

プシドはジスルフィド結合型二量体コアタンパク質から構成されており、このジスルフィド結合を阻害し、二量体化を阻害する薬剤が得られれば、効率良く HCV の粒子産生を阻害するこれまでに例のない抗 HCV 薬となる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文

1) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. J.Virol., 84(18), 9118-9127, 2010

2. 学会発表

1) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

2) Yue Qi, Hussein H. Aly, Chieko Tsutsui, Takashi Fujita, Makoto Hijikata: IRF7 dependent IFN-alpha response in the early phase of the viral infected hepatocytes. 17th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Yokohama, Japan, Sept 10-14 2010

3) Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: The hepatitis C virus particle requires a disulfide-bonded dimer of the core protein. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010

4) Yuichi Abe, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: Chemical biological analysis for a mechanism of infectious HCV particle production. The Association of Pacific Rim University, Research symposium on Interface between Molecular Biology and Nano Biology, Kyoto, Japan, Nov. 24-26 2010

5) 久島透嘉、脇田隆字、土方誠: Core による S-S 結合型二量体は C 型肝炎ウイルスの粒子形成に必須である、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010

6) 阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠: 感染性 HCV 粒子産生に関わる新規細胞内シグナル経路の探索、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010

7) 土方誠、阿部雄一、アリ・ハッサン・フセイン、齊月、脇田隆字、下遠野邦忠、土方誠: シンポジウム 06 ウイルス培養系を用いた C 型肝炎ウイルスの性状と病原性の解明、臨床分離 HCV 株の培養と性状、第 58 回日本ウイルス学会学術総会、平成 22 年 11 月 7-9 日、徳島 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

プロスタグランジン I₂ のアゴニストを含む、C 型肝炎ウイルスの感染抑制剤、発明者 土方誠、阿部雄一、脇田隆字、出願日 2010 年 9 月 30 日、出願番号 特願 2010-222045

2. 実用新案登録 特になし。

3. その他 特になし。

血中滞留型インターフェロン- γ 発現ベクターの開発
分担研究者 高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨 培養細胞の系において、インターフェロン- γ (IFN- γ) を用いることでIFN- α と同等の抗HCV効果を得られることを既に報告している。また、*in vivo*において持続的にIFN- γ を発現させることが可能なIFN- γ 発現plasmid DNA (pDNA)の開発についても成功している。そこで、このIFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入することによる抗HCV効果を、IFN- α 抵抗性HCVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスにおいて検討した。その結果、IFN- γ 発現pDNAの投与によりヒト肝細胞キメラマウスに遺伝子導入可能であり、投与されたマウスの血中にヒトIFN- γ の産生が認められた。また、ヒトIFN- γ の発現が認められたマウスにおいては、強い抗HCV効果が認められ、遺伝子導入一週間後には血清中HCV RNA量は検出限界以下となり、その後も検出されなかった。併せて、IFN- γ の効果の増強を目的に、マウスIFN- γ とアルブミン親和性ペプチド(albumin binding peptide; ABP)との融合タンパク質を設計し、発現pDNAを構築することで血中滞留性の改善を試みた。その結果、融合タンパクは血中における平均滞留時間が有意に延長したことから、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

これまでに持続的なIFN- γ 遺伝子発現が可能であるpDNAの開発に成功し、持続的にIFN- γ を発現させることにより、短期間のIFN- γ 遺伝子発現で治療効果を得られなかった慢性疾患、アトピー性皮膚炎モデルマウスにおいて優れた治療効果が得られることを報告している。その抗HCV効果については、IFN- γ はIFN- α と培養細胞の系において同等の抗HCV効果を示すことを明らかとしているが、*in vivo*での抗HCV効果については検討されていない。そこで本研究ではHCV感染キメラマウスを用いて、持続的なIFN- γ 遺伝子発現のC型肝炎に対する*in vivo*における治療有効性の検討を行うこととした。

また、IFN- γ 遺伝子治療に基づく治療抵抗性肝炎治療効果を向上するために、血中滞

留型IFN- γ 発現pDNAの開発を行った。これまでにマウスIFN- γ をmouse serum albumin (MSA)との融合タンパク質において血中滞留性が大幅に改善可能であることを報告しているが、MSAとの融合化による立体障害による受容体との親和性の低下に起因すると考えられるIFNの生物活性が天然型と比較して100分の1以下に低下することが明らかとなった。そこで、高分子量のMSAを直接IFN- γ と融合させるのではなく、MSAとの親和性を有する低分子量のペプチド (albumin binding peptide: ABP) をIFN- γ に融合させることでMSAとの融合タンパク化と同等の血中滞留性を得るとともに生物活性の低下を可能ではないかと考えた。このIFN- γ 融合タンパク質の生物活性などの機能・性質を培養細胞において評価した後、

そのIFN- γ 融合タンパク発現pDNAを遺伝子導入したマウスにおいてIFN- γ の血中滞留性の改善と治療上の有効性の評価を試みることとした。

B. 研究方法

1. 持続型IFN- γ 発現pDNAを用いた抗HCV効果の検討

pDNA：持続的な遺伝子発現が可能であるpDNA骨格(pCpG-mcs: InvivoGen)にヒトIFN- γ cDNAを挿入したpCpG-huIFN- γ を用いた。培養細胞：ジシストロニックにホタルルシフェラーゼを発現するHCVサブゲノミックレプリコンLucneo#2細胞を用いた。抗HCV効果については処置後のルシフェラーゼ活性を測定することでHCV量の指標とした。ヒト肝細胞キメラマウス：uPA-SCIDマウスにヒト肝細胞を移植することで作製した中置換キメラマウスを用いた。血中ヒト血清アルブミン濃度を測定することでヒト肝細胞数を評価した。HCV感染モデル：中置換キメラマウスにI型IFN抵抗性を示すHCV genotype1bを感染させることで治療抵抗性C型肝炎モデルマウスを作製した。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とIFN- γ 発現量の評価：naked pDNAをマウス体重の約15%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。得られる遺伝子発現については血中IFN- γ 濃度をELISA法を用いて測定することで評価した。抗HCV効果の評価：経時的にマウス尾静脈より採血し、real-time PCR法にて血中HCV RNA量を測定した。

2. 新規血中滞留型IFN- γ 発現pDNAの構築

pDNA：マウスIFN- γ のC末端、あるいはN末端にABPを連結した融合タンパクをコードする遺伝子をpcDNA3.1に組み込みpCMV-IFN γ -ABPあるいはpCMV-ABP-IFN γ 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：各種IFN- γ 融合タンパク質の分子量についてはウェスタンブロッティング法を用いて評価した。生物活性についてはIFN- γ 活性依存的にルシフェラーゼを発現するpDNAを利用したレポーターアッセイ法を用いて評価した。アルブミン親和性の評価にはMSAをコートしたプレートに各種IFN- γ を添加した後、結合したIFN- γ 量をELISA法により評価した。マウスおよび遺伝子導入法：ICR雄性マウス（4週齢）およびbalb/c雄性マウス（7週齢）を用いた。遺伝子導入法としてハイドロダイナミクス法を用いた。血中滞留性および抗腫瘍効果の評価：ICRマウスへ遺伝子導入後に、経時的に血中IFN- γ をELISA法により測定することで血中滞留性の評価を行った。balb/c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を評価した。

C. 研究結果

本研究では、まずこれまでに開発に成功した、長期にわたり高濃度で持続的な遺伝子発現可能なIFN- γ 発現pDNAのI型IFN抵抗性C型肝炎に対する治療有効性を評価した。サブゲノミックレプリコン細胞へ遺伝子導

入後、抗HCV効果を評価したところ、遺伝子導入24時間後IFN- γ 発現pDNA導入群はmock群の約40%に、36時間後では数%にまでHCV数を減少させることが可能であった。そこで、IFN- α 抵抗性HCV感染キメラマウスを用いて持続的なIFN- γ 遺伝子発現のC型肝炎治療における有効性を評価した。その結果、遺伝子導入3日後よりウイルス価の減少が認められ、7日後以降は検出限界以下となることが明らかとなり、持続的にヒトIFN- γ を作用させることがIFN- α 抵抗性C型肝炎の治療に非常に有効であることが示された。また、血清中ヒトIFN- γ 濃度が1000pg/mLと低い濃度で抗HCV効果が得られることが明らかとなった。しかしながら、ヒトIFN- γ 遺伝子導入前後で血中ヒトアルブミン濃度が遺伝子投与前と比較して1/2~1/5まで低下することが観察された。このような現象は、対照群では確認されなかったため、高濃度のヒトIFN- γ を暴露することでヒト肝細胞の機能が低下した、あるいはヒト肝細胞数が減少してした可能性を示すものと考えられる。

次に、新たに構築したpCMV-IFN- γ -ABPおよびpCMV-ABP-IFN- γ の有用性を評価した。各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。その結果、デザイン通りの分子量の融合タンパク質が産生されることを確認した。また、ABP融合IFN- γ は天然型IFN- γ と比較して約半分程度の活性を保持することが明らかとなった。アルブミン親和性の評価を評価した結果、天然型IFN- γ はMSAにほとんど親和性を示さないのに対し、ABP融合IFN- γ はMSAへの結合能

を有することが確認できた。

次に、各ABP融合IFN- γ 発現pDNAを遺伝子導入した場合の血中滞留性を評価するために、ハイドロダイナミクス法を用いてICRマウスに遺伝子導入し、血中IFN- γ 濃度推移を解析した。その結果、ABP融合IFN- γ 遺伝子導入群のAUCは天然型IFN- γ 遺伝子導入群と比較して著しく増大した。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る抗腫瘍効果を評価した。その結果、ABP融合IFN- γ 発現pDNA投与群では天然型IFN- γ 発現pDNA投与群より高い抗腫瘍効果が得られ、未処置群の約50%まで肺転移を抑制した。

D. 考察

IFN- γ は、HCVサブゲノミックレプリコンを用いた培養細胞の系、チンパンジーを用いた動物モデルでI型IFNと同等あるいはそれを上回る抗HCV効果が得られておりC型肝炎治療への有用性が期待されている。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、持続作用型IFN- γ 発現pDNAの有用性をHCV感染キメラマウスで検討した。また、血中滞留型IFN- γ の開発によるIFN- γ の薬理作用増強を試みた。

その結果、持続的にIFN- γ を発現することで高い抗HCV効果が得られることが明らかとなった一方、肝細胞への有害作用も認められた。血清中ヒトIFN- γ 濃度が

1000pg/mLと低い濃度でも抗HCV効果が得られたこと、およびこのマウスにおいてはヒトアルブミン濃度の低下の程度が低かったことから、投与量を最適化することでこの有害作用を減弱しつつ抗HCV効果を得ることが可能であると推察される。また、IFN- γ の体内動態制御による、治療効果の改善と有害作用の回避も望まれる。また、血中滞留性の改善を目的として、ABPとの融合タンパク質を新たに設計、評価したところ、MSAとの融合タンパク質で確認されたような劇的なIFN- γ 活性の低下を回避することができ、IFN- γ の血中滞留性を大幅に改善できることが明らかとなった。

E. 結論

IFN- γ 長期発現pDNAの投与により、高い抗HCV効果が得られることが明らかとなった。併せてヒト肝細胞への有害作用の可能性も示唆されたことから安全性の確保に向けた検討が必要であることも示された。また、IFN- γ をABPとの融合タンパク質に改変することでIFN- γ の生物活性を保持しつつ血中滞留性が向上できることが明らかとなった。以上の結果より、本研究で開発した持続作用型IFN- γ 発現pDNA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. Zang L, Nishikawa M, Machida K, Ando M, Takahashi Y, Watanabe Y, and Takakura Y. Inhibition of nuclear delivery of plasmid DNA and transcription by interferon γ : hurdles to be overcome for sustained gene therapy. *Gene Ther.* 2011, in press.
2. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Prolonged circulation half-life of interferon γ activity by gene delivery of interferon γ -serum albumin fusion protein in mice. *J Pharm Sci.* 2011, in press.
3. Takiguchi N, Takahashi Y, Nishikawa M, Matsui Y, Fukuhara Y, Oushiki D, Kiyose K, Hanaoka K, Nagano T, Takakura Y. Positive correlation between the generation of reactive oxygen species and activation/reactivation of transgene expression after hydrodynamic injection into mice. *Pharm Res.* 2011, in press.
4. Takahashi Y, Vikman E, Nishikawa M, Ando M, Watanabe Y, Takakura Y. Persistent interferon transgene expression by RNA interference-mediated silencing of interferon receptors. *J Gene Med*; 12(9), 739-746 (2010)
5. 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 IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. *J Immunol*; 184(5), 2729-2735 (2010)

6. Guan X, Nishikawa M, Takemoto S, Ohno Y, Yata T, Takakura Y. Injection site-dependent induction of immune response by DNA vaccine: comparison of skin and spleen as a target for vaccination. *J Gene Med*; 12(3), 301-309 (2010)
 7. Yamaoka A, Guan X, Takemoto S, Nishikawa M, Takakura Y. Development of a novel Hsp70-based DNA vaccine as a multifunctional antigen delivery system. *J Control Release*; 142(3), 411-415 (2010).
2. 学会発表
1. Kayoko Hattori, Makiya Nishikawa, Kanitta Watcharanurak, Akihiko Ikoma, Kenji Kabashima, Hiroyasu Toyota, Yuki Takahashi, Rei Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura. “Prevention of atopic dermatitis by plasmid-based sustained transgene expression of interferon γ in NC/Nga mice” American Society of Gene & Cell Therapy 13th Annual Meeting (Washington DC, USA), May 19-22 (2010)
 2. 臧蕾、西川元也、町田一哉、高橋有己、高倉喜信 “インターフェロン- γ による外来性遺伝子発現抑制機構の解明” 日本薬剤学会第25年会、徳島、2010年5月
 3. 宮川典子、西川元也、高橋有己、渡部好彦、高倉喜信 “体内動態制御型インターフェロン誘導体の設計およびその遺伝子導入による疾患治療システムの開発” 日本薬剤学会第25年会、徳島、2010年5月
 4. 毛利浩太、松岡奈穂、西川元也、高橋有己、高倉喜信 “多足型構造を形成するDNA-POLYPODNA-の開発” 日本薬剤学会第25年会、徳島、2010年5月
 5. 宇野翔大、豊田敬康、西川元也、Sakulrat Rattanakit、椛島健治、高橋 玲、高橋有己、高倉喜信 “コレステロール修飾を利用したCpG オリゴデオキシヌクレオチドの皮膚デリバリー改善によるアトピー性皮膚炎の治療” 日本薬剤学会第25年会、徳島、2010年5月
 6. Kanitta Watcharanurak, Kayoko Hattori, Makiya Nishikawa, Akihiko Ikoma, Kenji Kabashima, Hiroyasu Toyota, Yuki Takahashi, Rei Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura “Improvement of atopic dermatitis by sustained exogenous expression of murine interferon γ in NC/Nga mice via Th1 polarization” 第26回日本DDS学会学術集会、大阪、2010年6月
 7. 清田豪志、高橋有己、西川元也、高倉喜信 “インターフェロン γ 癌遺伝子治療効果増強のための腫瘍関連マクロファージの除去” 第26回日本DDS学会学術集会、大阪、2010年6月
 8. 安藤 満、高橋有己、西川元也、渡部好彦、高倉喜信 “IFN- γ 遺伝子治療システム開発に向けた遺伝子発現プロファイルの制御” 第9回次世代を担う若手フォーラム・バイオフィオーラム2010、京都、2010年10月
 9. Lei Zang, Makiya Nishikawa, Kazuya Machida, Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura “Interferon

10. γ -mediated inhibition of nuclear entry of plasmid vector and mRNA transcription from the vector: an obstacle for repeated injections of interferon γ -expressing plasmid vector” Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 (New Orleans, USA), November 14-18 (2010)
11. Noriko Miyakawa, Makiya Nishikawa, Yuki Takahashi, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura “Design and gene delivery of mouse interferon γ genetically fused with mouse serum albumin” Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 (New Orleans, USA), November 14-18 (2010)
12. Mitsuru Ando, Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Hanae Mukumoto, Yoshihiko Watanabe, Yoshinobu Takakura “Design and gene delivery of ‘sticky’ interferon γ to increase the effect/side-effect ratio for liver-directed interferon- γ gene therapy” Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 (New Orleans, USA), November 14-18 (2010)

H. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

（分担）研究報告書（平成22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

肝炎の進展、癌化と関連するC型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索

研究分担者 前川 伸哉

山梨大学医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：C型慢性肝炎における病態は多様であり、この機序にウイルスあるいは宿主因子がどのように関与するのか十分に明らかとなっていない。本研究においては肝炎の進行あるいは肝発癌に関連するウイルス側因子の関与を明らかにすることを目的として、HCV全翻訳領域の解析を行い肝発癌に関連するウイルス遺伝子領域を明らかにするとともに、IL28B SNPと肝発癌の関連について検討を行い、これらの因子と肝発癌の関連について検討した。その結果、肝病期の進行や肝発癌には、HCVコア aa 70変異とその経時的変化が関与しており、IL28B SNPと密接に関連しながら病態を形成していることが明らかとなった。

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

病態の関連は従来インターフェロン治療反応性への関与について検討されているものの、肝発癌との関連は十分明らかとなっていない。一方、近年宿主側因子としてIL28B SNPがインターフェロン治療効果を規定することが示されたが、やはり肝発癌との関連は不明である。本研究ではHCV全翻訳領域解析を行い、肝発癌に関連するウイルス遺伝子領域を明らかにするとともに、IL28Bと肝発癌の関連について検討した。

A. 研究背景・目的

ヒト肝細胞キメラマウスは、臨床的に認められる多様なHCV遺伝子変異の意義を直接的に実験動物において検証可能な画期的システムである。我々はハイスループットのHCV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HCV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C型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。

H22年度は、HCV感染と発癌におけるウイルス及びIL28B多型の関与について検討を行った。すなわち肝発癌のハイリスクであるHCVは変異に富むが、ウイルス変異と肝

B. 研究方法（2010年度）

(1) 長期経過観察が可能であったgenotype1bインターフェロン無効症例43例（HCC群20例、非HCC群23例）を対象とした。全例についてインターフェロン開始前と観察終了時（HCC群の肝癌発症時）の各症例2時点のHCV全アミノ酸配列を決定、経時的変化を検討した。(2) 検証群 232症例（HCC群65例、非HCC群167例）を用いてコアとNS5A

領域の配列を検討した。(3)長期経過観察が可能であった 98 例についてコア領域の経時変化を検討した。(4)また、228 例については IL28B SNP を検討した。

C. 研究成果

(1)HCC 群と非 HCC 群の経時変化(平均観察期間 HCC 群 10.9 年、非 HCC 群 11.1 年)を全長で比較すると、HCC 群では最も高率に変化していたのは、コア領域の aa 70(20 例中 4 例で R→Q)と NS5A-ISDR aa 2220 を含む 3 アミノ酸であった。

(2)新たな 230 例における検討において、コア aa 70Q/H は 70R に比して HCC 群で有意に高率であった(Q/H:R, HCC 群 43:22 vs. 非 HCC 群 66:99, $p=0.001$)。また、慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと病期が進行するにつれてコア aa Q/H は R に比較して高率となった。

(3)コア aa 70 の経時変化では HCC 群では R70Q への変化を 17%認めた。これに対し、non-HCC 群にのみ Q70R を 6%に認めた。経時変化別に背景因子を比較すると、R70Q 群では Q70Q 群と同様に経時的に PLT、Alb 値で有意に低下を認めたのに対し、Q70R 群では R70R 群と同様に経時的に肝病態の悪化は認めなかった。

(4)IL28B SNP の解析を行った 228 例の検討では 162 例(71%)が TT で 66 例(29%)が GG/TG であった。IL28B SNP とコア aa 70 の関連では Q/H:R 率が TG/TT 群で有意に高率($p<0.001$)であったが、IL28B SNP と肝発癌率の関連は明らかではなかった。

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

近年、コア aa 70 と肝発癌との関連について報告があるが、これらはインターフェロン治療によるウイルス消失例を解析対象に含んでおり、インターフェロン感受性とも関連する同領域の発癌への関与が、ウイルス消失した結果によるものなのか、あるいはウイルス消失とは関係なく発癌に関与するのか明らかではなかった。本研究においてはインターフェロン無治療例と無効例のみで解析を行い、ウイルス消失とは関係なく core aa70Q/H が病態進行に関与を示すことを示した。加えて本研究では、コア aa70 の経時変化と病態進行とは密接な関連があること、さらに宿主因子 IL28B SNP はコア aa70 と強い関連が見出されるものの、肝発癌との関連が弱いことを示した。肝発癌におけるコア aa 70 配列、IL28B の役割は、今後さらなる検討が必要であるものと考えられた。

E. 結論

肝病期の進行や肝発癌には、HCV コア aa 70 変異とその経時的変化が関与しており、IL28B SNP と密接に関連しながら病態を形成していることが考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. J Hepatol. 2010 Sep 19.

2. Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. *Intervirology*. 2010;53(1):66-9.
 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. Kadokura M, Maekawa S, Ryota Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the Complete Open Reading Frame of Hepatitis C Virus in Genotype 2a Infection Reveals Critical Sites Influencing the Response to Peginterferon and Ribavirin Therapy. *Hepato Int*. 2011, in press.
2. 学会発表
1. Analysis of the response to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. S. Maekawa, A. Kanayama, T. Omori, M. Miura, M. Kadokura, R. Sueki, K. Komase, H. Shindo, F. Amemiya, K. Shindo, T. Kitamura, T. Inoue, M. Sakamoto, S.-I. Okada, N. Enomoto. 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL2010). April 14-18, 2010, Vienna, Austria.
 2. Characterization of protease inhibitor resistance mutations in untreated patients infected with genotype 1b hepatitis C virus. H. Shindo, S. Maekawa, M. Miura, K. Komase, M. Kadokura, R. Sueki, F. Amemiya, T. Kitamura, T. Inoue, M. Sakamoto, S.-I. Okada, N. Enomoto. 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL2010). April 14-18, 2010, Vienna, Austria.
 3. Extensive analysis of Serum Cytokines Associated to The Response in The PEG-IFN+RBV Combination Therapy in Genotype 1b HCV Infection. K. Komase, S. Maekawa, H. Shindo, M. Kadokura, R. Sueki, M. Miura, K. Shindo, F. Amemiya, Y. Nakayama, T. Inoue, M. Sakamoto, N. Enomoto. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
 4. Characterization of Protease Inhibitor Resistance Mutations in Untreated Patients Infected with Genotype 1b Hepatitis C Virus. H. Shindo, S. Maekawa, R. Sueki, M. Miura, M. Kadokura, K. Komase, K. Shindo, F. Amemiya, Y. Nakayama, T. Inoue, M. Sakamoto, N. Enomoto. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
 5. Investigation for viral genomic regions associated to hepatocarcinogenesis in hepatitis C. M. Miura, S. Maekawa, M. Kadokura, R. Sueki, K. Komase, H. Shindo, F. Amemiya, Y. Nakayama, T. Kitamura, T. Uetake, T. Inoue, M. Sakamoto, S.-I. Okada, N. Enomoto. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.
 6. Analysis of the early response and the final outcome to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b

infection using comprehensive information of viral and host factors. S. Maekawa, R. Sueki, A. Kanayama, M. Miura, M. Kadokura, K. Komase, H. Shindo, T. Omori, F. Amemiya, T. Kitamura, T. Inoue, M. Sakamoto, N. Enomoto. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses (HCV2010). September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.

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22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

肝移植症例における IL28B 遺伝子多型と IFN 治療感受性の相関とその意義

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：C型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療の効果予測因子としてIL28B遺伝子周辺のSNPsの有用性が報告され、徐々に臨床応用されつつある。HCV陽性症例に対する肝移植後の肝炎再発が、グラフト予後不良の規定因子であることが知られており、肝移植後の抗ウイルス治療が必須である。そこでIL28B遺伝子の多型解析が肝移植にも有用であるかを検討した。ドナーおよびレシピエントのIL28B遺伝子型がともにMajorである症例では有意にSVR達成率が高かったが、ドナーまたはレシピエントのどちらかがMinorの症例ではSVR達成率は有意に低かった。HCV-RNAの変異(Coreの70番目のアミノ酸、ISDR、IRRDR)との併用解析によりSVR達成の効果予測の感度および特異度はともに80%を超えた。IL28BとHCV-RNAの併用遺伝子解析は、肝移植後再発C型肝炎の抗ウイルス治療効果予測に有用であることが示された。

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。末期肝硬変や切除不能な肝細胞癌に対する根治的な治療法は肝移植のみである。PEG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難治性C型肝炎患者に対する著効率は50%程度である。近年、C型慢性肝炎に対する抗ウイルス治療の効果予測因子としてIL28B遺伝子周辺のSNPsが報告され、徐々に臨床応用されつつある。HCV陽性症例に対する肝移植において、肝炎の再発がグラフト予後不良の規定因子であることが知られており、肝移植後の抗ウイルス治療が必須である。本研究ではIL28B遺伝子の多型解析が肝移植にも有用であるか否かを検討する。また、レシピエントおよびドナーにおけるIL28B遺伝子型と肝細胞内のIFN誘導遺伝子(ISGs)の発現との相関を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

九州大学にて行った生体肝移植症例のう

ち、再発C型肝炎にPEG-IFN/RBV治療をした67例とそのドナー41例を対象とした。ウイルス因子としてCore領域はアミノ酸70番と91番、NS5A領域はISDRとIRRDRの変異を検討した。ドナーおよびレシピエントのIL28B遺伝子周辺のSNP解析としてrs8099917の遺伝子解析を行った。また、HCV-RNAの変異解析とIL28Bの遺伝子多型の併用解析の意義を検討した。さらに、レシピエントとドナーの肝組織中のISGsとして、ISG15、OAS、PKR、USP18のmRNA量を定量PCRで検討した。

(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「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」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、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

Core 領域の DW 群は SVR 率が 55%(n=22)で NDW 群の 22%(n=27)より有意に高率であり (p=0.021)、ISDR \geq 2 群(64%、n=14)および IRRDR \geq 6 群(55%、n=16)は、それぞれ ISDR $<$ 2 群(26%、n=35)、IRRDR $<$ 6 群(22%、n=33)よりも有意に高率であった(p=0.014、p=0.002)。レシピエントの IL28B の遺伝子型が Major の症例では有意に SVR 達成率が高かった(54% vs 11%, p=0.003)。さらに、ドナーの遺伝子型が Major の症例でも有意に SVR 達成率が高かった(44% vs 9%, p=0.025)。レシピエントおよびドナーの遺伝子型の併用解析したところ、レシピエントおよびドナーがともに Major である症例のみが有意に SVR 達成率が高かった(p=0.005)。さらに、HCV-RNA の変異解析との併用解析は抗ウイルス治療の効果予測をさらに改善した(感度:83%、特異度:82%)。ISG15、OAS、PKR および USP18 の発現はレシピエントの Minor 群では有意に高値であったが、レシピエントの Major 群および HCV 非感染のドナーの肝組織では低値であった。以上の成績から、IL28B の SNP が Minor である肝組織では HCV の慢性感染に伴い ISG が有意に強く誘導されることが明らかとなった。

D. 考察

レシピエントのみではなくドナーの IL28B 遺伝子多型が IFN 治療感受性と有意に相関していることが明らかとなった。これは IL28B 遺伝子多型の IFN 感受性との相関は、肝細胞においてのみではなく、肝内に浸潤している免疫担当細胞も関与していることを示唆している。さらに ISGs が上昇しているのは Minor genotype を持つレシピエントのみであった。HCV 感染に伴い、Minor の症例では肝組織中で ISGs が誘導され、IFN 治療感受性低下につながっていることが示唆された。

E. 結論

1. 肝移植においても IL28B の遺伝子解析は有用である。
2. HCV の感染に伴い、Minor 群においては何

らかの機序によって、IFN シグナルを負に制御する因子を含む ISG が誘導され、IFN 治療に抵抗性を示す可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 2010; 52, 411-420.
- 2 Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J Virol* 2010; 84, 2798-2807.
- 3 Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 2010; 84, 5824-5835.
- 4 Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology* 2010; 39,1577-1585.
- 5 Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y, Yamaguchi K, and Mizuochi T. Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J Innate Immun* 2010; 2, 607-617.
- 6 Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol Biosyst* 2010; 6, 2539-2553.

2. 学会発表

- 1 松浦善治: Host factors involved in the replication of hepatitis C virus: 第 62 回細胞生物学会大会、大阪、5 月 19 日-21 日, 2010.
- 2 松浦善治: 温故知新・C 型肝炎ウイルス研究の源流: 第 52 回日本消化器病学会大会、横浜、10 月 13 日-16 日, 2010.
- 3 寒原裕登、田鋏修平、藤田尚信、野田健司、森石恆司、吉森 保、松浦善治: C 型肝炎ウイルスはオートファジーを誘導して持続感染を成立させる: 第 58 回日本ウイルス学会総会、徳島、11 月 7 日-9 日, 2010.
- 4 谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルスの細胞侵入におけるフォスホオリパーゼ C およびプロテインキナーゼ C 依存的なシグナル伝達経路の関与、同上。
- 5 福原崇介、本村貴志、二宮彰紀、阿部隆之、武富紹信、前原喜彦、松浦善治: IL28B 遺伝子多型と肝移植後のインターフェロン感受性、同上。
- 6 塩川 舞、福原崇介、後藤志典、二宮彰紀、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: 不死化ヒト肝細胞株(Hc 細胞)への患者血清由来 HCV の感染、同上。
- 7 森田英嗣、藤田尚信、牛島廣治、松浦善治、吉森保: 細胞内膜輸送系を介した RNA 非エンベロープウイルスの細胞外への放出、同上。
- 8 森石恆司、松浦善治: HCV による脂質代謝障害の分子機序、同上。
- 9 温 暁玉、阿部隆之、久木原博、田鋏修平、森 嘉生、谷 英樹、加藤宣之、鈴木哲朗、巽 正志、森石恆司、松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的なウイルス排除システムの構築、同上。
- 10 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗: C 型肝炎ウイルスの *trans*-packaging 型粒子を用いた感染機構の解析、同上。
- 11 阿部隆之、谷 英樹、森石恆司、松浦善治: 細胞内アネキシンは C 型肝炎ウイルスの複製を制御する、同上。
- 12 加藤大志、森 嘉生、寒原裕登、要 祐喜、谷 英樹、阿部隆之、神谷 亘、森石恆司、松浦善治: 核小体蛋白質 B23 は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
- 13 松浦善治: C 型肝炎ウイルス感染による肝細胞癌の発症に關与する宿主因子: 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 7 日-10 日, 2010.
- 14 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Kohji Moriishi, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, , and Yoshiharu Matsuura: Autophagy is required for cell survival in cells replicating hepatitis C virus. The American Society for Virology, 29th Annual Meeting, Montana State University, Montana, July 17-21, 2010.
- 15 Matsuura Yoshiharu: Host factors involved in the propagation and pathogenesis of HCV, 17thth International Meeting on HCV and Related Viruses.横浜, 9 月 10 日-14 日, 2010.
- 16 Takashi Motomura, Akinobu Taketomi, Takasuke Fukuhara, Ken Shirabe, Yoshiharu Matsuura, and Yoshihiko Maehara: Association of IL28B genetic variation and hepatic ISGs expression in the outcome of IFN therapy for recurrent hepatitis C after liver transplantation. 同上。
- 17 Hiroto Kambara, Shuhei Taguwa, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Inhibition of autophagy induces lysosomal vacuolation in cells replicating HCV. 同上。
- 18 Shuhei Taguwa, Hiroto Kambara, Naonobu Fujita, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: HCV replication enhances secretion of an immature cathepsin B through induction of an incomplete autophagy. 同上。
- 19 Kohji Moriishi, Ikuo Shoji, Yoshio Mori, Ryosuke Suzuki, Tetsuro Suzuki, Chikako Kataoka, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of PA28gamma in the propagation of HCV. 同上。
- 20 Takasuke Fukuhara, Akinobu Taketomi, Takashi Motomura, Akinori Ninomiya, Takayuki Abe, Yoshihiko Maehara, Yoshiharu Matsuura: IL28B variation in recipients and donors correlates with response to peg-interferon/ribavirin for

recurrent hepatitis C. 同上。

- 21 Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: A splice variant of CD44 participates in the IP-10 production in cells infected with HCV. 同上。
- 22 Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Involvement of phospholipase C and protein kinase C-dependent signaling pathways in the entry of HCV. 同上。

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

C型肝炎に対する肝移植後の抗ウイルス免疫機構の解明

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 C型肝炎ウイルス(HCV)性肝硬変は、肝移植の最も頻度の高い適応疾患であるが移植後再発が高率に起こり、その進行も急速である。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。我々は、免疫監視法としてリンパ球混合試験(MLR)を床導入しているが、HCV RNA量がMLRで定量化した抗ドナー免疫応答の亢進とともに減少することを初めて見出した。また、ゲノミックHCVレプリコン細胞の培養上層トランスウエル内でMLRを施行した結果、アロ応答T細胞のIFN- γ 産生能の程度に依存して、下層のHCVレプリコン細胞のHCV複製が抑制された。これらの結果は、組織傷害を惹起することなくIFN- γ 産生細胞を肝臓に誘導し得れば、HCV肝炎の移植後再発を抑止し得る可能性を示唆する。

A. 研究目的

HCV性肝硬変は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。本研究では、HCV性肝硬変に対する肝移植後の抗ウイルス免疫機構を解明した。

B. 研究方法

CFSE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)を免疫監視法として臨床肝移植患者に導入した。T細胞のアロ応答と血中HCV RNA量との関係を解析した。また、*in vitro*でゲノミックHCVレプリコン細胞の培養上層トランスウエル内でMLRを施行

し、T細胞のアロ応答とHCV増幅の関係を解析した。

C. 研究結果

HCV RNA量がMLRで定量化した抗ドナー免疫応答(stimulation index)が亢進していれば、血中HCV量が有意に低値となるが、抗サードパーティ応答との間には関連を認めないことを見出した(図1)。

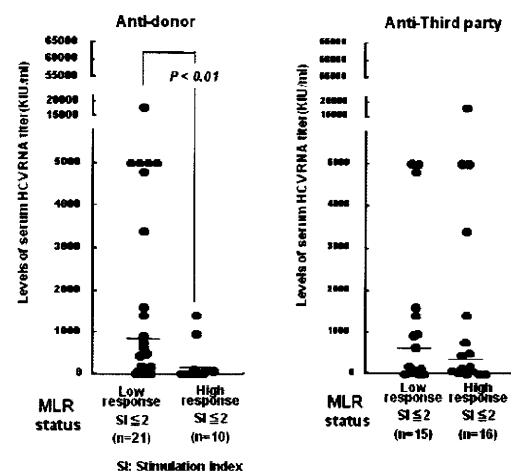


図1. 肝移植後3カ月以内のT細胞のアロ応答と血中HCV量の関係

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意味する。本仮説を検証するべく、ゲノミック HCV レプリコン細胞の培養上層トランスウエル内で MHC フルミスマッチあるいは 1 ハプロミスマッチの組み合わせでヒトリンパ球を異系混合培養した (MLR)。その結果、MLR における T 細胞分裂の程度に依存して、下層の HCV レプリコン細胞の HCV 複製が抑制された (図 2)。また、このアロ免疫応答による HCV 複製抑制効果は、抗 IFN- γ 抗体の添加により減弱した。

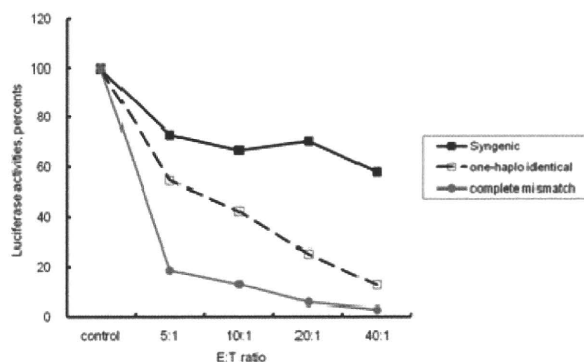


図 2. アロ免疫応答によって産生される液性因子には HCV 増幅抑制効果がある。ゲノミック HCV レプリコン細胞の培養上層トランスウエル内で MHC フルミスマッチあるいは 1 ハプロミスマッチの組み合わせでヒトリンパ球を用いて CFSE-MLR を施行した。MLR における T 細胞分裂の程度に依存して、下層の HCV レプリコン細胞の HCV 複製 (ルシフェラーゼ活性で測定) が抑制された (図の x 軸は 1 ウエルあたりに培養したリンパ球とレプリコン細胞の比)。

D. 考察

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の排除が図られる。しかし、HCV 感染では HCV の E2 蛋白と NK 細胞上の CD81 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 細胞を IL-2 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、強い HCV 複製抑制効果を誘導し得た (特願 2006-167871)。移植肝の門脈流域に浸潤したアロ免疫応答 CD4⁺T 細胞からは IL-2 が産生されるが、近傍に存在する NK 細胞は IL-2 刺激により抗 HCV 効果を発揮する可能性がある。また、移植肝の門脈流域に浸潤したアロ免疫応答 CD8⁺T 細胞からは IFN- γ が産生されるが、近傍の HCV 感染肝細胞内の HCV 増幅を直接的に抑制する可能性がある。このアロ応答と抗 HCV 応答のクロストークの仮説に一致して、HLA ミスマッチが少ないほど HCV による肝線維化の進行が促進されるとの報告もある。従って、拒絶反応を引き起こすことなく、抗ウイルス因子である IFN- γ をパラクラインする細胞を肝臓に誘導することが可能であれば、移植後 HCV 肝炎の再発・進行を制御し得る可能性があると考えられる。

我々は、末梢血リンパ球を至適濃度の IL-2/抗 CD3 抗体と ICAM-1 の存在下で培養することで、NK/NKT 細胞が 1000 倍以上に増殖し、IFN- γ 依存性抗 HCV 効果を誘導し得た。肝臓移植後にこれらの培養 NK/NKT 細胞を移入することは、画期的な抗 HCV 根治療法としての可能性を期待させる。

E. 結論

MLR で定量化したドナー応答性 T 細胞の増殖指数とその時点での HCV ウイルス量には有意な関係を認めた。この興味深い現象は、アロ免疫応答と抗 HCV 免疫応答との間のクロストークを示唆し、抗ウイルス免疫細胞療法の可能性の基盤となる

現象と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Tashiro, H. Aikata, K. Waki, H. Amano, A. Oshita, T. Kobayashi, Y. Tanimoto, S. Kuroda, H. Tazawa, K. Chayama, T. Asahara, H. Ohdan: Treatment strategy for early hepatocellular carcinomas: Comparison of radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization and surgical resection. *J. Surg. Oncol.* 2011, in press
- 2) M. Doskali, Y. Tanaka, M. Ohira, K. Ishiyama, H. Tashiro, K. Chayama, H. Ohdan: Possibility of Adoptive Immunotherapy With Peripheral Blood-derived CD3-CD56+ and CD3+CD56+ Cells for Inducing Antihepatocellular Carcinoma and Antihepatitis C Virus Activity. *J Immunother.* 2011, 34(2):129-138
- 3) H. Amano, H. Hino, C. Tateno, K. Emoto, Y. Imaoka, C. Yamasaki, T. Itamoto, H. Tashiro, T. Asahara, H. Ohdan, K. Yoshizato: Therapeutic Potential of Propagated Hepatocyte Transplantation in Liver Failure. *J Surg Res.* 2011, [Epub ahead of print]
- 4) Y. Ushitora, H. Tashiro, S. Takahashi, H. Amano, A. Oshita, T. Kobayashi, K. Chayama, H. Ohdan: Splenectomy in Chronic Hepatic Disorders: Portal Vein Thrombosis and Improvement of Liver Function. *Dig Surg.* 2011, 28(1):9-14
- 5) NB. Basnet, K. Ide, H. Tahara, Y. Tanaka, H. Ohdan: Deficiency of N-glycolylneuraminic acid and Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc epitopes in xenogeneic cells attenuates cytotoxicity of human natural antibodies. *Xenotransplantation.* 2010, 17(6):440-448
- 6) H. Tahara, K. Ide, N. Basnet, Y. Tanaka, H. Ohdan: Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. *Xenotransplantation.* 2010, 17(3):188-196
- 7) T. Kawaoka, N. Hiraga, S. Takahashi, S. Takaki, F. Mitsui, M. Tsuge, Y. Nagaoki, Y. Kimura, Y. Hashimoto, Y. Katamura, A. Hiramatsu, K. Waki, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, H. Tashiro, H. Ohdan, K. Chayama : Prolongation of interferon therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation: analysis of predictive factors of sustained virological response, including amino acid sequence of the core and NS5A regions of hepatitis C virus. *Scand J Gastroenterol,* 2010, 45(12):1488-1496
- 8) 大段秀樹, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田澤宏文, 田中友加, 五十嵐友香: 臓器移植におけるB細胞性免疫応答とその制御法

抗HLA抗体関連拒絶反応の克服. 今日の移植, 2010, 23 (6) : 783-788

9) 大段秀樹: ネオオーラル10年の歩み 解明されたシクロスポリンの新規作用 B-1細胞への分化抑制作用. 今日の移植, 2010, 23 (6) : 722-728

10) 大段秀樹: 肝移植の免疫抑制療法におけるセルセプトの役割. 肝・胆・膵, 2010, 61 (6) : 1182-1187

11) 大段秀樹: B細胞lineageと抗体性拒絶反応の制御. 移植, 2010, 45 (5) : 434-440

12) 尾上隆司, 大段秀樹: T細胞の経口トランス誘導と肝類洞内皮細胞. 臨床免疫・アレルギー科, 2010, 54 (5) : 604-612

13) 田代裕尊, 田妻進, 佐々木民人, 茶山一彰, 浅原利正, 大段秀樹: 原発性硬化性胆管炎に対する肝移植の適応と問題点. 胆と膵, 2010, 31 (8) : 771-774

14) 井手健太郎, 大段秀樹: 【術前・術後に要注意 併存疾患の手術リスクと対策】 特殊薬剤服用中の手術 副腎皮質ホルモン剤 ステロイド投与患者における周術期管理. 外科, 2010, 72 (9) : 955-958

15) 大段秀樹: 肝移植における免疫モニタリング. 今日の移植, 2010, 23 (3) : 363-369

2. 学会発表

1) 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, 田原裕之, 梶谷桂子, 田澤宏文, 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モデルでの解析～, 第

110回日本外科学会定期学術集会, 名古屋, 2010. 4. 8-10

2) Y. Tanaka, H. Tashiro, H. Ohdan: Optimization of Immunosuppressive Therapy on the Basis of Immune Monitoring by a Multiparametric Mixed Lymphocyte Reaction Assay Reduces Infectious Complications and Mortality in Living-Donor Liver Transplantation. American Transplant Congress 2010, San Diego (U.S.A.), 2010. 5. 1-5

3) H. Tahara, K. Ide, N. Basnet, Y. Tanaka, H. Ohdan: Role of CD47-SIRP Signaling in the Responses of Human T Cells with Direct and indirect Xenospecificity. American Transplant Congress 2010, San Diego (U.S.A.), 2010. 5. 1-5

4) H. Tazawa, T. Irei, Y. Igarashi, Y. Tanaka, H. Tashiro, T. Asahara, H. Ohdan: Persistent Absence of B Cells with Receptors for Donor-Type Blood Group Antigens in ABO-Incompatible Liver Transplant Patients Treated with an Immunosuppressive Regimen Containing Rituximab and Calcineurin Inhibitors. American Transplant Congress 2010, San Diego (U.S.A.), 2010. 5. 1-5

5) H. Tazawa, T. Irei, Y. Igarashi, H. Tashiro, H. Ohdan: Differential Susceptibility of B Cell Subpopulations to Proteasome Inhibition Bortezomib Targets Both B-1-Like Blasts and Plasma Cells and Reduces the Anti-Gal Antibody Level.

- American Transplant Congress 2010, San Diego (U. S. A.), 2010. 5. 1-5
- 6) M. Banshodani, T. Onoe, M. Shishida, Y. Igarashi, Y. Tanaka, H. Ohdan: Allogeneic Liver Sinusoidal Endothelial Cells Negatively Regulate the Immune Response of Corresponding T Cells in a Liver Endothelium Repopulation Model. American Transplant Congress 2010, San Diego (U. S. A.), 2010. 5. 1-5
- 7) 大段秀樹, 田代裕尊, 浅原利正, 茶山一彰: (ワークショップ) 肝移植後における抗アロおよび抗 HCV 応答のクロストーク機構の解明と新規抗 HCV 療法への展開. 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形, 2010. 5. 27-28
- 8) 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, 田原裕之, 田澤宏文, 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の解析. 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形, 2010. 5. 27-28
- 9) 田中友加, 田代裕尊, 大段秀樹: 肝臓移植後に生じる抗ドナー免疫応答は C 型肝炎ウイルス増殖を抑制する. 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形, 2010. 5. 27-28
- 10) 大段秀樹: 移植後免疫療法における最新の進歩. 第 55 回 (社) 日本透析医学会学術集会総会, 兵庫, 2010. 6. 18-20
- 11) 田澤宏文, 大段秀樹: (シンポジウム) 血液型不適合肝移植後の血液型抗原認識 B 細胞性免疫寛容の証明. 第 28 回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2
- 12) Basnet Nabin, 伊禮俊充, 番匠谷将孝, 田中友加, 浅原利正, 大段秀樹: Severe thrombocytopenia before transplantation predicts persistent thrombocytopenia in liver transplant recipients. 第 28 回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2
- 13) 五十嵐友香, 尾上隆司, 五十嵐友香, 田中友加, 田原裕之, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田澤宏文, 田代裕尊, 浅原利正, 大段秀樹: 糖鎖抗原を表出した肝類洞内皮細胞は B 細胞の抗体産生を抑制できる. 第 28 回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2
- 14) 番匠谷将孝, 田代裕尊, 井手健太郎, 尾上隆司, 伊禮俊充, 浅原利正, 大段秀樹: 肝類洞内皮細胞の免疫寛容誘導能の解析～肝移植後の免疫寛容をめざした試み. 第 28 回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2
- 15) 田中友加, 田代裕尊, 黒田慎太郎, 天野尋暢, 大下彰彦, 谷本新学, 田澤宏文, 板本敏行, 大段秀樹: 免疫モニタリング下至適免疫抑制療法は肝移植後合併症発症率を軽減するか. 第 28 回日本肝移植研究会, 広島, 2010. 7. 1-2
- 16) Y. Tanaka, H. Ohdan: Immune-monitoring in liver transplant patients by multiparameter mixed lymphocyte reaction assay using CFSE-labeling technique. 14TH INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 兵庫, 2010. 8. 22-27
- 17) 五十嵐友香, 伊禮俊充, 大段秀樹: 糖鎖抗原を表出した肝類洞内皮細胞は、応答する B 細胞を特異的に抑制する. 第 46 回日本移植学会総会, 京都, 2010. 10. 20-22
- 18) 田澤宏文, 伊禮俊充, 五十嵐友香,