

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書（平成21年度）
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

治療最適化を目指した長期持続型インターフェロン発現ベクターの開発

研究分担者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨： インターフェロン- α (IFN- α) に対して抵抗性を示す肝炎治療法の確立を目的に、異なる作用機序で IFN- α と同等またはそれ以上の抗 HCV 効果を示しうる IFN- γ の遺伝子を長期間に渡り発現可能なシステムを開発し、その有用性について検討した。開発したヒト IFN- γ の持続型発現 plasmid DNA (pDNA) を通常マウスに遺伝子導入した結果、単回投与で約 8 ヶ月に渡り治療有効レベルのヒト IFN- γ 血中濃度を保持できることが確認された。さらに、SCID マウスでも同様に長期間にわたる IFN- γ を発現させることが可能であり、ヒト肝細胞キメラマウスへも応用できる可能性が示された。HCV レプリコン細胞を用いた *in vitro* の系での遺伝子導入実験により発現した IFN- γ が抗 HCV 効果を示すことも確認された。さらに、IFN- γ の血中滞留性の向上を目的として、マウス IFN- γ と Enhanced green fluorescent protein (EGFP) やマウス血清アルブミン (mouse serum albumin; MSA) との融合タンパク発現 pDNA を構築した。その結果、IFN- γ を MSA との融合タンパクとすることで血中における平均滞留時間が有意に延長し、本アプローチによる IFN- γ 作用時間の持続化が可能であることが示された。

A. 研究目的

治療抵抗性肝炎に対する IFN- γ 遺伝子治療を実現するために持続作用型 IFN- γ 発現ベクターを 2 種類の異なるアプローチに基づき開発する。すなわち、CpG 配列削減型 IFN- γ 発現ベクターおよび IFN- γ 融合タンパク発現ベクターを構築する。IFN- γ 融合タンパクの機能・性質を *in vitro* において評価した後、IFN- γ 融合タンパク発現ベクターを担癌モデルマウスに遺伝子導入しその抗腫瘍効果から本アプローチの治療上の有効性を証明する。

B. 研究方法

pDNA： CpG 配列を全く持たない pDNA 骨格 (pCpG-mcs: InvivoGen) に、マウス及びヒト IFN- γ cDNA を組み込むことで IFN 発現 pDNA (pCpG-Mu γ 、pCpG-Hu γ) を構築した。比較には CpG モチーフを多数含む従来型 pCMV-Mu γ を用いた。別途、マウス IFN- γ の C 末端に EGFP あるいは MSA を連結した融合タンパクをコードする遺伝子を従来型 pCMV ベクターに組み込むことで pCMV-Mu γ -EGFP あるいは pCMV-Mu γ -MSA を構築した。**培養細胞：** COS7 細胞に遺伝子導入後培養上清を回収し下記の解析を行った。**IFN- γ 融合タンパクの解析：** 回収

した上清中の IFN- γ 濃度は ELISA 法により測定した。各種 IFN- γ タンパクの分子量および IFN- γ 2 量体の形成効率はウェスタンブロッティング法を用いて評価した。IFN- γ 生物活性の評価には IFN- γ 応答配列 (IFN- γ activation sequence; GAS) の下流にレポーター遺伝子であるルシフェラーゼを組み込んだ pDNA、pGAS-Luc を用いた。マウス : ICR 雄性マウス (4 週齢) および balb/c 雄性マウス (7 週齢)、SCID 雌性マウス (6 週齢) を用いた。ハイドロダイナミクス法を利用したマウスへの遺伝子導入 : naked pDNA をマウス体重の約 10% に相当する容量の生理食塩水に溶解し、マウス尾静脈内に急速投与した。血中 IFN- γ 濃度の測定 : 経時的にマウス尾静脈より採血し、血清中 IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定した。抗腫瘍効果の評価 : マウス尾静脈よりマウス結腸癌細胞株 CT-26 を移植することで肺転移モデルを作製し、癌細胞移植 3 日後にハイドロダイナミクス法を用いて各種 IFN- γ 発現 pDNA を投与し、癌細胞移植 14 日後の肺結節数を計測することで抗腫瘍効果の評価した。

C. 研究結果

本研究ではベクター中の CpG 配列を削減することにより長期発現型 IFN- γ 発現ベクターの開発を試みた。

CpG 配列を全く持たない骨格にマウスおよびヒト IFN- γ cDNA を組み込んだ pDNA ベクターを構築し、正常マウス (ICR マウス) を用いて発現プロファイルを評価した結果、低投与量 (0.11 μ g/mouse) で IFN- γ の血中濃度を治療域に 70 日以上 of 長期間に渡り維持できることが示された。ヒト IFN- γ の血中濃度は、期間中を通じ約 100IU/mL 以上と in vitro で HCV 複製抑制効果が得られる濃度を大きく上回った。また、正常マウスと比較して遺伝子導入効率が低い可能性が示されている SCID マウスにおいても、正常マウスの場合と同様に持続的な IFN- γ の血中濃度が得られた。

次に、IFN- γ を融合タンパクとして発現させることによる血中滞留性の向上について検討を行った。IFN- γ は分子量 17kDa の分泌タンパクであり、IFN- γ 2 量体を形成し IFN- γ 受容体に結合することでその生物活性を発揮する。IFN- γ の分子量は 2 量体でも 34kDa であり糸球体濾過を受けるため、IFN- γ の血中半減期は短いと考えられる。そこで本研究では、IFN- γ を分子量 27kDa のタンパクである EGFP あるいは 69kDa の MSA との融合タンパクとし、IFN- γ の分子量を増大させることによる血中滞留性の向上を試みた。すなわち従来型の pDNA にマウス IFN- γ の C 末端に EGFP あるいは MSA

を融合したタンパクをコードする配列を組み込むことで、pCMV-Muy-EGFP および pCMV-Muy-MSA を構築した。

構築した pDNA を COS-7 細胞に遺伝子導入した後、培養上清を回収しタンパクの性状・機能の解析を行った。上清中に含まれる IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定したのち、ウェスタンブロッティング法により発現する IFN- γ の分子量を評価した。その結果、デザイン通りの分子量の融合タンパクが産生されることを確認した。一方で、EGFP あるいは MSA との融合タンパクとすることにより、IFN- γ の 2 量体の形成効率が低下する傾向が観察され、特に MSA との融合タンパクにおいてその傾向が強く観察された。IFN- γ 融合タンパクの IFN- γ 生物活性の評価は、マウス黒色細胞腫 B16 細胞に IFN- γ 応答配列下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーター pGAS-Luc を遺伝子導入した後、各種 IFN- γ を培養上清に添加後のルシフェラーゼ活性を測定することで行った。その結果、EGFP あるいは MSA との融合タンパクとすることで IFN- γ の生物活性は天然型 IFN- γ と比較して約 10 分の 1、および 100 分の 1 にそれぞれ低下することが明らかとなった。融合タンパクにすることによる生物活性の低下は、IFN- γ 2 量体の形成効率の低

下によるものではないかと推測される。

次に、ハイドロダイナミクス法を用いて ICR マウスにそれぞれの IFN- γ 発現 pDNA を遺伝子導入した後、経時的に血中 IFN- γ 濃度を測定し血中滞留性を評価した。その結果、EGFP との融合タンパクの血中滞留性は天然型 IFN- γ とほぼ同じであったが、MSA と IFN- γ との融合タンパクとすることで IFN- γ の血中滞留性は大幅に向上した。そこで、balb/c マウスの尾静脈より CT26 細胞を移植することで作製した肺転移モデルに対して、各種 IFN- γ を遺伝子導入することによつ抗腫瘍効果を評価した。その結果、IFN- γ と EGFP の融合タンパク発現ベクターの投与によってはほとんど抗腫瘍効果が認められなかった一方で、天然型 IFN- γ と IFN- γ -MSA 融合タンパクの投与ではほぼ同等の抗腫瘍効果が得られた。これは、MSA との融合タンパクとすることで IFN- γ 生物活性は大きく低下する一方で、血中滞留性は大幅に向上したため、結果として天然型 IFN- γ とほぼ同等の抗腫瘍効果が得られたものと考えられる。

D. 考察

IFN- γ は、HCV 複製抑制作用を有するが、HCV レプリコン細胞を用いた *in vitro* の系では、I 型 IFN よりも低濃

度で効果を有すること、併用により相乗効果が得られることが知られている。また、I型IFNとは異なる機構の関与も報告されており、I型IFN抵抗性肝炎の治療

に応用できる可能性が考えられる。しかしながら、IFN- γ の血中半減期は非常に短く、タンパク質製剤の投与では効果が持続しないことから、肝炎治療への応用は大きく制限されている。そこで本研究では、ベクター骨格の改良あるいはIFN- γ 融合タンパクの構築による長期作用型IFN- γ 発現ベクターの開発を試みた。

その結果、CpG配列削減型IFN- γ 発現ベクターをマウスへ効率的に遺伝子導入することで8カ月以上にわたる持続的なIFN- γ 遺伝子発現を得られることが明らかとなった。SCIDマウスでも同様の結果が得られ、現在ヒト肝細胞キメラマウスを用いた評価を予定している。またMSAとの融合タンパクとすることでIFN- γ の血中滞留性を大幅に向上可能である一方、IFN- γ 生物活性を著しく低下させることが明らかとなった。したがって、血中滞留性を改善しつつIFN- γ 生物活性を低下させないような融合タンパクのデザインが望まれる。

本研究で得られた知見は、長期作用型IFN- γ 遺伝子治療法の開発に重要な情報を提供するとともに、その肝炎治

療への応用の可能性を示すものと考えられる。

E. 結論

治療抵抗性肝炎に対するIFN- γ 遺伝子治療を実現するための長期作用型IFN- γ 発現ベクターの開発を試みた。開発したベクターの投与により、IFN- γ の血中濃度を治療域に長期間に渡り維持できることが示された。また、IFN- γ 融合タンパクとすることによりIFN- γ 作用時間をさらに延長可能であることが示されたが、さらなる治療効果の増強には生物活性を保持しつつ血中滞留性を向上可能な融合タンパクのデザインが必要であることが明らかとなった。以上の結果より、本研究で開発した長期作用型IFN- γ 発現ベクターの治療抵抗性肝炎治療への応用の可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. Sustained exogenous expression of therapeutic levels of

- interferon- γ ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. *J Immunol.* 2010 Jan 27. [Epub ahead of print]
2. Yasuda S, Yoshida H, Nishikawa M, Takakura Y. Comparison of the type of liposome involving cytokine production induced by non-CpG lipoplex in macrophages. *Mol Pharm.* 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]
 3. Nishikawa M, Otsuki T, Ota A, Guan X, Takemoto S, Takahashi Y, Takakura Y. Induction of tumor-specific immune response by gene transfer of Hsp70-cell penetrating peptide fusion protein to tumors in mice. *Mol Ther;* 18:421-428 (2010).
 4. Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Toyota H, Kiyota T, Takahashi R, Takakura Y. TLR9-dependent systemic interferon-beta production by intravenous injection of plasmid DNA/cationic liposome complex in mice. *J Gene Med;*11:708-717 (2009)
 5. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Adv Drug Delivery Rev;*61:760-766 (2009)
2. 学会発表
 1. Design and development of DNA-based nanoassemblies and hydrogels with enhanced immunostimulatory activity. Sakulrat Rattanakiat, Makiya Nishikawa, Yumiko Mizuno, Mitsuhiro Matono, Hisakage Funabashi, Dan Luo, Yoshinobu Takakura. 36th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society (Copenhagen, Denmark), July 18-22 (2009)
 2. “Negative involvement of cytoskeletal reorganization in repeated expression of transgenes from silenced vectors (発現低下した遺伝子ベクターからの繰り返し遺伝子発現における細胞骨格再構成の非関与)” Naomi Takiguchi, Makiya Nishikawa, Yasushi Fukuhara, Lei Zhang, Yuriko Matsui, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura. 日本薬物動態学会第24回年会、京都、2009年11月
 3. “Design and development of DNA assemblies with enhanced immunostimulatory activity” Makiya Nishikawa, Sakulrat Rattanakiat, Yumiko Mizuno, Nao Matsuoka,

- Kohta Mohri, Hisakage Funabashi, Dan Luo, Yoshinobu Takakura. 第19回アンチセンスー第5回OTS年會合同国際学会、福岡、2009年11月
4. “Development of highly structured DNA molecules as drug delivery systems with high immunostimulatory activity” Kohta Mohri, Makiya Nishikawa, Sakulrat Rattanakiat, Yumiko Mizuno, Nao Matsuoka, Hisakage Funabashi, Dan Luo, Yoshinobu Takakura. 第19回アンチセンスー第5回OTS年會合同国際学会、福岡、2009年11月
 5. Cholesterol-modified CpG oligodeoxynucleotides as a topical therapeutic agent for atopic dermatitis. Hiroyasu Toyota, Makiya Nishikawa, Sakulrat Rattanakiat, Yoshinobu Takakura. 第19回アンチセンスー第5回OTS年會合同国際学会、福岡、2009年11月
 6. “Contradictory effects of gene silencing of β -catenin in melanoma cells on proliferation and metastasis (β -catenin遺伝子発現抑制によるがん細胞増殖抑制効果と転移促進)” Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. 第68回日本癌学会学術總會、横浜、2009年10月
 7. “体内動態制御型インターフェロン融合タンパク質のデザインとin vivo遺伝子導入後の体内動態解析” 宮川典子、西川元也、安藤 満、高橋有己、渡部好彦、高倉喜信. 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム、大阪、2009年7月
 8. “ヒトインターフェロン γ 持続発現型プラスミドベクターの開発” 安藤 満、西川元也、高橋有己、渡部好彦、高倉喜信. 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム、大阪、2009年7月
 9. “インターフェロン γ の持続的遺伝子発現による皮膚免疫・バリア機能の改善” 西川元也、服部香代子、Kanitta Watcharanurak、豊田敬康、椛島健治、生駒晃彦、渡部好彦、高倉喜信. 遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム、大阪、2009年7月
 10. “長期持続型ヒトインターフェロン γ 発現プラスミドベクターの開発” 安藤 満、西川元也、高倉喜信. 第25回日本DDS学会学術集會、東京、2009年7月
 11. 免疫・化学療法を目的とした短鎖DNAを基盤とするDNAハイドロゲルの開発 松岡奈穂、水野友美子、西川元也、Sakulrat Rattanakiat、舟橋久景、Dan Luo、高倉喜信. 第25回日本DDS

- 学会学術集会、東京、2009年7月
12. “Enhanced adjuvant effect of CpG oligodeoxynucleotides by cholesterol conjugation” Sakurat Rattanakiat, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. 日本薬剤学会第24年会、静岡、2009年5月
13. “コレステロール修飾CpGオリゴデオキシヌクレオチドによる投与経路依存的なTh1免疫応答の誘導” 豊田敬康、西川元也、Sakurat Rattanakiat、高倉喜信. 日本薬剤学会第24年会、静岡、2009年5月
14. “Inhibition of atopic dermatitis by

sustained exogenous expression of interferon γ in NC/Nga mice” Kanitta Watcharanurak, Kayoko Hattori, Makiya Nishikawa, Akihiko Ikoma, Kenji Kabashima, Rei Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura. 日本薬剤学会第24年会、静岡、2009年5月

H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書（平成21年度）
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

肝炎の進行と治療感受性を規定するウイルス領域の包括的検討

研究分担者 前川伸哉 山梨大学医学工学総合研究部 講師

研究要旨：本研究の目的は、治療感受性あるいは肝炎の進行を規定する肝炎ウイルス領域を、患者血清から抽出したウイルスの遺伝子解析で明らかとすることである。H21年度においては、H20年度に引き続いてゲノタイプ1b HCV 症例における HCV 全翻訳領域解析により治療効果と関連するウイルス領域の解析をより詳細に行い、ウイルス反応性を規定するウイルス領域として、Core、ISDR に加え、NS5A の IRRDR 領域多型が再燃と強く関与し、最終治療効果に強く関与することを明らかとした。ゲノタイプ2a HCV 症例においても HCV 全長解析を行い、コアの多型が治療効果に関与することを明らかにした。一方、HBV 症例について同様に全長解析を行い、PreS2 変異症例において早期にラミブジン耐性が出現する可能性、さらに HCV において E1、NS5A 領域における多型と発癌との関連性を現在明らかとしつつある。リバーシジェネティクス的手法を用いて、病態を規定するこのようなウイルス領域に変異を導入した肝炎ウイルスをキメラマウスに感染させることにより、同領域の有する生物学的な意義の解明を通して、よりすぐれた抗ウイルス薬等の開発に結び付くことが期待される。

共同研究者氏名

榎本信幸

山梨大学医学工学総合研究部 教授

A. 研究背景・目的

肝炎ウイルス遺伝子は変異に富み、治療反応性も多様であるが、宿主の多様性も関与しており、ウイルスの多様性と病像の多様性の関連は十分に解明されていない。

一方、従来はこれらのウイルス変異の多様性が有する生物学的な意義を直截検証し得る系が存在しなかったが、ヒト肝細胞キメラマウスはこれらの問題点を解決する画期的システムである。我々はハイスループットの肝炎ウイルスゲノムワイド解析システムを構築し、各種病像に対応するウイルス全ゲノムの多様性の網羅的解析を行いつつある。本研究では、この成果とヒト肝細胞キメラマウス系による肝炎実験動物モデ

ルでの肝炎ウイルスの病原性解析を統合することを目的とする。

平成21年度は、平成20年度に引き続き、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法に対して多様な反応性を示したゲノタイプ1bのHCV症例をさらに詳細に検討、さらに同様の解析をゲノタイプ2aHCV症例にも行った。HCVのみならず、抗ウイルス療法を導入したHBV症例の治療効果と関連するゲノム領域を検索した。一方、肝炎の進行と発癌に関連する領域についても、全長解析にて検討した。

B. 研究方法（2009年度）

PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した症例群の治療開始前、あるいは肝発癌症例の肝発症前の血清から HCV-RNA を抽出し、ダイレクトシーケンシング法により全翻訳領域配列を決定し、治療効果あるいは肝発癌と関

連する HCV 領域を検索した。HBV についてはラミブジン治療例を対象にし、治療導入前の血液を用いて HBV 全ゲノムを解析し、同様に耐性出現を規定するウイルスゲノム領域について検索した。

C. 研究成果

(1) ゲノタイプ 1b 感染において、IRRDR 領域は PEG-IFN/RBV 併用療法の再燃と最終治療効果と最も強く関連する HCV ウイルス領域である

PEG-IFN/RBV 併用療法を施行したゲノタイプ 1b 症例群を SVR 群と non-SVR 群に分類し、サブグループ解析を sliding window 解析を併用して行ったところ、NS5A の IRRDR 領域が 2 群で顕著な違いを認める領域として抽出された。一方、治療終了時にウイルスが陰性化した群を再燃例と非再燃例に分類して比較したところ、やはり同様に IRRDR が抽出された。すなわち最終的な治療効果には再燃が強く関与し、再燃の有無を規定するのが IRRDR の多型であることが明らかとなった。

(2) ゲノタイプ 2a 感染において、コア領域は PEG-IFN/RBV 併用療法効果と強く関連する HCV ウイルス領域である

一方、PEG-IFN/RBV 併用療法を施行したゲノタイプ 2a 症例群において、SVR 群と non-SVR 群に分類し、サブグループ解析を sliding window 解析を併用して検索したところ、2 群間で最も異なるウイルス領域はコア領域であることが明らかとなった。

(3) HBV 感染に対するラミブジン治療において、PreS2 変異は、耐性出現の有無を規定する

ラミブジン療法を施行した HBV 症例にお

いて、耐性出現群と非出現群に分類し、治療導入前の血清から HBV 全アミノ酸を決定、比較したところ、2 群間で最も異なるウイルス領域は PreS2 領域であった。

(4) HCV における発癌に HCV の E1 領域と NS5A 領域の多型が関連する

ゲノタイプ 1b HCV 症例群において、経過中に発癌した症例と非発癌症例に分類し、サブグループ解析を sliding window 解析を併用して検索したところ、2 群間で最も異なるウイルス領域は E1 領域と NS5A 領域であった。

D. 考察

ウイルス全長解析を用いた網羅的な検討により、難治である HCV ゲノタイプ 1b 症例群において、PEG-IFN/RBV 併用療法の反応性を規定するのは、コア、ISDR、IRRDR における多型であることを明らかとした。一方で、治療感受性の高いとされる 2a 症例においてもコアのアミノ酸多型が抵抗性に関与する結果が得られ、コアの持つ臨床的な重要性を明らかとした。ウイルス全長解析は HBV の治療抵抗性、あるいは HCV の肝発癌と関連するウイルス領域の抽出にも有用であった。

E. 結論

ウイルスゲノムワイド解析システムによって、治療反応性、耐性出現、あるいは肝発癌を規定する HCV、HBV のウイルス領域が明らかとなってきた。同様の手法を用いて、多様な肝炎ウイルスの病態における遺伝子領域の関与をさらに明らかにしうることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic

elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy.

Intervirology. 2010;53(1):66-9.

2. Maekawa S, Enomoto N. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. J Gastroenterol.

2009;44(10):1009-15.

3. Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N.

Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model.

Biosystems. 2010 Jan;99(1):70-8.

4. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y,

Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T,

Tsuchiya K, Watanabe M. Two flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication. Hepatol Res. 2009

Jan;39(1):60-9.

2. 学会発表

1. 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. ワークショップ 3 : HCV ゲノム多型は抗ウイルス治療効果を規定する. 第 45 回日本肝臓学会総会. 神戸.平成 21 年 6 月 4 日 - 6 月 5 日.

2. 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. シンポジウム 7: 肝炎の進行と治療感受性を規定するウイルス領域の包括的検討. 第 13 回日本肝臓学会大会. 京都.平成 21 年 10 月 14 日 - 10 月 16 日.

3. 門倉信、雨宮史武、北村敬利、植竹智義、井上泰輔、坂本穰、前川伸哉、岡田俊一、榎本信幸. ポスター: HCV 全長ゲノム解析による Genotype-2a 型 HCV における治療効果規定領域の検索. 第 13 回日本肝臓学会大

会. 京都. 平成 21 年 10 月 14 日 - 10 月 16 日.

4. 末木良太、前川伸哉、門倉信、三浦美香、金山明日香、宮崎千賀子、大森高子、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. ポスター: LAM 耐性に関する治療前 HBV ゲノム領域の検討. 第 13 回 日本肝臓学会大会. 京都.平成 21 年 10 月 14 日 - 10 月 16 日.

4. 雨宮史武、前川伸哉、金山明日香、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. ポスター: 脂質合成阻害薬の抗 HCV 効果~genotype による効果の比較~第 13 回日本肝臓学会大会. 京都.平成 21 年 10 月 14 日 - 10 月 16 日.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

倫理面への配慮

山梨大学倫理委員会の承認のもと、すべての患者より同意を得た上で、患者の個人的遺伝情報とは直接関連のない HCV ゲノム配列の決定を各症例の血清を用いて行っている。また各症例の血清は山梨大学において連結可能匿名化を行っている。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書（平成21年度）
ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

HCV 感染細胞からの選択的なウイルス排除システムの開発

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：IFNの転写因子であるIRF3及びIRF7のdominant-active変異体を、レプリコン細胞やJFH-1ウイルス感染細胞に導入するとウイルスの複製が抑制された。また、HCVのプロテアーゼ認識配列と小胞体残留シグナル配列を付加したキメラコンストラクトは、HCVプロテアーゼの発現により特異的に活性化され、HCV複製細胞でのみIFN活性を誘導できることが示された。さらに、HCVの複製に対して、抑制因子として機能するVAP-Cにおいても、本システムの応用が可能である事が示された。HCV感染特異的にIFNやHCVの複製抑制因子を発現させることにより、感染細胞の急激な排除や過剰な免疫反応の誘導に伴う劇症化を回避して、HCVを排除できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCVに感染すると高率に慢性化し、肝硬変を経て肝細胞癌を発症する。我が国には2百万人ものHCV感染者が存在すると推定され、感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。ペグ化IFNとリバビリンの併用により治療効果に改善が認められているが、遺伝子型1b型の高ウイルス価の患者に対する著効率は50%程度であり、正常細胞への負荷や免疫系への過剰反応等の副作用が大きな問題となっている。本研究では、HCVに感染した細胞特異的にIFNやHCV複製抑制因子を発現誘導し、細胞に与える負担をできる限り軽減させて、HCVを排除可能なシステムの確立を目的とする。

B. 研究方法

IFN誘導転写因子であるIRF3とIRF7のdominant-active変異体である、IRF3 5D(C末端の5カ所のセリン残基をアスパラギン酸に置換)及びdIRF7(抑制領域欠損変異体)による抗HCV活性の影響を、HCVレプリコン細胞とJFH-1ウイルス感染細胞において検討した。また、昨年度同様に、HCVプロテアーゼ認識配列とER残留シグナルを付加したキメラdIRF7を作製し(cIRF7)、抗HCV活性を検討した。cIRF7の発現制御の特異性は、HCV複製阻害剤(プロテアーゼ阻害剤やサイクロスポリンAなど)、お

よび、他のフラビウイルス由来のプロテアーゼの発現にて評価した。我々は、これまでに、VAP-Cが、HCVの複製に必須な宿主因子であるVAP-A/BのNS5A及びNS5Bへの結合を干渉し、HCVの複製を負に制御することを報告している。そこで、VAP-Cのキメラコンストラクトも同様に構築し、抗HCV活性を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

昨年度までは、IRF7のN末端領域(DNA結合ドメイン及び転写活性化領域)にて構成されるIRF7 dominant-active変異体(MR3)を作製し、HCV複製細胞やヒト肝臓移植キメラマウスにおいて抗HCV活性を誘導できる事を報告した。本年度に検討したIRF3 5D及びdIRF7は、野生型のIRFや従来のMR3よりも高いIFNの転写活性化の誘導と抗HCV活性を示した。cIRF7は、HCVプロ

テアーゼ活性特異的に IFN を誘導できる事が、プロテアーゼ阻害剤の添加や他のウイルスプロテアーゼとの共発現の実験から示された。また、cIRF7 は、HCV レプリコン(Con1 株)や JFH-1 ウイルス感染細胞のみならず、IFN に強い耐性を示す HCV レプリコン(4BR)に対しても十分な抗 HCV 活性を示した。また、VAP-C においても HCV 感染細胞特異的な発現制御法の応用が可能であり、*in vitro* において高い抗 HCV 活性が確認された。

D. 考察

ペグ化 IFN とリバビリンの併用療法をもってしても、難知性の 1b 型では著効率が 5-6 割程度である事が問題とされている。さらに、HCV はその巧妙な免疫回避機構により IFN のシグナル経路に干渉する事が知られている。本研究より、HCV 感染細胞特異的に IFN シグナルを誘導させることにより、正常細胞に負荷をかけることなく、ウイルスの排除の可能性が示唆された。さらに、IFN に抵抗性を示す HCV レプリコン細胞においても、ウイルスの複製を抑制できることから、難治性の C 型肝炎患者においてもウイルスを排除できる可能性が示唆された。また、HCV の複製を抑制する VAP-C との併用により、相乗的な治療効果も期待される。

E. 結論

- 1 IRF3 5D 及び dIRF7 は、従来の IRF7 dominant active 変異体である MR3 よりも、高い IFN の誘導と抗 HCV 活性を示した。
- 2 HCV のプロテアーゼ認識配列と小胞体残留シグナルを付加した、cIRF7 は、HCV 複製細胞内で特異的に IFN を誘導し、抗 HCV 活性を示した。
- 3 IFN 抵抗性 HCV レプリコン細胞においても、cIRF7 はウイルスの複製を抑制した。
- 4 HCV 複製の抑制宿主因子である VAP-C も、本発現系システムの応用が可能であり、高い抗 HCV 活性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 10427-10436 (2009).
- 2 Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng H.R., Yoshimura M., Unno H., Shima R., Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., and Matsuura Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 12986-12991 (2009).
- 3 Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7959-7969 (2009).
- 4 Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K.J., Kawai T., Akira S., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7629-7640 (2009).
- 5 Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. Moriya K., Miyoshi H., Tsutsumi T., Shinzawa S., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Moriishi K., Matsuura Y., Suzuki T., Miyamura T., Koike K. *Am. J. Pathol.* 175, 1515-1524 (2009).
- 6 Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. Hara H., Aizaki H., Matsuda M., Shinkai-Ouchi F., Inoue Y., Murakami K., Shoji I., Kawakami H., Matsuura Y., Lai M.M., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 5137-5147 (2009).
- 7 Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M., Ishii K., Shoji I., Wakita T., Miyamura T., Matsuura Y., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 2389-2392 (2009).
- 8 Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. Mori K., Amano M., Takefuji M., Kato K., Morita Y., Nishioka T., Matsuura Y., Murohara T., Kaibuchi K. *J. Biol. Chem.*, 284, 5067-5076 (2009).
- 9 Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. Noritake J., Fukata Y., Iwanaga T.,

Hosomi N., Tsutsumi R., Matsuda N., Tani H., Iwanari H., Mochizuki Y., Kodama T., Matsuura Y., Bredt D.S., Hamakubo T., Fukata M. *J. Cell Biol.*, 186, 147-160 (2009).

2. 学会発表

- 1 森石恆司、勝二郁夫、鈴木亮介、鈴木哲朗、松浦善治: HCV コア蛋白質のプロテアソームによる分解とウイルス産生制御: 第57回日本ウイルス学会総会、東京、10月25日-27日、2009.
- 2 谷 英樹、塩川 舞、寒原裕登、要 祐喜、森 嘉生、森石恆司、松浦善治: 日本脳炎ウイルスの感染における脂質セラミドの役割、同上。
- 3 福原崇介、谷 英樹、塩川 舞、森石恆司、前原喜彦、松浦善治: 患者血清由来HCVの細胞内導入法、同上。
- 4 寒原裕登、田鋏修平、藤田尚信、森 嘉生、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: HCVの増殖とオートファジー、同上。
- 5 片岡周子、要 祐喜、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルスの細胞侵入機構の解析、同上。
- 6 要 祐喜、片岡周子、阿部隆之、森石恆司、谷 英樹、松浦善治: バキュロウイルス gp64 蛋白質の補体抵抗性獲得機構、同上。
- 7 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治: ヒアルロン酸による炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生とC型肝炎の慢性化、同上。
- 8 鈴木亮介、斎藤憲司、安東友美、石井孝司、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: C型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 系を用いた NS2 蛋白質の感染性粒子形成における機能解析、同上。
- 9 相崎英樹、後藤耕司、山本真民、佐藤滋子、高橋信弘、深澤征義、花田賢太郎、松浦善治、宮村達男、脇田隆字、鈴木哲朗: HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、同上。
- 10 田鋏修平、寒原裕登、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C型肝炎ウイルスの感染におけるオートファジーの意義: 第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日-12日、2009.
- 11 松浦善治: バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入: 第82回日本生化学会大会、神戸、10月21日-24日、2009.
- 12 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Viral elimination by a selective expression of IRF7 in human hepatocytes infected with HCV. 第15回日本遺伝子治療学会、大阪、6月10日-12日、2009.
- 13 Yoshio Mori, Tetsuo Yamashita, Naoyuki Miyazaki, Masato Yoshimura, Hideaki Unno, Kohji Moriishi, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, R. Holland Cheng, Tomitake Tsukihara, and Yoshiharu Matsuura: Structure-based analysis of hepatitis E virus-like particle. The American Society for Virology, 28th Annual Meeting, The University of British Columbia, Vancouver, July 11-15, 2009.
- 14 Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human butyrate-induced transcript 1 interacts with both HCV NS5A and Hsp90 and regulates replication of hepatitis C virus. 同上。
- 15 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: Hyaluronan participates in the IP-10 induction in cells infected with HCV through an engagement of TLR2 and CD44, 16th International Meeting on HCV and Related Viruses. Nice, October 3-7, 2009.
- 16 Xiaoyu Wen, Takayuki Abe, Shyuhei Taguwa, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Suppression of HCV replication in hepatocytes through a selective induction of IRF7. 同上。
- 17 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma- and E6AP-dependent degradation of HCV core protein in the viral production. 同上。
- 18 Ryosuke Suzuki, Kenji Saito, Tomomi Ando, Koji Ishii, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Plasmid-based production of *trans*-complemented HCV particles: its use for functional analysis of NS2. 同上。
- 19 Hideki Aizaki, Mami Yamamoto, Koji Goto, Masayoshi Fukasawa, Kentaro Hanada, Shigeko Sato, Nobuhiro Takahashi, Yoshiharu Matsuura, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki: Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV replication. 同上。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたウイルス排除機構の解析

研究分担者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

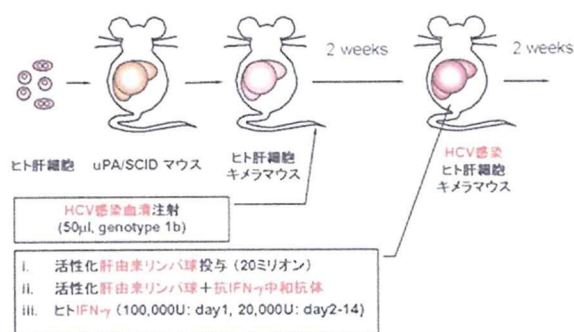
研究要旨 一般にウイルスが感染するとnatural killer (NK)細胞の非特異的応答によりウイルスは排除される。しかし、C型肝炎ウイルス(HCV)感染ではHCVのE2蛋白とNK細胞上のCD81分子の結合によってNK細胞機能が抑制され、高頻度に持続感染に移行する。我々は、NK細胞とNKT細胞をIL-2/抗CD3抗体存在下で培養した場合、CD81を介した抑制機構に抵抗性を示し、HCV複製抑制効果を誘導し得ることを確認した。そこで、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスにヒト活性化NK/NKT細胞を移入すると、血中HCV RNAは消失した。HCVがE2蛋白/CD81結合によって自然免疫応答を巧妙に回避し持続感染に移行する機構を断ち切る活性化NK/NKT細胞移入療法は、HCV肝炎の再発予防・根治療法となりうる可能性がある。

A. 研究目的

自然免疫応答を司る Natural Killer (NK)細胞・NKT細胞は、末梢血と比較して肝臓内には豊富に含まれていること、肝由来NK細胞はIL-2で刺激培養すると抗腫瘍分子TRAIL(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)の発現やIFN- γ の産生が末梢血由来NKに比べ有意に強く促進されることを我々は確認している。本研究では、肝由来活性化リンパ球の抗HCV機構を解析した。

B. 研究方法

肝由来リンパ球をHCVレプリコン細胞と共培養して抗HCV効果を検討した。抗CD81抗体をコートしたプレートで同様の実験をし、CD81クロスリンクによる影響を検討した。HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスにヒト肝由来リンパ球を移入して免疫細胞移入による抗HCV効果を検討した(図1)。



C. 研究結果

抗CD81抗体をコートしたプレートを用いてみ刺激肝由来リンパ球をHCVレプリコン細胞と共培養した場合、抗HCV効果は有意減弱した。しかし、IL-2刺激肝リンパ球の抗HCV効果には影響しなかった。また、CD56陽性細胞群(NK・NKT細胞)がCD56陰性細胞群よりも有意に抗HCV効果を有していた。肝由来リンパ球はIL-2/OKT3で刺激培養するとHCVウイルス抑制作用が増加することが確認され(図2)、その作用は、IFN- γ 中和抗体存在下で減弱することが確

認できた。

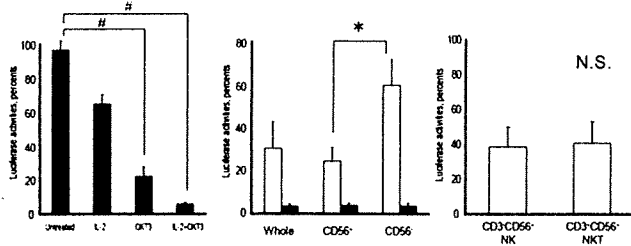


図2. 肝由来リンパ球をHCVレプリコン細胞と共培養実験。(左) IL-2とOKT3刺激により肝リンパ球に抗HCV効果を誘導可能。IL-2 (100 JRU/mL)とOKT3 (1 μ g/mL)の存在下で3日間共培養。#P < 0.01。(中) CD56+細胞(NK/NKT細胞)が強い抗HCV効果を持つ。Magnetic cell sortingでCD56+細胞とCD56-細胞を分離。(IL-2刺激:white columns, IL-2+OKT3刺激:black columns)。*P < 0.05 for CD56+細胞 vs. CD56-細胞。(右) IL-2刺激後のNK細胞とNKT細胞の抗HCV効果は同等。データはmean \pm SEM (n = 6)で表した。

HCV 持続感染ヒト肝細胞キメラマウスにIL-2/OKT3 刺激肝由来リンパ球を投与すると、キメラマウスへのHCV 感染を有意に抑制可能であった(図3)。さらに、IFN- γ 中和抗体存在下では抗HCV 効果が減弱したことからIFN- γ 依存性にHCV 感染を抑制していることが示唆された。

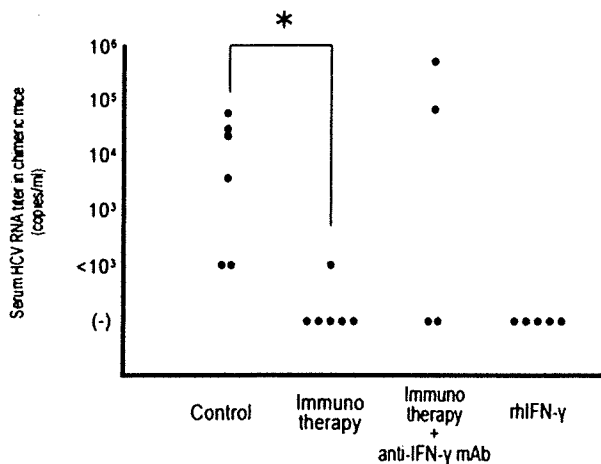


図3. ヒト肝由来リンパ球(20 \times 10⁶ cells/マウス)を移入したHCV持続感染(genotype 1b)ヒト肝細胞キメラマウスの血中HCV RNA量。HCV感染血清投与2週間後にIL-2/OKT3処理肝リンパ球を移入。さらに抗IFN- γ 抗体を添加した実験群と recombinant human IFN- γ を投与した実験群を設定した。リンパ球移入2週間後に血中HCV RNA量を測定。*P < 0.01。

さらに、抗HCV 効果が確認されているサイクロスポリン (100ng/ml) 存在下で、この肝来活性化CD56 陽性リンパ球群をHCV レプリコン細胞と共培養を行った。サイクロスポリン存在下においても、末梢血由来活性化CD56 陽性リンパ球の抗HCV 活性は損なわれず、むしろ増強した。

D. 考察

HCV 性肝硬変は国内外において肝移植の最も頻度の高い適応疾患の一つであるが、移植後HCV 肝炎の再発が高率に起こり、また肝炎の進行も移植患者以外と比較すると急速である。免疫抑制療法がHCV の増勢を助長するためと理解されているため、患者個々の免疫状態を把握して必要最低限の免疫抑制療法を実践することが重要と考えられる。我々は、細胞質染色とフローサイトメトリーを応用したmixed lymphocyte reaction assay (MLR と略す) を免疫監視法として臨床導入している。その結果、HCV RNA 量がMLR で定量化した抗ドナー免疫応答と逆相関するが、抗サードパーティ応答との間には相関を認めないことを初めて見出した。この興味深い現象は、アロ免疫と抗HCV 免疫との間にクロストークが存在することを示唆する。このクロストーク機構を解析した結果、アロ応答CD4+T 細胞から産生されるIL-2 により、肝内在の(NK)/NKT 細胞が活性化し、近傍のHCV 感染肝細胞内でのHCV 複製をIFN- γ 依存性に抑制することが明らかとなった。この新知見に基づき、本研究は、拒絶反応を引き起こすことなくIFN- γ 産生NK/NKT 細胞を肝臓に誘導し、HCV 肝炎の移植後再発を抑止し得る新規免疫細胞療法の可能性を検討した

ものである。

最近我々は、末梢血リンパ球を至適濃度の IL-2/抗 CD3 抗体の存在下で長期培養することで（4 週間）、NK/NKT 細胞が 3000 倍以上に増殖し、80%の純度で回収可能で、IFN- γ 依存性抗 HCV 効果を誘導し得た。これらの研究成果は、本免疫細胞療法が肝臓移植を対象にした患者にとどまらず、慢性 HCV 肝炎や肝硬変患者に対する画期的な抗 HCV 根治療法としての可能性を期待させるもので、今後 IFN- α 、IFN- β や抗ウイルス剤との併用療法への展開も有望である。

E. 結論

IFN- γ 産生活活性化 NK/NKT 細胞の移入療法が、HCV 肝炎や肝硬変に対する新規抗 HCV 根治療法となる可能性が確認できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Ohira, M. Ishifuro, K. Ide, T. Irei, H. Tashiro, T. Itamoto, K. Ito, K. Chayama, T. Asahara, H. Ohdan : Significant correlation between spleen volume and thrombocytopenia in liver transplant patients: A concept for predicting persistent thrombocytopenia. *Liver Transplantation*, 2009, 15(2):208-215
- 2) H. Tahara, Y. Tanaka, K. Ishiyama, K. Ide, M. Shishida, T. Irei, Y. Ushitora, M. Ohira, M. Banshodani, H. Tashiro, T. Itamoto, T. Asahara, M. Imamura, S. Takahashi, K. Chayama, H. Ohdan : Successful hepatitis B vaccination in

liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transpl Int*, 2009, 22(8):805-813

- 3) Y. Ushitora, H. Tashiro, T. Ogawa, Y. Tanimoto, S. Kuroda, T. Kobayashi, Y. Miyata, T. Itamoto, T. Asahara, H. Ohdan: Suppression of hepatocellular carcinoma recurrence after rat liver transplantation by FTY720, a sphingosine-1-phosphate analog. *Transplantation*, 2009, 88(8):980-986
- 4) M. Ohira, K. Ishiyama, Y. Tanaka, M. Doskari, Y. Igarashi, H. Tashiro, N. Hiraga, M. Imamura, N. Sakamoto, K. Chayama, T. Asahara, H. Ohdan: Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(11): 3226-3235
- 5) H. Ohdan: Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. *Clin Pharmacol Ther*, 2010, 87(1):23-6
- 6) M. Banshodani, K. Ishiyama, H. Amano, H. Tashiro, K. Arihiro, T. Itamoto, H. Ohdan: A case of hepatic angiomyolipoma with minimal intratumoral fat content. *Case Report in Gastroenterology*, 2010, in press
- 7) H. Tahara, K. Ide, N. B. Basnet, Y. Tanaka, H. Matsuda, C. Takematsu, Y. Kozutsumi, H. Ohdan: Immunological property of antibodies against N-

glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice.

Journal of Immunology, 2010, in press

8) 大段秀樹, 田中友加, 大平真裕, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田代裕尊, 板本敏行, 茶山一彰, 浅原利正 : C型肝炎肝移植患者のアロ免疫応答とC型肝炎ウイルス量の関係. 今日の移植, 2009, 22 (1) : 9-12

2. 学会発表

1) 田原裕之, 田中友加, 井手健太郎, 伊禮俊充, 大平真裕, 番匠谷将孝, 田代裕尊, 板本敏行, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰, 大段秀樹 : (サージカルフォーラム) 生体肝移植後のB型肝炎ワクチン療法奏功に關与する因子の検討. 第109回日本外科学会定期学術集会, 福岡, 2009. 4. 2-4

2) H. Ohdan, T. Onoe, M. Banshodani : (Symposium) Liver sinusoidal endothelial cells tolerize alloreactive T cells via MHC class II recognition liver transplantation. Joint Conference of the 10th Biannual Cell Transplant Society Congress and the 36th Annual Meeting of Japan Society for Japan Organ Preservation and Medical Biology, Okayama (Japan), 2009. 4. 20-21

3) H. Tahara, H. Ohdan, K. Ide, N. B. Basnet, H. Takematsu, Y. Kozutsumi : (Symposium) N-glycolylneuraminic acid a novel target for rejection in islet xenotransplantation. Joint Conference of the 10th Biannual Cell Transplant Society Congress and the 36th Annual

Meeting of Japan Society for Japan Organ Preservation and Medical Biology, Okayama (Japan), 2009. 4. 20-21

4) M. Ohira, K. Ishiyama, T. Asahara, K. Chayama, H. Ohdan : Adoptive Immunotherapy with Liver Allograft-Derived NK/NKT Cells: A New Paradigm for Inducing Anti-HCV Response after Liver Transplantation. American Transplant Congress 2009, Boston (U. S. A.), 2009. 5. 30-6. 3

5) Y. Tanaka, M. Ohira, H. Ohdan : Reciprocal Interference between the Hepatitis C Viral Load and Alloimmune Responses in Liver Transplant Recipients. American Transplant Congress 2009, Boston (U. S. A.), 2009. 5. 30-6. 3

6) H. Tazawa, T. Irei, Y. Igarashi, H. Tashiro, T. Asahara, H. Ohdan : Successful use of an immunosuppressive regimen aimed at temporally depleting B cells and blocking B-1 cell differentiation in ABO-incompatible liver transplantation. American Transplant Congress 2009, Boston, (U. S. A.), 2009. 5. 30-6. 3

7) M. Doskali, M. Ohira, K. Ishiyama, Y. Tanaka, T. Asahara, K. Chayama, H. Ohdan : Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3+CD56+ Cells for inducing anti-HCC and anti-HCV immune-Activity in liver transplantation recipients. American Transplant Congress 2009, Boston (U. S. A.),

2009. 5. 30-6. 3
- 8) H. Tahara, K. Ide, N. Basnet, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, H. Ohdan: Evidence of cytotoxic antibodies against N-glycolylneuraminic acid Determinants in Xenotransplantation by Using CMAH+ Mice. American Transplant Congress 2009, Boston, (U.S.A.), 2009. 5. 30-6. 3
- 9) N. Basnet, H. Tahara, K. Ide, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, H. Ohdan: Deficiency of N-glycolylneuraminic acid on xenogeneic cells attenuates the cytotoxicity of human natural antibodies. American Transplant Congress 2009, Boston (U.S.A.), 2009. 5. 30-6. 3
- 10) H. Tahara, Y. Tanaka, H. Tashiro, M. Imamura, S. Tahahashi, K. Chayama, H. Ohdan: Successful Hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. American Transplant Congress 2009, Boston (U.S.A.) 2009. 5. 30-6. 3
- 11) M. Banshodani, Y. Igarashi, Y. Tanaka H. Ohdan: Evidence for tolerizing alloreactive T cells by liver sinusoidal endothelial cells in a liver endothelium repopulation in vivo model. American Transplant Congress 2009, Boston (U.S.A.), 2009. 5. 30-6. 3
- 12) T. Irei, H. Ohdan: CD1D Deficiency Abrogates antibody production against blood group carbohydrates but does not impede that against xenogeneic carbohydrate determinants. American Transplant Congress 2009, Boston (U.S.A.), 2009. 5. 30-6. 3
- 13) Y. Igarashi, M. Banshodani, T. Irei, Y. Tanaka, H. Ohdan: Liver sinusoidal endothelial cells tolerize B cells specific for blood group carbohydrate antigens after ABO-incompatible liver transplantation. American Transplant Congress 2009, Boston (U.S.A.), 2009. 5. 30-6. 3
- 14) 田代裕尊, 板本敏行, 大平真裕, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林 剛, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 良雄一郎, 谷本新学, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 浅原利正, 茶山一彰, 大段秀樹: 肝細胞癌に対する生体肝移植の適応拡大と再発予防への取り組み. 第45回日本肝臓学会, 神戸, 2009. 6. 4-5
- 15) 大段秀樹: (ランチョンセミナー) 肝移植の長期予後阻害要因とその対策. 第27回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 16) 田原裕之, 田中友加, 井手健太郎, 伊禮俊充, 大平真裕, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 田代裕尊, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰, 大段秀樹: (シンポジウム) HBV と肝移植を巡る諸問題の解決—肝移植後 HBV ワクチン療法の奏効率向上に向けた工夫—. 第27回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 17) 大平真裕, 石山宏平, Doskari Marlen, 田中友加, 五十嵐友香, 田代裕尊, 板本敏行, 坂本直哉, 平賀伸彦, 今村道雄, 茶山一彰, 大段秀樹: (シンポジウム) C型肝炎に対する肝移植後ドナー肝由来活性化リンパ球移入療法の臨床評価. 第27回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 18) 大段秀樹: (シンポジウム) HBV と肝移

- 植を巡る諸問題の解決-肝移植後 HBV ワクチン療法の奏効率向上に向けた工夫-. 第 27 回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 19) 番匠谷将孝, 尾上隆司, 五十嵐友香, 田中友加, 井手健太郎, 伊禮俊充, 大平真裕, 田原裕之, 田澤宏文, 田代裕尊, 大段秀樹: (シンポジウム) 当院における肝移植後の免疫寛容をめざした試み. -肝類洞内皮細胞の抗原特異的免疫寛容誘導能-. 第 27 回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 20) 田中友加, 井手健太郎, 尾上隆司, 番匠谷将孝, 伊禮俊充, 大平真裕, 田原裕之, Basnet Nabin, 田澤宏文, 天野尋暢, 大下彰彦, 田代裕尊, 大段秀樹: (シンポジウム) 成人間生体肝移植における免疫モニタリングによる operational tolerance の誘導. 第 27 回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 21) Basnet Nabin, 大平真裕, 石風呂実, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 田代裕尊, 堀口 純, 茶山一彰, 大段秀樹: (シンポジウム) A Long-term study of liver transplant patients with thrombocytopenia and splenomegaly. 第 27 回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 22) 伊禮俊充, 田中友加, 五十嵐友香, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 小林 剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹: 血液型不適合肝移植に対する減感作療法が抗体性および細胞性免疫応答へ及ぼす影響. 第 27 回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 23) 田澤宏文, 伊禮俊充, 五十嵐友香, 田中友加, 尾上隆司, 井手健太郎, 田原裕之, 番匠谷将孝, 小林 剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 浅原利正, 大段秀樹: 血液型不適合肝移植への減感作療法が C 型肝炎の術再燃に対して与える影響. 第 27 回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 24) 五十嵐友香, 番匠谷将孝, 伊禮俊充, 田中友加, 大段秀樹: 肝移植後の B 細胞免疫寛容メカニズムの解明と新規免疫寛容誘導法確立へ向けての基礎研究. 第 27 回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 25) Doskari Marlen, 大平真裕, 田中友加, 五十嵐友香, 浅原利正, 茶山一彰, 大段秀樹: Peripheral blood-derived CD3+CD56+cells display anti-HCC and anti-HCV immune-activity. 第 27 回日本肝移植研究会, 静岡, 2009. 7. 10-11
- 26) 田代裕尊, 板本敏行, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林 剛, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 浅原利正, 大段秀樹: (パネルディスカッション) 生体肝移植後の原疾患再発と再発予防への取り組み. 第 64 回日本消化器外科学会総会, 大阪, 2009. 7. 16-18
- 27) 良雄一郎, 板本敏行, 谷本新学, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹, 浅原利正, 石風呂実: (ワークショップ) C 型慢性肝疾患に対する脾臓摘出と合併症、インターフェロン治療の成績について. 第 64 回日本消化器外科学会総会, 大阪, 2009. 7. 16-18
- 28) 天野尋暢, 板本敏行, 田代裕尊, 大下彰彦, 小林 剛, 良雄一郎, 谷本新学, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 大段秀樹: (要望演題) 肝細胞癌術後再発の治療戦略. 第 64 回日本消化器外科学会総会, 大阪, 2009. 7. 16-18
- 29) 小林 剛, 板本敏行, 田澤宏文, 黒田慎太郎, 谷本新学, 良雄一郎, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹: 肝細胞癌脈管侵襲予測因子の解析. 第 64 回日本消化器外科学会総会, 大阪, 2009. 7. 16-18

- 30) M. Banshodani, T. Onoe, Y. Igarashi, Y. Tanaka, K. Ide, T. Irei, M. Ohira, H. Tahara, N. Basnet, M. Doskali, K. Kajitani, H. Tazawa, H. Ohdan: Liver sinusoidal endothelial cells tolerize alloreactive T cells in a liver endothelium repopulation Model. The 14th Congress of the European Society for Organ Transplantation, Paris (France) 2009. 8. 30
- 31) Y. Igarashi, T. Irei, M. Banshodani, Y. Tanaka, H. Ohdan: Liver sinusoidal endothelial cells tolerize B cells specific for blood group carbohydrate antigens after ABO-incompatible liver transplantation. The 14th Congress of the European Society for Organ Transplantation. Paris (France), 2009. 8. 30
- 32) T. Irei, Y. Igarashi, H. Tazawa, K. Ide, Y. Tanaka, M. Ohira, H. Tahara, M. Banshodani, A. Oshita, H. Amano, H. Tashiro, T. Itamoto, T. Asahara, H. Ohdan: A novel concept for immunosuppressive therapy in ABO-incompatible liver transplantation: temporal depletion of B cells combined with B-1 cell differentiation blockade. The 14th Congress of the European Society for Organ Transplantation, Paris (France), 2009. 8. 30
- 33) M. Shishida, T. Onoe, Y. Tanaka, Y. Igarashi, K. Ide, M. Banshodani, T. Asahara, H. Ohdan: Invariant NKT Cells are essential in liver sinusoidal endothelial cell-induced immunosuppression of T cells with indirect allospecificity. The 14th congress of the European Society for Organ Transplantation, Paris (France), 2009. 8. 30
- 34) H. Ohdan: (Invited Lecture) Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes shows anti-HCV activity after liver transplantation. 2009 Transplantation Center & Transplantation Research Institute Joint Symposium, Seoul (Korea), 2009. 9. 12
- 35) 大段秀樹: (シンポジウム) ABO 血液型不適合肝移植の免疫抑制療法. 第 45 回日本移植学会総会, 東京, 2009. 9. 16-18
- 36) 五十嵐友香, 番匠谷将孝, 伊禮俊之, 田中友加, 大段秀樹: (シンポジウム) 血液型不適合肝移植後の B 細胞免疫寛容メカニズム. 第 45 回日本移植学会総会, 東京, 2009. 9. 16-18
- 37) 田中友加, 井手健太郎, 尾上隆司, 番匠谷将孝, 五十嵐友香, Nabin Basnet, 田代裕尊, 大段秀樹: (シンポジウム) 肝の寛容特性に即した成人肝移植後免疫監視下 operational tolerance の誘導. 第 45 回日本移植学会総会, 東京, 2009. 9. 16-18
- 38) 田代裕尊, 天野尋暢, 大下彰彦, 井手健太郎, 尾上隆司, 伊禮俊充, 大平真裕, 田原裕之, 番匠谷将孝, 浅原利正, 大段秀樹: (シンポジウム) 生体肝移植後の原疾患再発予防. 第 45 回日本移植学会総会, 東京, 2009. 9. 16-18
- 39) 番匠谷将孝, 尾上隆司, 五十嵐友香, 田中友加, 井手健太郎, 伊禮俊充, 大平真裕, 田原裕之, 田代裕尊, 大段秀樹: 肝類洞内皮細胞の抗原特異的免疫寛容誘導能-in vivo モデル