には血中濃度モニタリング (therapeutic drug monitoring, TDM)が必須とされる。体内動態の差を生み出す因子として、小腸及び肝臓における代謝を司るシトクロム P450 (cytochrome P450, CYP) 3A5 の遺伝子多型や小腸からの吸収障壁となる multidrug resistance 1(MDR1)の発現量などが報告されている[75]。これらの要因について考慮しつつ投与量設計を行い、タクロリムスを治療域内にコントロールして使用しているにも関わらず急性拒絶反応が生じる症例が少なくないのも事実であり、免疫抑制薬の薬効発現に影響を及ぼす未解明の因子の存在が推察される。

急性拒絶反応は、その後慢性拒絶反応を引き起こす危険性を孕むため、迅速かつ的確に対処する必要がある。肝機能障害の原因には拒絶反応だけでなく感染症や移植術そのものによる侵襲など様々あり、例えば過剰な免疫反応の結果生じる拒絶反応なのか、反対に過剰免疫抑制による感染症なのかによって対応が大きく異なる。現在までに様々な肝機能マーカーが見出され日常診療で広く用いられているものの、いずれも肝細胞の破壊や胆汁うっ滞など障害が起きた結果生じる現象を反映するにすぎず、肝機能障害をもたらしている原因を見分けることは困難なのが現状である。確定診断には、肝生検によって病理組織学的な評価を行う必要があるが、拒絶反応と感染症では同じような炎症所見が得られることもあるため、専門性が高く経験豊富な病理医でなければ見分けることが難しい症例も少なくない。

このような背景の下本章では、拒絶反応発症に関与する分子機構の解明を行うことで拒絶反応発症の正確な予測・診断指標の確立及び新規治療法の開発に繋げること、またその結果移植術後患者の予後が改善されることを目指し、以下の検討を行った。

第1節　患者の背景因子及びタクロリムス体内動態変動因子が急性拒絶反応発症に及ぼす影響

原疾患を胆道閉鎖症とする肝臓移植術を施行された小児症例のうち、文書による同意が得られた214名を対象とした。このうちグラフト肝重量の体重に占める割合が3-5%となる68症例を選択し、そこから肝生検による病理組織学的な診断に基づき術後2週間以内に急性拒絶反応が生じていると診断された22例を急性拒絶反応 (acute cellular rejection, ACR)群として、及び術後経過良好であった11例をControl群として抽出した。さらにそのうち、それぞれから背景因子の類似した症例を組み合わせて選択し、6組12症例を解析対象とした。選択段階から背景因子を揃えていたため、Control 群と ACR 群との間でレシピエントの年齢以外に有意な差は認められなかった。レシピエントの年齢は ACR 群において有意に高値を示した ($p = 0.027$)が、今回対象としているのは小児症例であり、レシピエントの年齢が急性拒絶反応発症に関与するとは考えにくい。また、タクロリムスの体内動態変動因子として知られるCYP3A5の遺伝子多型及び小腸におけるMDR1のmRNA発現量にも両群間で有意な差は認められていない。さらにタクロリムスの代謝・排泄能について、血中濃度／投与量 (C/D)比を比較することで評価した結果、観察した術後2週間においては両群間で有意な差は認められなかった。なお、タクロリムス平均血中濃度にも両群間で差は認められていない。これらのことから、背景因子の類似した患者群を選択できていることが改めて確認できた。このような患者群においても、急性拒絶反応が生じた群と経過良好群とに分かれていることから、これまでに知られているタクロリムスの体内動態あるいは薬効発現に影響を与える因子以外の要因が関与している可能性が示唆される。

第2節　健常ドナー由来グラフト肝における網羅的遺伝子発現解析

拒絶反応の有無以外の背景因子が類似している2群間において、それぞれのグラフト肝における遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析することで、急性拒絶反応発症に関連するグラフト肝の特徴を探索した。類似した背景を持っているにも関わらず拒絶反応の有無に違いが認められたことの理由として、移植された肝臓の状態の違いが影響しているのではないかと考えた。また、急性拒絶反応によるグラフト機能不全に陥る危険性のある肝臓をあらかじめ予測することにより、周術期の免疫抑制療法の個別化に繋げることができると考え、移植直前のグラフト肝を対象としている。

採取した肝臓から total RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行ったところ、181 プローブ (145遺伝子)についてACR群においてControl群と比較して有意に発現量が異なる結果が得られた ($p < 0.001$)。ACR群において発現が高値を示していたのはこのうち13プローブで、残りの168プローブはControl群に比して発現が低値を示した。これら発現量の違い

が観察された遺伝子が、急性拒絶反応発症に関与する可能性が示唆される。続いて、マイクロアレイ解析の結果の再現性を確認するため、145 遺伝子のうち既報より配列情報を得ることのできた 68 遺伝子を対象として、リアルタイム PCR による mRNA 発現量の定量を行った。肝生検により得られた組織の残量不足により ACR 群の 1 症例について測定を行うことができなかったため、その症例に対応する Control 群の 1 症例も除外し、この検討は 10 症例について行っている。リアルタイム PCR の結果、68 遺伝子のうち 33 遺伝子についてControl 群と ACR 群との間で有意な差が観察された ($p < 0.05$)。これはマイクロアレイ解析の結果と同様の傾向を示しており、結果の再現性が確認できたと考える。さらに、いずれの遺伝子についても ACR 群において Control 群に比べて有意に低値を示していることが明らかとなり、この遺伝子群の発現量低下が急性拒絶反応発症に関与する可能性が示唆された。

第 3 節　急性拒絶反応発症に関連する遺伝子群の探索及び予測性評価

第 2 節までに抽出された遺伝子群について、Gene ontology 解析を行うことでどのような機能を持つ遺伝子群の発現に違いが認められたのか検討を加えた。その結果、細胞のストレス応答に関連する遺伝子群の発現量の差が最も顕著であった。その他アミノ酸代謝に関連する遺伝子群などを含む計 7 つの遺伝子群について p 値が 0.05 を下回り、これら遺伝子群が特に急性拒絶反応発症に関連する可能性が示唆された。

最後に、抽出した遺伝子群を用いて、急性拒絶反応の発症を予測し得るか検討した。ACR 群において有意な発現量の差が認められた 33 遺伝子について、molecular score を算出した。それぞれの遺伝子について Control 群の平均値との比を算出し、その平均値を molecular score とした。33 遺伝子全てについてだけでなく、これまでの検討で顕著な差の認められたストレス応答に関連する 5 つの遺伝子、並びにストレス応答関連遺伝子群に続いて急性拒絶反応との関連が示唆された 2 つのカテゴリーもそれぞれ含めて molecular score を算出し、各々について急性拒絶反応発症の予測性を評価した。その結果、33 遺伝子全てについて算出した molecular score は ACR 群において Control 群と比較して有意に低値を示し ($p = 0.0079$)、術前より急性拒絶反応発症を予測し得る可能性が示された。また Gene ontology 解析において急性拒絶反応との関連が最も顕著であったストレス応答機構に関するカテゴリーに含まれる 5 つの遺伝子について、molecular score を比較した結果両群間で有意な差は認められなかった。しかし、Gene ontology 解析において 2 番目に p 値の小さかったカテゴリー及び 3 番目のカテゴリーに含まれる遺伝子をそれぞれ加えて算出した結果、いずれの場合も有意な差が認められた。以上の結果より、今回抽出された 33 遺伝子、特に gene ontology 解析により有意な差の認められたカテゴリーに含まれる遺伝子の発現量を指標とすることで、術前より急性拒絶反応発症を予測し得る可能性が示された。

第 4 節　慢性拒絶反応に対してシロリムス及びシクロスポリンの併用が奏功した症例

第 3 節までの検討を進める中で、生体肝移植術を施行された後に複数回の急性拒絶反応を繰り返した結果、重度の慢性拒絶反応を引き起こした症例を経験した。患者は当時 3 歳の男児で、低分化型の肝芽腫と診断され肝臓移植の適応となった。がん化学療法により腫瘍を縮小させた後、母親をドナーとする生体肝移植術が施行された。術後はタクロリムスの経口投与により免疫抑制療法が開始され、TDM を行いながら投与量を調節した。しかし、術後 43 日目で急性拒絶反応が生じていると診断され、ステロイドパルスによる治療が 3 度施された。タクロリムスの投与も静脈内投与に変更された。これにより、高値を示していたアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)は低減したが、一方で総ビリルビン (T-bil)値は増加した。ここで肝生検を行い病理組織学的な評価をした結果、急性拒絶反応は消失したが、術後 52 日目において慢性拒絶反応を生じていると改めて診断された。慢性拒絶反応に対する治療は再移植しかなく、確立された薬物治療法は存在しない。そこで著者らは、適応外ではあるものの mTOR 阻害薬であるシロリムスの使用を医師に提案した。

術後 75 日目より、タクロリムスの静脈内投与に加えてシロリムスの経口投与を開始した。すると T-bil の値はすぐに 5.4 mg/dL にまで低下し、AST 及び ALT の値も上昇してくることはなかった。このことより、慢性拒絶反応に対してシロリムスが有効であることが示唆された。しかし、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (γ-GTP)は徐々に上昇傾向を示しており、術後 96 日目に行われた肝生検では、late phase の慢性拒絶反応であると診断された。このとき、シロリムスとタクロリムスの細胞内レセプターはいずれも FK506-binding protein 12 (FKBP1A)であり、競合阻害が生じている可能性が考えられたため、術後 100 日目にタクロリムスからシクロスポリンへ変更することを追加で提案した。タクロリムスとの併用投与開始 24 時間後にはシロリムスの平均血中濃度は 8.0 ng/mL (範囲：6.0-10.1 ng/mL)であったが、シクロスポリンとの併用を開始すると 16.2 ng/mL (範囲：9.6-27.0 ng/mL)にまで有意に上昇した。投与後 24 時間のシロリムス血中濃度／投与量比 (C_{24}/dose ratio)も同様にシクロスポリンとの併用により有意に上昇した ($p < 0.01$)。またシロリムスの C_{24}/dose ratio はシクロスポリンの血中濃度と有意に相関することが明らかとなった。

以上の結果を受け、シロリムス及びシクロスポリンの目標血中濃度をそれぞれ 15 ng/mL、180 ng/mL と設定して治療を行ったところ、術後 177 日目の肝生検の結果に異常は認められず、また AST、ALT 及び T-bil の値はいずれも減少させることができた。その後肝機能の低下及び原疾患である肝芽腫の再発も認められることなく、術後 247 日目に退院することができた。

考察

本章では、移植直前のグラフト肝における網羅的遺伝子発現解析を行い、生体肝移植後患者における急性拒絶反応発症に関連する因子の探索を行った。これまで、急性拒絶反応には、免疫抑制薬として使用されるタクロリムスの体内動態が大きく関与していることが考えられてきた。*CYP3A5* 遺伝子多型や MDR1 の発現量によって、タクロリムスの血中濃度が大きく変動することが知られている。しかし、このような因子を考慮しながら投与量設計を行い、タクロリムスの血中濃度を目標治療域にコントロールしているにも関わらず、急性拒絶反応が生じる症例が少なくない。そのためタクロリムスの体内動態あるいは薬効発現に影響を及ぼす他の因子の存在が推察される。そこで、健常成人由来のグラフト肝における遺伝子発現量の違い、すなわちグラフト肝の個性のようなものがその後の急性拒絶反応の発症しやすさに関連しているのではないかと考え検討を行った。移植される肝臓の特徴によって術前よりその後の急性拒絶反応の生じやすさを予測することができれば、免疫抑制薬の投与開始量の調節など迅速に対応することが可能となる。本検討では、年齢や性別などの基本情報に加え、タクロリムスの体内動態に影響を与える因子や移植するグラフト肝の大きさ、術前の臨床検査値などの背景因子をできる限り類似した組み合わせで選択した症例を対象として遺伝子発現プロファイルを比較することで、急性拒絶反応発症に関連する因子の探索を試みた。検討の結果、ACR 群において Control 群に比して 33 遺伝子の mRNA 発現量が有意に低値を示すことが明らかとなり、中でも細胞のストレス応答に関連する遺伝子群の発現量の差が最も顕著であることが示された。これまでの報告から、ストレスへの応答機構を調節することにより臓器移植後の成績を向上させ得る可能性が示唆されている。Uchida らの報告[76]によると、酸化ストレスに対する抵抗性を示す hemoxygenase-1 (HO-1) のタンパク質発現を誘導することにより、intercellular adhesion molecule-1 (ICMA-1)などの接着因子の発現量を減少させ、移植肝の生着率を高め得ることがラットを用いた検討において示されている。また、高齢ドナーからの臓器提供を受けた症例において術後急性拒絶反応の頻度が高くなることが示されており、その理由の一つとして臓器のストレス応答機構の低下があげられている[77]。このように、細胞へのストレスに対する防御機構が臓器移植後の移植片生着に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。

さらに、今回抽出されてきた遺伝子の発現量を術前に調べることにより、術後の急性拒絶反応発症を予測し得るかについて検討を加えた。発現量に有意な差が認められた 33 遺伝子について、molecular score を算出し比較した。33 遺伝子全てについて算出した molecular score を Control 群と ACR 群とで比較したところ ACR 群において有意に低値を示し、肝臓移植後 2 週間以内に生じる急性拒絶反応の予測指標となる可能性が示唆された。また、最も顕著な発現変化の認められたストレス応答に関連するカテゴリーに含まれる 5 つ遺伝子について同様に検討した結果両群間で有意な差は認められなかったが、この 5 遺伝子だけでなくその他の遺伝子群も合わせた 9 遺伝子について評価した結果、33 遺伝子全てを

用いて評価した場合と同等の予測性を見出すことができ、この 9 遺伝子の発現量を指標とすることで術前より急性拒絶反応発症を予測し得る可能性が示唆された。近年著者の所属研究室において、慢性腎臓病患者の腎生検組織を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、慢性腎臓病の病態進展を反映する遺伝子群を見出している[78]。このとき、対象とした遺伝子群に対する molecular score を新たなマーカーとすると、個々の遺伝子単独の場合と比較してより感度良く尿細管上皮細胞障害あるいは間質の線維化を反映し得ることが明らかになっている。また Naesens らの報告[79]では、腎移植後患者の腎生検組織中における一部の炎症関連遺伝子の発現量をもとに算出した molecular score を用いて、その後に生じる慢性的な障害の進展を予測し得ることが示されるなど、組織中の遺伝子発現情報をバイオマーカーとして利用すること及び複数の遺伝子発現情報を組み合わせて評価することの有用性が示されており、今回算出した molecular score も急性拒絶反応を術前より予測する有用な指標となり得ると考える。

最後に、慢性拒絶反応に対する薬物治療の新しい可能性として、mTOR 阻害薬の使用を見出した。現在本邦で免疫抑制薬としての使用が承認されている mTOR 阻害薬はエベロリムス(サーティカン®)のみであり、適応は心移植あるいは腎移植に限られている。海外ではシロリムス (Rapamune®)も免疫抑制薬として承認されており、腎移植後患者に多く用いられている。一方、肝臓移植後患者における mTOR 阻害薬の使用についてはあまり広がっていないのが現状である。その理由の一つとして、Rapamune®の添付文書に、シロリムスとタクロリムスあるいはシクロスポリンを併用すると、肝動脈血栓症 (hepatic arterial thrombosis; HAT)のリスクが高まる結果、肝臓移植後患者のグラフト生着率あるいは患者の生存率が低下したと記載されたことが挙げられる。しかし、肝細胞がんのため肝移植を受けた患者の再発肺転移に対してシクロスポリンに替えてシロリムスを投与したところ、腫瘍の縮小に成功しただけでなく、拒絶反応も抑制することができた症例[80]や、低用量のタクロリムスにエベロリムスを併用した群では、タクロリムス単独に比して有意に拒絶反応抑制効果を得ることができたとの報告[81]がなされるなど、肝臓移植症例における mTOR 阻害薬の有効性も明らかとなっている。著者の経験した症例においても、肝芽腫を原疾患とする肝臓移植後に慢性拒絶反応が生じた患者に対して、抗腫瘍効果及び免疫抑制効果の両方を期待して mTOR 阻害薬の使用を開始した。慢性拒絶反応は、T 細胞介在性の細胞性免疫を中心とする急性拒絶反応とは異なり、抗体媒介性の液性免疫が中止となる反応であり、B 細胞が重要な役割を担う。mTOR 阻害薬はこの B 細胞の分化・増殖を抑制することが報告されているため[82-84]、カルシニューリン阻害薬に加えて相加的に慢性拒絶反応を抑制する効果が期待される。本症例においても、シロリムスをシクロスポリンと併用する治療を行った結果肝機能マーカーの値が改善し、慢性拒絶反応の抑制効果が観察された。小児の腎移植後患者に対しては、シロリムスの目標血中トラフ濃度は 10-15 ng/mL が推奨されており[85]、シロリムスの血中濃度が 15 ng/mL を超えると白血球減少症の頻度が高くなることも報告されている[86]。一方で著者の所属研究室では、膵島移植後患者に対する術直後のシロリムス

目標血中濃度として 15 ng/mL が適していることを報告している[87, 88]。そこで本症例における投与開始直後の目標血中濃度は 15 ng/mL と設定して治療を行った。治療開始当初はタクロリムスとの併用を行っていたが、作用点における相互作用回避のためシクロスポリンへ変更したところ、シロリムスの血中濃度が有意に上昇した。シロリムスは主に小腸及び肝臓に発現する CYP3A4 によって代謝されることが知られている[89]。タクロリムス及びシクロスポリンも CYP3A4 の基質となるが、それぞれの IC_{50} 値は 53 μM 及び 90 μM と報告されている[90]。一方で、タクロリムス及びシクロスポリンの目標血中濃度はそれぞれ 10 μg/mL、180 μg/mL と設定していることから、臨床患者における CYP3A4 の阻害作用はタクロリムスに比してシクロスポリンの方が強いことが示唆される。そのため、シクロスポリンを併用することによりシロリムスの代謝がより強く阻害された結果、血中濃度が有意に上昇したものと推察される。さらにはシロリムスの血中濃度／投与量比がシクロスポリンの血中濃度と良く相関していることも示され、これらの結果は肝臓移植後患者におけるシロリムスとシクロスポリンとの薬物動態学的相互作用を初めて明らかにしたものである。

以上本章では、生体肝移植術直前の移植片における遺伝子発現を精査し、急性拒絶反応発症に関連する分子機構の一部を明らかにした。これは、新たな免疫抑制薬開発に繋がる分子基盤となり得る。また、慢性拒絶反応に対する mTOR 阻害薬使用の新たな可能性を見出すことにも成功し、肝臓移植術後患者における拒絶反応を包括的に抑制することで、さらなる患者の予後改善に繋がるものと考える。

結　　論

以上、Ⅲ章にわたり、肝臓移植術施行後における術後合併症の適切な予測及び診断のための分子生物学的指標の探索、及び周術期免疫抑制療法の個別化実現を目的として、肝臓移植術後患者由来の肝生検組織及び尿、血液などの生体試料を用いた系統的な検討を行い、以下の結論を得た。

第Ⅰ章　肝臓移植後患者におけるタクロリムス誘発性腎障害検出のための尿中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)の有用性

肝臓移植後の免疫抑制薬として広く用いられているタクロリムスは、その腎毒性が治療の継続を左右する重大な問題となる。タクロリムス誘発性腎障害は、従来の急性腎障害の診断基準では捉えることが難しく、新たな指標の構築が必要とされている。第Ⅰ章では、肝臓移植後患者より経時的に随時尿を採取し、急性腎障害のバイオマーカーとされている 7 種のペプチド分子について尿中への漏出量を測定した。タクロリムス誘発性腎障害と診断された群と診断されなかった群とで比較を行った結果、尿中の neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)を含む 3 分子が腎障害発症患者において有意に高値を示した。また、receiver operating characteristics (ROC)解析により各分子のバイオマーカーとしての有用性を評価した結果、タクロリムス誘発性腎障害を検出する指標として、尿中 NGAL が最も有用であることが明らかとなった。さらには尿中 NGAL 濃度のタクロリムス誘発性腎障害発症に対する予測指標としての有用性も示唆された。このように、肝臓移植後患者において尿中 NGAL 濃度を測定することで、タクロリムスの非侵襲的な副作用モニタリング及びそれに基づく速やかな対処が可能となることを明らかにすることができた。

第Ⅱ章　生体肝移植後患者における Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)治療薬の使用に及ぼす cytochrome P450 (CYP)3A5 遺伝子多型の影響

臓器移植後患者の予後を左右する重大な合併症の一つに感染症がある。中でもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)へ感染すると、抗 MRSA 治療薬としてバンコマイシンなどが使用されるが、バンコマイシンはその副作用としてしばしば重篤な腎障害が問題となる。肝臓移植後患者では、第Ⅰ章にも示すように腎機能を低下させる危険因子を複数併せ持つことから、バンコマイシン誘発性腎障害を生じる

危険性が極めて高い。そのため、第Ⅱ章ではバンコマイシンの使用を可能な限り避けるために、肝臓移植術後における MRSA 感染症発症の危険性を高める因子を探索した。感染症発症に最も寄与する因子として予想したタクロリムスの血中トラフ濃度は、MRSA 群において有意に低値を示した。そのため他に抗 MRSA 治療薬の使用頻度に影響を及ぼす因子を探索した結果、サイズの小さいグラフト肝及び小腸及び肝臓における *CYP3A5* 遺伝子が機能型である*1 アレルを持つことが抽出された。著者の所属研究室では CYP3A5*1 遺伝子多型を持つ患者では、急性拒絶反応のリスクが高まることも報告しており、今回得られた結果と合わせると、タクロリムス経口投与による術後管理において *CYP3A5*1* 遺伝子多型を持つ患者では、拒絶反応及び感染症いずれの合併症についても危険性が高く注意を要することを明らかとした。

第Ⅲ章　生体肝移植後患者における拒絶反応発症に寄与する危険因子の探索

肝臓移植後の急性拒絶反応はグラフト肝の生着のみならず患者の予後を左右する重大な問題である。拒絶反応発症に大きく関与することが知られているタクロリムスの体内動態を変動させる因子について考慮しながら投与量設計を行い、血中濃度を管理しているにもかかわらず急性拒絶反応が生じる症例が少なくない。第Ⅲ章では、グラフト肝そのものの持つ特徴が急性拒絶反応発症に関連すると想定して検討を行った。背景因子の類似した症例を選択し、経過良好群と急性拒絶発症群とに分類した。各群より採取した術直前のグラフト肝の一部より total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、33 遺伝子が急性拒絶発症群において有意に低値を示した。また Gene ontology 解析を行った結果、細胞のストレス応答に関与する遺伝子群をはじめとする 7 つの遺伝子群の発現量について、両群間で顕著な差が観察された。これら遺伝子群について molecular score を算出すると、急性拒絶反応群において有意に低値を示し、急性拒絶発症を術前より予測し得る可能性が示唆された。

以上、著者は生体肝移植術直前の移植片における遺伝子発現を精査し、急性拒絶反応発症に関連する分子機構の一部を明らかにした。これは、新たな免疫抑制薬開発に繋がる分子基盤となり得る。また、術後 MRSA 感染症及びタクロリムス誘発性腎障害を的確に予測・診断するための指標となる因子をそれぞれ見出した。本研究成果は、生体肝移植術施行後における術後合併症の適切な予測及び診断に基づく速やかな対処を可能とし、周術期免疫抑制療法の個別化実現に向けて有用な基礎的知見になると考える。

謝　　　辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院　松原　和夫　教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、博士課程への進学及び研究全般に渡る多大な御支援、御指導を賜りました京都大学　乾　賢一　名誉教授、九州大学病院　増田　智先　教授に謹んで深謝致します。

また、研究遂行にあたり種々の有益なご助言とご指導を戴きました京都大学大学院薬学研究科　矢野　育子　准教授、立命館大学薬学部　桂　敏也　教授、京都大学医学部附属病院　中川　貴之　准教授、米澤　淳　講師、今井　哲司　助教、大村　友博　助教、並びに日夜親身になってご助言戴きました京都大学医学部附属病院　中川　俊作　助教に深く感謝致します。

そして、臨床検体並びに臨床情報の提供にご協力くださいました京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科／小児外科　上本　伸二　教授、岡本　晋弥　講師、同　呼吸器内科　三嶋　理晃　教授、金　永学　助教、並びに各診療科関係者の皆様に心より感謝致します。また、論文作成に際し貴重なご指導を賜りました京都大学医学部附属病院腎臓内科　柳田　素子　教授、九州大学医学研究院　岸本　淳司　准教授、並びにKIM-1測定用試薬をご提供戴き実験計画及び論文作成に際して多くのご助言を戴きました Harvard Medical School/Brigham and Woman's Hospital, Renal division, Joseph V. Bonventre 教授、市村　隆治　博士に深謝致します。

さらに、臨床検体の回収にご協力くださいました京都大学医学部附属病院薬剤部　池見　泰明　先生、上杉　美和　先生、菊池　実緒　先生、TDM 室での血中濃度測定をご担当くださいました端　幸代　先生、山本　由貴　先生をはじめ多くのご指導・ご助言を戴きました京都大学医学部附属病院薬剤部諸氏、並びに実験の一部にご協力戴きました佐藤　朋子　博士、小澤　愛子　修士、土本　彩未　学士、奥田　有紀　学士に感謝致します。また、研究について一からご指導賜り、これまで見守り続けてくださいました西原　久美子　博士、私の不慣れな研究指導にご辛抱くださいました田村　友香　学士、伴　毅　学士、冨田　恵里　学士、並びに共に試行錯誤しながら研究遂行にご協力戴きました京都大学医学部附属病院薬剤部　野口　葉子　先生に厚く御礼申し上げます。そして、九州大学での生活を支えて下さりご指導賜りました九州大学医学研究院　梶原　望渡　助教並びに九州大学病院薬剤部諸氏に心より御礼申し上げます。

最後になりますが、研究に専念できる環境を与えてくださり、7 年間の研究生活を暖かく見守り支えてくださった父　修造、母　恵、そして兄　雄に深い感謝の意を表して謝辞と致します。

実 験 の 部

ELISA キット

<u>R&D Systems (Minneapolis, MN)</u>

NGAL、MCP-1、Osteopontin、Cystatin C

<u>CMIC (Tokyo, Japan)</u>

L-FABP

<u>Medical & Biological Laboratories (Nagoya, Japan)</u>

Interleukin-18

<u>AdipoGen (Incheon, Korea)</u>

Clusterin

検査値測定キット

<u>和光純薬</u>

クレアチニン-テスト-ワコー

その他の試薬は、市販特級品を用いた。

第 I 章　実験の部

【1】対象患者（移植外科）

2010 年 8 月から 2013 年 7 月の間に京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科にて肝臓移植術を施行された 18 歳以上の成人患者のうち、インフォームドコンセントに基づいて承諾の得られた 93 例を対象とした。このうち以下の除外基準に従って患者を選択したのち、31 例の患者データを用いて解析を行った。なお、本研究は京都大学医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会の承認を得て実施した。

除外基準

- 術前より腎機能低下と関連する合併症を有する患者
- 周術期に腎代替療法が施行された患者
- 術後感染症と診断され抗生剤が投与された患者
- 移植後に開腹止血術を施行された患者
- 術後糖尿病と診断された患者
- 急性拒絶と診断された患者
- 術後に敗血症や肝腎症候群などタクロリムス以外の要因で AKI と診断された患者
- タクロリムスの投与量を減量しても Scr 値に変化が認められない（タクロリムス以外の原因が示唆される）患者

【2】対象患者（呼吸器内科）

2011 年 6 月から 2012 年 6 月の間に京都大学医学部付属病院呼吸器内科にてシスプラチンを中心としたがん化学療法を施行された患者のうち、インフォームドコンセントに基づいて承諾の得られた症例を対象とした。このうち、あらかじめ定めた時点での尿検体を全て採取でき、生化学的検査値の情報を得ることができた述べ 11 症例を解析対象とした。なお、本研究は京都大学医学研究科・医学部及び医学部付属病院医の倫理委員会の承諾を得て実施した。

【3】尿検体の採取（移植外科）

肝臓移植術後のタクロリムス投与開始直前（術後 1 日目）、術後 7、14 及び 21 日目を基準とし尿検体の採取を行った。尿検体は、早朝第一尿を避け、導尿されている患者は尿バックからシリンジを用いて、自立歩行が可能な患者は各自紙コップを用いて採取した。観察期間中に AKI と診断された患者については、さらに術後 28、35、42、49、58 日目と追加採取した。採取した尿検体にはタンパク質分解酵素阻害剤コンプリートミニ (Roche)及びタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤ホスストップ (Roche)を加え、測定の直前まで-80℃にて保存した。

【4】尿検体の採取（呼吸器内科）

シスプラチンによる化学療法が施行される前日、及び投与後 3, 7, 14 日目を基準とし尿検体の採取を行った。尿検体は、早朝第一尿を避け、患者自身が紙コップを用いて採取した。採取した尿検体にはタンパク質分解酵素阻害剤コンプリートミニ (Roche)及びタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤ホスストップ (Roche)を加え、測定の直前まで-80℃にて保存した。

【5】尿中バイオマーカー濃度の測定

第 I 章【3】及び【4】に準じて尿検体の採取を行った。尿中バイオマーカー濃度の測定は市販の ELISA キットを用いて行った。KIM-1 の測定には、Microsphere-based Luminex xMAP technology により構築した測定試薬を使用し、Bio-plex (Bio-Rad)を用いて測定を行った。また、尿中クレアチニン値はラボアッセイクレアチニン (Wako)を用いて Jaffé 法により算出し、測定した各バイオマーカー濃度は尿中クレアチニン値を用いて補正を行った。

【6】タクロリムス誘発性腎障害の判断基準

臨床検査値、治療に用いられた薬剤の種類及び投与量などの基本情報は、電子カルテよりレトロスペクティブに収集した。タクロリムス誘発性腎障害の診断は、主治医もしくは腎臓内科医の判断に従った。基本的には 96 時間以内に Scr 値が 1.5 倍以上上昇した場合を AKI とし、腎機能低下を引き起こす他の原因の可能性が排除されかつタクロリムスの投与量を減量するに伴って Scr 値の減少が認められた場合、タクロリムス誘発性腎障害であると判断した。また、術後 35 日以内に腎機能低下が認められなかった患者を AKI-free として分類した。推定 GFR (eGFR)値の算出は以下の式を用いた。

eGFR = 194*Age-0.278*Scr-1.094 (*0.739, 女性の場合)

【7】シスプラチン誘発性腎障害の判断基準

臨床検査値、治療に用いられた薬剤の種類及び投与量などの基本情報は、電子カルテよりレトロスペクティブに収集した。シスプラチン誘発性腎障害の診断は、Scr 値およ BUN の変化により行った。投与前と比較して Scr 値が 1.5 倍以上もしくは BUN が 20 mg/dL を超えた場合をシスプラチン誘発性腎障害とした。観察期間を通して一度も AKI と判断されなかった症例は 1 例のみであったため、AKI と判断された時点での尿検体を AKI (+)として分類した。

【8】統計解析

統計学的有意差の検定には Prism version 5.02 (GraphPad)を用いた。多群比較は Mann-Whitney U 検定または Kruskal-Wallis 検定を行った。カテゴリー変数については χ^2 検定もしくは Fisher's exact 検定により比較した。確率評価は Kaplan-Meier 法に基づき、

log-rank 検定を行った。ROC 解析におけるカットオフ値の算出は Youden Index を用いた[91]。なお、有意水準は 5%とした。

第Ⅱ章 実験の部

【1】対象患者

2004 年 7 月から 2011 年 6 月の間に京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科にて肝臓移植術を施行された 18 歳以上の成人患者のうち、インフォームドコンセントに基づいて承諾の得られた 191 例及びそのドナーを対象とした。血液型不適合症例及び再移植症例は、使用される免疫抑制薬が他の症例と異なるため除外している。なお、本研究は京都大学医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会の承認を得て実施した。

【2】*CYP3A5* 遺伝子多型の判定

移植直前にグラフト肝の一部及びレシピエントの小腸の一部を採取した。採取した組織片をホモジナイズし、MAgNAPure LC DNA Isolation kit I (Roche)もしくは AllPrep DNA/RNA Mini kit (Quiagen)を用いてゲノム DNA を単離した。単離したゲノム DNA を用いて、PCR-RFLP（PCR-restriction fragment length polymorphosm）法を用いて *CYP3A5* 遺伝子型の判定を行った。

【3】患者情報の収集と患者の群分け

臨床検査値、治療薬及びその他の患者背景は電子カルテより採取した。MRSA 治療薬使用の有無は、移植術後 40 日の間にバンコマイシンもしくはテイコプラニンを投与されているか否かによって判断した。MRSA 治療薬を投与された患者を MRSA 群、投与されなかった患者を Control 群とした。また、グラフトの大きさは GRWR を基準として分類し、0.8%以上のグラフトを移植された症例を large size 群、0.8%未満のグラフトを移植された症例を small size 群とした。

【4】タクロリムス血中濃度の測定

朝食後タクロリムスを服用する直前に全血を採取した。タクロリムス血中濃度は、2004 年 7 月から 2009 年 3 月の間は MEIA (microparticle enzyme-linked immunoassay)法によって (IMx; Abbott)、2009 年 4 月以降は CLIA (chemiluminescent enzyme immunoassay)法によって (ARCHITECT; Abbott)測定した。タクロリムスの投与量は血中濃度の測定結果に基づき、

術直後 2 週間はトラフ値が 10-15 ng/mL、その後 2 週間は 10 ng/mL 未満、それ以降は 5-7 ng/mL の範囲に収まるように調節した。

【5】統計解析

統計学的有意差の検定には Prism version 5.02 (GraphPad)を用いた。カテゴリー変数については unpaired *t* 検定、χ^2 検定もしくは Fisher's exact 検定により比較した。タクロリムス血中濃度は repeated measures ANOVA により比較を行った。確率評価は Kaplan-Meier 法に基づき、log-rank 検定を行った。多変量解析ではロジスティック回帰分析により、MRSA 治療薬の使用とそれぞれの因子との関連を評価した。なお、有意水準は 5%として行った。

第Ⅲ章　実験の部

【1】対象患者

1999 年 1 月から 2012 年 4 月の間に京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科にて肝臓移植術を施行された小児症例のうち、インフォームドコンセントに基づいて本人または代諾者の承諾が得られた 214 例及びそのドナーを対象とした。このうち、術後 2 週間以内に肝生検により急性拒絶反応と診断された 22 症例を急性拒絶反応 (ACR)群、拒絶反応も感染症も発症しなかった 11 症例を経過良好 (Control)群として分類した。さらに各群それぞれから、背景因子の類似する症例の組み合わせを選択し、6 組(12 症例)を解析対象とした。なお、本研究は京都大学医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会の承認を得て実施した

【2】タクロリムス血中濃度の測定

朝食後タクロリムスを服用する直前に全血を採取した。タクロリムス血中濃度は、2004 年 7 月から 2009 年 3 月の間は MEIA (microparticle enzyme-linked immunoassay)法によって (IMx; Abbott)、2009 年 4 月以降は CLIA (chemiluminescent enzyme immunoassay)法によって (ARCHITECT; Abbott)測定した。タクロリムスの投与量は血中濃度の測定結果に基づき、術直後 2 週間はトラフ値が 10-15 ng/mL、その後 2 週間は 10 ng/mL 未満、それ以降は 5-7 ng/mL の範囲に収まるように調節した。

【3】肝生検組織の採取及び total RNA の抽出

術時病理検査用に採取されるグラフト肝の一部(2 mm 角)を収集した。採取直後に液体窒素へ浸漬凍結し、その後-80℃にて使用直前まで保存した。採取した肝組織より AllPrep

DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。得られた total RNA は 2100 Bioanalyzer (Agilent)を用いてリボソーム RNA 比率及び RNA Integrity Number により品質確認を行った。

【4】標識 cRNA の作成及びハイブリダイゼーション

コントロールを含め 45015 probes が配置された Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイキット (Agilent)を用い、Agilent 社の提供する手順に従って行った。肝組織より抽出した total RNA を鋳型として、Quick Amp Labeling Kit (Agilent)を用いて Cyanine-3 により蛍光標識した cRNA を作成した。標識 cRNA 1 μg を断片化した後、65℃、17 時間ハイブリダイゼーションを行った。反応後、アレイを洗浄し、DNA Microarray Scanner (Agilent)を用いて画像化した。得られた画像から Feature Extraction Software (Agilent)を用いて数値化した。

【5】データ解析

イメージスキャンにより得られたシグナルは、中央値を用いて実験間の補正を行った。Control 群と ACR 群との値を paired t 検定により比較して、p 値が 0.01 を下回る遺伝子を抽出した。Gene ontology 解析には DAVID Bioinfomatics Resources 6.7 (URL: https://david.ncifcrf.gov/) [92, 93]を用いた。

【6】リアルタイム PCR

肝組織から抽出した total RNA を鋳型として、Random Primer 並びに Superscript II 逆転写酵素を用いて逆転写反応を行い、その後 RNase H 処理を行った。得られた single strand DNA を RT-PCR 法による mRNA 発現検出に用いた。

【7】統計解析

統計学的有意差の検定には Prism version 5.02 (GraphPad)を用いた。カテゴリー変数については unpaired *t* 検定、χ^2 検定もしくは Fisher's exact 検定により比較した。mRNA 発現量及び molecular score の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。なお、有意水準は 5%として行った。

論　文　目　録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin: A Useful Biomarker for Tacrolimus-Induced Acute Kidney Injury in Liver Transplant Patients

PLoS One, **9**: e110527, 2014

Urinary kidney injury molecule−1 and monocyte chemotactic protein−1 are noninvasive biomarkers of cisplatin−induced nephrotoxicity in lung cancer patients

Cancer Chemotherapy and Pharmacology, **76**: 989-996, 2015

Association between CYP3A5 genotype in graft liver/native intestine and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections after living-donor liver transplantation

In preparation

Effectiveness of Sirolimus in Combination with Cyclosporine against Chronic Rejection in a Pediatric Liver Transplant Patient

Biological and Pharmaceutical Bulletin, **36**: 122-1225, 2013

Novel sets of genes correlated with acute cellular rejection after pediatric living-donor liver transplantation

In preparation

引 用 文 献

1. Kaido, T., et al., *In-hospital mortality in adult recipients of living donor liver transplantation: experience of 576 consecutive cases at a single center.* Liver Transpl, 2009. **15**(11): p. 1420-5.
2. Lassnigg, A., et al., *Impact of minimal increases in serum creatinine on outcome in patients after cardiothoracic surgery: do we have to revise current definitions of acute renal failure?* Crit Care Med, 2008. **36**(4): p. 1129-37.
3. Ojo, A.O., et al., *Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ.* N Engl J Med, 2003. **349**(10): p. 931-40.
4. Henry, M.L., *Cyclosporine and tacrolimus (FK506): a comparison of efficacy and safety profiles.* Clin Transplant, 1999. **13**(3): p. 209-20.
5. Yasuhara, M., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of FK 506 in pediatric patients receiving living-related donor liver transplantations.* Transplant Proc, 1995. **27**(1): p. 1108-10.
6. Naesens, M., D.R. Kuypers, and M. Sarwal, *Calcineurin inhibitor nephrotoxicity.* Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(2): p. 481-508.
7. Selzner, M., et al., *Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver.* Hepatology, 2000. **32**(6): p. 1280-8.
8. Sieber, M., et al., *Comparative analysis of novel noninvasive renal biomarkers and metabonomic changes in a rat model of gentamicin nephrotoxicity.* Toxicol Sci, 2009. **109**(2): p. 336-49.
9. Mori, K., et al., *Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury.* J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 610-21.
10. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery.* Lancet, 2005. **365**(9466): p. 1231-8.
11. Doi, K., et al., *Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new biomarker of sepsis complicated with acute kidney injury.* Crit Care Med, 2010. **38**(10): p. 2037-42.
12. Ferguson, M.A., et al., *Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts adverse outcomes in acute kidney injury.* Kidney Int, 2010. **77**(8): p. 708-14.

13. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.* Crit Care, 2007. **11**(2): p. R31.
14. Nishihara, K., et al., *Urinary chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemotactic protein-1) as a tubular injury marker for early detection of cisplatin-induced nephrotoxicity.* Biochem Pharmacol, 2013. **85**(4): p. 570-82.
15. Shinke, H., et al., *Urinary kidney injury molecule-1 and monocyte chemotactic protein-1 are noninvasive biomarkers of cisplatin-induced nephrotoxicity in lung cancer patients.* Cancer Chemother Pharmacol, 2015. **76**(5): p. 989-96.
16. Matsushima, K., et al., *Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.* J Exp Med, 1989. **169**(4): p. 1485-90.
17. Parikh, C.R., et al., *Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery.* Kidney Int, 2006. **70**(1): p. 199-203.
18. Yano, R., et al., *Participation of bone morphogenetic protein (BMP)-6 and osteopontin in cisplatin (CDDP)-induced rat renal fibrosis.* Exp Toxicol Pathol, 2015. **67**(2): p. 99-107.
19. Koyner, J.L., et al., *Urinary cystatin C as an early biomarker of acute kidney injury following adult cardiothoracic surgery.* Kidney Int, 2008. **74**(8): p. 1059-69.
20. Hidaka, S., et al., *Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries.* Cell Tissue Res, 2002. **310**(3): p. 289-96.
21. Dvergsten, J., et al., *Expression of clusterin in human renal diseases.* Kidney Int, 1994. **45**(3): p. 828-35.
22. Cabezuelo, J.B., et al., *Risk factors of acute renal failure after liver transplantation.* Kidney Int, 2006. **69**(6): p. 1073-80.
23. Zhu, M., et al., *Strong impact of acute kidney injury on survival after liver transplantation.* Transplant Proc, 2010. **42**(9): p. 3634-8.
24. Grzybowski, M. and J.G. Younger, *Statistical methodology: III. Receiver operating characteristic (ROC) curves.* Acad Emerg Med, 1997. **4**(8): p. 818-26.
25. Lv, Y. and D. Fan, *Hepatopulmonary Syndrome.* Dig Dis Sci, 2015. **60**(7): p. 1914-23.
26. Gines, P., et al., *Hepatorenal syndrome.* Lancet, 2003. **362**(9398): p.

1819-27.
27. Yalavarthy, R., C.L. Edelstein, and I. Teitelbaum, *Acute renal failure and chronic kidney disease following liver transplantation.* Hemodial Int, 2007. **11 Suppl 3**: p. S7-12.
28. McCauley, J., et al., *Acute and chronic renal failure in liver transplantation.* Nephron, 1990. **55**(2): p. 121-8.
29. Fraley, D.S., et al., *Impact of acute renal failure on mortality in end-stage liver disease with or without transplantation.* Kidney Int, 1998. **54**(2): p. 518-24.
30. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase.* J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10425-32.
31. Cainelli, F. and S. Vento, *Infections and solid organ transplant rejection: a cause-and-effect relationship?* Lancet Infect Dis, 2002. **2**(9): p. 539-49.
32. Goetz, D.H., et al., *The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition.* Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1033-43.
33. Bennett, M., et al., *Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study.* Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(3): p. 665-73.
34. Wagener, G., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation.* Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(5): p. 1717-23.
35. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity.* Am J Nephrol, 2004. **24**(3): p. 307-15.
36. Ling, W., et al., *Urinary IL-18 and NGAL as early predictive biomarkers in contrast-induced nephropathy after coronary angiography.* Nephron Clin Pract, 2008. **108**(3): p. c176-81.
37. Bonventre, J.V., et al., *Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity.* Nat Biotechnol, 2010. **28**(5): p. 436-40.
38. Kuwabara, T., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons.* Kidney Int, 2009. **75**(3): p. 285-94.
39. Mohebbi, N., M. Mihailova, and C.A. Wagner, *The calcineurin inhibitor FK506 (tacrolimus) is associated with transient metabolic acidosis and*

altered expression of renal acid-base transport proteins. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **297**(2): p. F499-509.

40. Dobyan, D.C., et al., *Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations.* J Pharmacol Exp Ther, 1980. **213**(3): p. 551-6.
41. Yonezawa, A., et al., *Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat.* Biochem Pharmacol, 2005. **70**(12): p. 1823-31.
42. Shinke, H., et al., *Effectiveness of sirolimus in combination with cyclosporine against chronic rejection in a pediatric liver transplant patient.* Biol Pharm Bull, 2013. **36**(7): p. 1221-5.
43. Whiting, P.H., et al., *Experimental cyclosporin A nephrotoxicity.* Br J Exp Pathol, 1982. **63**(1): p. 88-94.
44. Murray, B.M., M.S. Paller, and T.F. Ferris, *Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats.* Kidney Int, 1985. **28**(5): p. 767-74.
45. Griffiths, P.D., *Viral complications after transplantation.* J Antimicrob Chemother, 1995. **36 Suppl B**: p. 91-106.
46. Barri, Y.M., et al., *Acute kidney injury following liver transplantation: definition and outcome.* Liver Transpl, 2009. **15**(5): p. 475-83.
47. Razonable, R.R., et al., *Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir.* J Infect Dis, 2001. **184**(11): p. 1461-4.
48. Iida, T., et al., *Posttransplant bacteremia in adult living donor liver transplant recipients.* Liver Transpl, 2010. **16**(12): p. 1379-85.
49. Kawecki, D., et al., *Bacterial and fungal infections in the early post-transplantation period after liver transplantation: etiologic agents and their susceptibility.* Transplant Proc, 2014. **46**(8): p. 2777-81.
50. Woeste, G., et al., *Influence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrier status in liver transplant recipients.* Transplant Proc, 2005. **37**(4): p. 1710-2.
51. Gupta, A., M. Biyani, and A. Khaira, *Vancomycin nephrotoxicity: myths and facts.* Neth J Med, 2011. **69**(9): p. 379-83.
52. Fukudo, M., et al., *Population pharmacokinetic and pharmacogenomic analysis of tacrolimus in pediatric living-donor liver transplant recipients.* Clin Pharmacol Ther, 2006. **80**(4): p. 331-45.

53. Fukudo, M., et al., *Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients.* Pharmacogenet Genomics, 2008. **18**(5): p. 413-23.
54. Uesugi, M., et al., *Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant recipients.* Pharmacogenet Genomics, 2006. **16**(2): p. 119-27.
55. Goto, M., et al., *CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation.* Pharmacogenetics, 2004. **14**(7): p. 471-8.
56. Muraki, Y., et al., *Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients.* Ann Transplant, 2011. **16**(4): p. 55-62.
57. Hattori, Y., et al., *Influence of cytochrome P450 3A5 polymorphisms on viral infection incidence in kidney transplant patients treated with tacrolimus.* Transplant Proc, 2014. **46**(2): p. 570-3.
58. Kiuchi, T., et al., *Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors.* Transplantation, 1999. **67**(2): p. 321-7.
59. Shirouzu, Y., et al., *Massive ascites after living donor liver transplantation with a right lobe graft larger than 0.8% of the recipient's body weight.* Clin Transplant, 2010. **24**(4): p. 520-7.
60. Safdar, N. and D.G. Maki, *The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant Staphylococcus aureus, enterococcus, gram-negative bacilli, Clostridium difficile, and Candida.* Ann Intern Med, 2002. **136**(11): p. 834-44.
61. Desai, D., et al., *Carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus is associated with an increased risk of infection after liver transplantation.* Liver Transpl, 2003. **9**(7): p. 754-9.
62. Hashimoto, M., et al., *Impact of new methicillin-resistant Staphylococcus aureus carriage postoperatively after living donor liver transplantation.* Transplant Proc, 2007. **39**(10): p. 3271-5.
63. Hellinger, W.C., et al., *Surgical site infection after liver transplantation: risk factors and association with graft loss or death.* Transplantation, 2009. **87**(9): p. 1387-93.
64. Kiuchi, T., et al., *Small-for-size graft in living donor liver transplantation:*

how far should we go? Liver Transpl, 2003. **9**(9): p. S29-35.
65. Hill, M.J., et al., *Graft weight/recipient weight ratio: how well does it predict outcome after partial liver transplants?* Liver Transpl, 2009. **15**(9): p. 1056-62.
66. Rubin, L.G. and W. Schaffner, *Clinical practice. Care of the asplenic patient.* N Engl J Med, 2014. **371**(4): p. 349-56.
67. Shimomura, M., et al., *Required transient dose escalation of tacrolimus in living-donor liver transplant recipients with high concentrations of a minor metabolite M-II in bile.* Drug Metab Pharmacokinet, 2008. **23**(5): p. 313-7.
68. Goto, M., et al., *Relation between mRNA expression level of multidrug resistance 1/ABCB1 in blood cells and required level of tacrolimus in pediatric living-donor liver transplantation.* J Pharmacol Exp Ther, 2008. **325**(2): p. 610-6.
69. Haufroid, V., et al., *The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients.* Pharmacogenetics, 2004. **14**(3): p. 147-54.
70. Elens, L., et al., *Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients.* Pharmacogenomics, 2011. **12**(10): p. 1383-96.
71. Wu, Z., et al., *A retrospective analysis of the safety and efficacy of low dose tacrolimus (FK506) for living donor liver transplant recipients.* J Biomed Res, 2013. **27**(4): p. 305-9.
72. Uesugi, M., et al., *Impact of cytochrome P450 3A5 polymorphism in graft livers on the frequency of acute cellular rejection in living-donor liver transplantation.* Pharmacogenet Genomics, 2014. **24**(7): p. 356-66.
73. Chen, C.L., et al., *Living donor liver transplantation for biliary atresia: a single-center experience with first 100 cases.* Am J Transplant, 2006. **6**(11): p. 2672-9.
74. Ghanekar, A., et al., *Routine induction therapy in living donor liver transplantation prevents rejection but may promote recurrence of hepatitis C.* Transplant Proc, 2012. **44**(5): p. 1351-6.
75. Masuda, S., et al., *Initial dosage adjustment for oral administration of tacrolimus using the intestinal MDR1 level in living-donor liver transplant recipients.* Transplant Proc, 2005. **37**(4): p. 1728-9.
76. Uchida, Y., et al., *Induction of specific stress response increases resistance*

of rat liver allografts to cold ischemia and reperfusion injury. Transpl Int, 2003. **16**(6): p. 396-404.
77. Slegtenhorst, B.R., et al., *Mechanisms and consequences of injury and repair in older organ transplants.* Transplantation, 2014. **97**(11): p. 1091-9.
78. Nakagawa, S., et al., *Molecular Markers of Tubulointerstitial Fibrosis and Tubular Cell Damage in Patients with Chronic Kidney Disease.* PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0136994.
79. Naesens, M., et al., *Progressive histological damage in renal allografts is associated with expression of innate and adaptive immunity genes.* Kidney Int, 2011. **80**(12): p. 1364-76.
80. Elsharkawi, M., et al., *Complete remission of postransplant lung metastases from hepatocellular carcinoma under therapy with sirolimus and mycophenolate mofetil.* Transplantation, 2005. **79**(7): p. 855-7.
81. De Simone, P., et al., *Everolimus with reduced tacrolimus improves renal function in de novo liver transplant recipients: a randomized controlled trial.* Am J Transplant, 2012. **12**(11): p. 3008-20.
82. Lazorchak, A.S., et al., *Sin1-mTORC2 suppresses rag and il7r gene expression through Akt2 in B cells.* Mol Cell, 2010. **39**(3): p. 433-43.
83. Benhamron, S. and B. Tirosh, *Direct activation of mTOR in B lymphocytes confers impairment in B-cell maturation andloss of marginal zone B cells.* Eur J Immunol, 2011. **41**(8): p. 2390-6.
84. Zhang, S., et al., *Constitutive reductions in mTOR alter cell size, immune cell development, and antibody production.* Blood, 2011. **117**(4): p. 1228-38.
85. Kahan, B.D., *The potential role of rapamycin in pediatric transplantation as observed from adult studies.* Pediatr Transplant, 1999. **3**(3): p. 175-80.
86. Hong, J.C. and B.D. Kahan, *Sirolimus-induced thrombocytopenia and leukopenia in renal transplant recipients: risk factors, incidence, progression, and management.* Transplantation, 2000. **69**(10): p. 2085-90.
87. Sato, E., et al., *Temporal decline in sirolimus elimination immediately after pancreatic islet transplantation.* Drug Metab Pharmacokinet, 2006. **21**(6): p. 492-500.
88. Matsumoto, S., et al., *Insulin independence after living-donor distal pancreatectomy and islet allotransplantation.* Lancet, 2005. **365**(9471): p. 1642-4.
89. Gallant-Haidner, H.L., et al., *Pharmacokinetics and metabolism of sirolimus.* Ther Drug Monit, 2000. **22**(1): p. 31-5.

90. Haehner, T., M.O. Refaie, and D. Muller-Enoch, *Drug-drug interactions evaluated by a highly active reconstituted native human cytochrome P4503A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase system.* Arzneimittelforschung, 2004. **54**(1): p. 78-83.
91. Fluss, R., D. Faraggi, and B. Reiser, *Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point.* Biom J, 2005. **47**(4): p. 458-72.
92. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources.* Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
93. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(1): p. 1-13.