

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20～22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

肝炎ウイルス全ゲノム解析を用いた病態と治療感受性を規定するウイルス領域の検討

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：ヒト肝細胞キメラマウスは、多様な病態において臨床的に認められるウイルス遺伝子変異の意義を直接的に *in vivo* で検証可能な画期的システムである。本研究においては、我々はハイスループットの HCV あるいは HBV 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、治療感受性あるいは肝炎の進行と関連する肝炎ウイルス領域を明らかとすることを目的とした。このようにして明らかとした変異をもつウイルスをキメラマウスに感染させ、肝炎の進行あるいは治療感受性におけるウイルスの役割を解明し新しい診断と治療に結びつけてゆくことが最終的な目標である。H20年度は、ゲノタイプ 1b HCV 症例におけるペグインターフェロン・リバビリン併用療法において治療感受性を規定するコア 70 番、NS5A-ISDR 領域の役割を明らかとした。H21年度においては、多数症例の解析をより詳細に行い、コアと NS5A-ISDR に加え、NS5A-IRRDR 領域多型が再燃と強く関与することによって最終治療効果に強く関与すること、さらにゲノタイプ 2a 症例におけるコアと NS5A 領域の治療効果との関連、HBV 症例におけるラミブジン耐性と PreS2 変異の関連を明らかとした。H22年度においては、肝炎の進行と発癌に関連するウイルスコア遺伝子領域の関与と IL28B SNP の関連について明らかとした。

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

A. 研究背景・目的

C型肝炎ウイルス (HCV) あるいは B型肝炎ウイルス (HBV) は変異に富み、患者間で感染しているウイルス遺伝子が完全に同一であることはない。また、同一患者内でも個々のウイルスには多様な変異が認められる。一方、肝炎の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、この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。

従来、肝炎ウイルス遺伝子変異の多様性の生物学的意義を直接検証できる実験動物系は存在していなかったが、近年開発されたヒト肝細胞キメラマウスは、臨床的に認められる多様なウイルス遺伝子変異の意義を直接的に検証可能な画期的システムである。本研究において、我々はハイスループットの HCV あるいは HBV 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、各病態と関連するウイルス領域を抽出する。そして、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型あるいはB型肝炎ウイルスの病原性解析を統合することによる病態解明が最終的な目標である。

B. 研究方法 (2008 年度)

ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行したゲノタイプ 1b 症例群において、治療前の血清から HCV-RNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法により HCV 全翻訳領域配列を決定し、治療効果と関連するウイルス領域を検索した。

研究方法 (2009 年度)

2008 年度の症例をさらに増やすとともに、ウイルスダイナミクスについてさらに詳細な検討を加えた。また治療効果の関連をゲノタイプ 2a についても同様な検討を行った。さらには HBV についても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。

研究方法 (2010 年度)

肝発癌とウイルスゲノムの関連について検討した。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。さらには検証群を用いてコアと NS5A 領域の関連、長期経過観察例についてコア領域の経時変化、さらには IL28B SNP を検索した。

C. 研究成果

(1)ゲノタイプ 1b-HCVにおけるペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果に関連するウイルス領域の抽出

ペグインターフェロン・リバビリン併用

療法を施行したゲノタイプ 1b 症例群を治療導入後 12 週時点での反応性によって分類すると、NS5A-ISDR~PKR-BD 領域は RVR、あるいは cEVR-8w と強い関連があり良好な早期反応性を決定する最も重要な HCV ゲノムエレメントであること、一方 nEVR と最も関連するのはコア 70 番であることを明らかとした。一方最終効果の違いは、NS5A-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、さらに IRRDR は再燃の有無を規定する領域であることも明らかとなった。

(2)ゲノタイプ 2a-HCVにおけるペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果に関連するウイルス領域の抽出

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 110 番と NS5A-ISDR であることが明らかとなった。多変量解析においても同 2 領域は独立して治療効果に関連する因子として抽出された。

(3)HBVに対するラミブジン治療において、将来の耐性出現と関連するウイルス領域の抽出

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 PreS1-2 領域であった。コックス比例ハザードモデル解析によっても、PreS における 2 領域の変異は、将来の耐性出現と関連することが示された。

(4)HCV感染における肝発癌症例において、発癌と関連するウイルス領域の抽出

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 と NS5A-ISDR aa 2220 を含む 3 アミノ酸であった。検証群における検討で、コア aa 70Q/H 病期が進行、あるいは肝発癌と関連し、一方、病期の進展につれてコア aa 70 自体も変化することが明らかになった。興味深いことに、肝発癌と関連するコア 70 多型は、IL28B と関連するものの、IL28B SNP は肝発癌との直接的な関連は弱いことが明らかとなった。

D. 考察

ウイルス遺伝子の網羅的な解析を様々な臨床背景因子、あるいはウイルスダイナミクスと詳細に突き合わせて解析することにより、抗ウイルス療法の治療反応性、耐性の出現、あるいは肝発癌などの様々な病態において、HBVあるいはHCVにおいて、それぞれ特徴的なウイルスの変異が関連することが明らかとなった。この結果は、慢性肝炎におけるテーラーメイド治療を可能とすると同時に、難治に至るメカニズムの分子生物学的解析における基盤となる重要な情報と考えられる。一方、宿主因子IL28Bとウイルス遺伝子の密接な関連が明らかになり、病態における両者の関連の解明が、今後の研究の進展のためになお必要なものと考えられた。

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た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 2008 Jul 20.
2. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M. Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatol Res.* 2008 Sep;38(9):909-18.
3. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 Feb 1;197(3):361-70.
4. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Sep;23(9):1437-47
5. Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. *Intervirology.* 2010;53(1):66-9.
6. 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.
7. 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.
 8. 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.
 9. 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. *Hepatol Int.* 2011, in press.
- ## 2. 学会発表
- 1 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. ワークショップ 8 : Viral genotyping/sequencing の臨床的意義. Whole HCV genome sequencing による治療感受性規定領域の検索. 第 12 回 日本肝臓学会大会. 東京. 平成 20 年 10 月 1 日 - 10 月 3 日.
 - 2 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.
 - 3 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.
 - 4 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.
 - 5 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 耐性に関与する治療前 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.
 - 6 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.
 - 7 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.
- 8 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.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 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.
- 12 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。

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と 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： IRF7 の dominant-active 変異体を、レプリコン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。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た。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り、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。

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。また、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。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

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。

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

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。

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

PEG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。

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 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。
- 5 肝移植においても IL28B の遺伝子解析は有用である。
- 6 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. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
- 2 Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
- 3 A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. Aizaki H., Morikawa K., Fukasawa M., Hara H., Inoue Y., Tani H., Saito K., Hanada K., Matsuura Y., Lai M.M.C., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
- 4 A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
- 5 Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).
- 6 Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. Kimura T., Imamura M., Hiraga N., Hatakeyama T., Miki D., Noguchi C., Mori N., Tsuge M., Takahashi S., Fujimoto Y., Iwao E., Ochi H., Abe H., Maekawa T., Arataki K., Tateno C., Yoshizato K., Wakita T., Okamoto T., Matsuura Y., Chayama K. *J. Gen. Virol.*, 89, 2108-2113 (2008).
- 7 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).
- 8 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).
 - 9 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).
 - 10 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).
 - 11 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).
 - 12 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).
 - 13 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).
 - 14 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).
 - 15 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.
 - 16 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.
 - 17 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.
 - 18 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.
 - 19 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.
 - 20 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：C型肝炎ウイルスの複製および病原性発現における Rip の役割: 第 31 回日本神経科学大会ワークショップ、東京、7月9-11日、2008.
- 2 Xiaoyu Wen、阿部隆之、森石恆司、松浦善治: IRF7 dominant active 変異体による HCV

- 感染細胞における I 型 IFN の発現増強効果：第 14 回日本遺伝子治療学会、札幌、10 月 21 日-23 日、2008.
- 3 山下哲生、宮崎直幸、森嘉生、森石恆司、李天成、宮村達男、武田直和、吉村政人、月原富武、松浦善治：分解能 3.5 Å の E 型肝炎ウイルス様粒子の X 線結晶構造解析：第 56 回日本ウイルス学会総会、岡山、10 月 26 日-28 日、2008.
 - 4 田鍬修平、阿部隆之、森 嘉生、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルスの複製における hB-ind1 のコシャペロン活性、同上。
 - 5 森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルス感染におけるプロテアソーム活性化蛋白質 PA28 γ の役割、同上。
 - 6 森 嘉生、山下哲生、嶋 亮一、森石恆司、李 天成、武田直和、松浦善治：E 型肝炎ウイルス様粒子の形成に重要なアミノ酸の同定と細胞吸着阻害モノクローナル抗体の作製、同上。
 - 7 谷 英樹、泉 貴之、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細胞侵入におけるセラミドの関与、同上。
 - 8 久木原 博、森石恆司、松浦善治：ヒト VAP-C は C 型肝炎ウイルスの複製を抑制する、同上。
 - 9 阿部隆之、温 小玉、田中佳典、寒原裕登、谷 英樹、森石恆司、松浦善治：C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的な IFN の誘導によるウイルス排除システムの構築、同上。
 - 10 阿部隆之、要 祐喜、森石恆司、考藤達哉、林 紀夫、松浦善治：C 型肝炎ウイルス感染による TLR 経路を介した炎症性ケモカイン IP-10 の過剰産生、同上。
 - 11 田中佳典、森 嘉生、谷 英樹、阿部隆之、森石恆司、巽 正志、松浦善治：患者血清中に存在する C 型肝炎ウイルスの感染・複製を検出可能な指示細胞の樹立、同上。
 - 12 松浦善治：C 型肝炎ウイルスの増殖と病原性発現に關与する宿主因子：第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会、シンポジウム、神戸、12 月 9 日-12 日、2008.
 - 13 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.
 - 14 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。
 - 15 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。
 - 16 寒原裕登、田鍬修平、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。
 - 17 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。
 - 18 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。
 - 19 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。
 - 20 鈴木亮介、齋藤憲司、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。
 - 21 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 粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、同上。
 - 22 田鍬修平、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.
 - 23 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. 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.

- 24 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.
- 25 寒原裕登、田鍬修平、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.
- 26 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。
- 27 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。
- 28 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。
- 29 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。
- 30 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。
- 31 温 暁玉、阿部隆之、久木原博、田鍬修平、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。
- 32 鈴木亮介、斎藤憲司、赤澤大輔、石井孝司、松浦善治、脇田隆字、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。
- 33 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。
- 34 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。
- 35 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関与する宿主因子: 第33回日本分子生物学会年会、神戸、12月7日-10日, 2010.
- 36 Hiroshi Kukihara, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Human vesicle-associated membrane protein-associated protein subtype C inhibits HCV replication. 15th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Antonio, October 5-9, 2008.
- 37 Takayuki Abe, Yuuki Kaname, Kohji Moriishi, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi, and Yoshiharu Matsuura: HCV infection induces IP-10 production through the TLR signaling pathway. 同上。
- 38 Hideki Tani, Takayuki Izumi, Hiroto Kanbara, Yuuki Kaname, Yoshio Mori, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Ceramide plays a crucial role on the entry of Japanese encephalitis virus. 同上。
- 39 Yoshinori Tanaka, Yoshio Mori, Hideki Tani, Takayuki Abe, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura: Establishment of an indicator cell line that detects the replication of HCV in sera from hepatitis C patients. 同上。
- 40 Kohji Moriishi and Yoshiharu Matsuura: Proteasome activator PA28g is required for efficient growth of hepatitis C virus. 同上。
- 41 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.
- 42 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.
- 43 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。
- 44 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.
- 45 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。
- 46 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。
- 47 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。
- 48 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。
- 49 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.
- 50 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.
- 51 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。
- 52 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。
- 53 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。
- 54 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。
- 55 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。
- 56 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。
- 57 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。

G. 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 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natural killer (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、IFN- γ に依存したHCV複製抑制効果を誘導し得た。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感染患者に対する肝移植後には、アロ免疫応答由来のIFN- γ 産生に術後の血中HCV RNA量が有意に関連することからも、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、IFN- γ 産生活性化NK/NKT細胞移入療法により制御しうる可能性がある。

1. NK/NKT細胞の抗HCV機構の解明

一般に、ウイルスが感染すると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、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。本研究では、肝内在NK細胞/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、強い抗腫瘍活性と抗CV効果を誘導し得

ることを確認した(図1)。

2. HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた活性化NK/NKT細胞移入効果

α -PA/SCIDマウスに、ヒトの肝細胞を経脾的に移植すると、90%以上ヒト肝細胞に置換される。ヒト肝細胞キメラマウスにHCV RNA高値患者(genotype 1b)の血清を移入すると、ヒト肝細胞におけるHCVの感染と複製が確認できる。このHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスにヒト肝由来活性化NK細胞/NKT細胞を移入して免疫細胞移入による抗HCV効果を検討した。その結果、HCV感染を有意に抑制可能であった。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、NK細胞/NKT細胞は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2)。

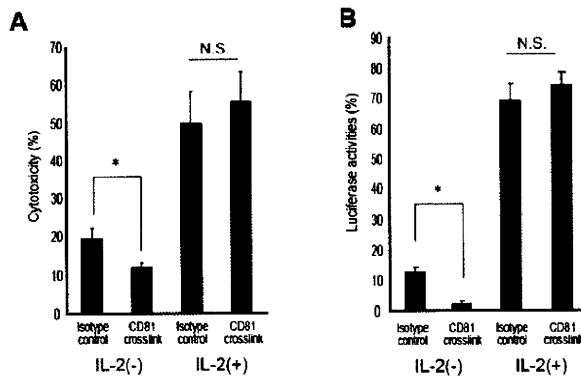


図1. ヒト肝内在NK細胞の抗肝癌細胞傷害活性(A)と抗HCV活性(B)。

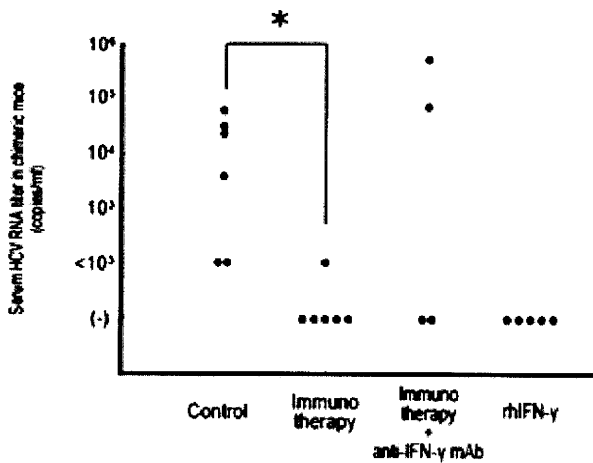


図2. ヒト肝由来リンパ球 (20×10^6 cells/マウス) を移入したHCV持続感染 (genotype 1b) ヒト肝細胞キメラマウスの血中HCV RNA量。HCV感染血清投与2週間後にIL-2/OKT3処理肝リンパ球を移入。さらに抗IFN- γ 抗体を添加した実験群とrecombinant human IFN- γ を投与した実験群を設定した。リンパ球移入2週間後に血中HCV RNA量を測定。* $P < 0.01$ 。

3. 肝移植後アロ応答とHCV増殖の関連

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、T細胞のアロ応答と血中HCV RNA量との関係を解析した。HCV RNA量がMLRで定量化した抗ドナー免疫応答が亢進していれば、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。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ェル内で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MLRを施行した。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。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。

4. 総括

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。活性化NK/NKT細胞がIFN- γ 依存性抗HCV効果を誘導し得ることから、肝臓移植後にこれらの培養細胞を移入することは、画期的な抗HCV根治療法として有望である。これらの研究成果は、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ある。

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 Rep Gastroenterol*, 2009, 3(3):324-331
- 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. *J Immunol*, 2010, 17(3):188-196
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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]
- 11) 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, 4;28(1):9-14
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 尾上隆司, 大段秀樹: T細胞の経口トレ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
- 21) 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
- 22) 井手健太郎, 大段秀樹: 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
- 23) 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) 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
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 tolerate 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 allo-specificity. 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 モデルでの解析-. 第 45 回日本移植学会総会, 東京 2009. 9. 16-18
- 40) 伊禮俊充, 田中友加, 尾上隆司, 井手健太郎, 大平真裕, 五十嵐友香, 田原裕之, 番匠谷将孝, Basnet Nabin, 田澤宏文, 大段秀樹: B 細胞-NK 細胞間シグナル伝達制御による抗体性拒絶反応抑制の可能性. 第 45 回日本移植学会総会, 東京, 2009. 9. 16-18