

201030035A

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

自然免疫細胞リモデリングによる  
ウイルス性肝炎の新規治療法の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 23 (2011) 年 5 月

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

自然免疫細胞リモデリングによる  
ウイルス性肝炎の新規治療法の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 23 (2011) 年 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
自然免疫細胞リモデリングによるウイルス性肝炎の新規治療法の開発 大段 秀樹	5
II. 分担研究報告	
1. 自然免疫細胞リモデリングによるウイルス性肝炎の新規治療法の開発 大段 秀樹・茶山 一彰・田原 栄俊・田中 純子・瀧本 康史	11
2. ヒト肝細胞キメラマウス肝臓へのヒト類洞内皮細胞の移植 立野（向谷） 知世	28
3. 人工多機能幹細胞に関する研究 伊藤 敬	38
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	51

# I. 総括研究報告

## 自然免疫細胞リモデリングによるウイルス性肝炎の新規治療法の開発

研究代表者 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** 本研究は、自然免疫細胞による抗HCV治療効率を高める目的で、末梢血CD56<sup>+</sup>細胞、CD34<sup>+</sup>造血幹細胞あるいは人工多機能幹(iPS)細胞から、NK/NKT細胞を効率的に誘導する技術を開発する。平成22年度の研究成果は、a) 末梢血CD56<sup>+</sup>細胞由来増殖NK/NKT細胞のHCV複製抑制効果を、HCV肝炎感染ヒト肝細胞キメラマウスを用い解析したこと、b) 末梢血CD34<sup>+</sup>幹細胞からNK/NKT細胞の誘導法を確立し、HCV複製抑制効果を*in vitro*で解析したことである。また、c) さらに臨床に類似したアニマルテスティングを目的に、ヒト肝細胞/類洞内皮細胞キメラマウスの作製を試みた。d) 加えて自然免疫細胞誘導のためのiPS細胞の誘導効率の改善を目的として、クロマチン修飾酵素遺伝子移入の効果を検討した。

### A. 研究目的

C型ウイルス(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C型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。我々は、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ため、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、抗サードパーティ免疫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、移植抗原に反応するアロ免疫と抗HCV免疫との間にクロストークが存在する可能性を示唆する。

HCV性肝硬変に対する肝移植後のアロ免疫応答と抗HCV免疫応答のクロストーク機構を解析した結果、肝内に浸潤したアロ免疫CD4<sup>+</sup>T細胞から産生されるIL-2により、肝内在のnatural killer (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Interferon (IFN)- $\gamma$ 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、本研究では拒絶反応や組織障害を引き起こすことなくIFN- $\gamma$ 産生NK/NKT細胞を肝臓に誘導し、HCV肝炎を根絶し得る新規免疫細胞療法を開発する。研究内容は以下の項目に2分される。

### B. 研究方法

#### 1. NK/NKT細胞リモデリングの効率化とテロメア機能解析

最近我々は、末梢血リンパ球をIL-2と

抗CD3抗体が存在下で長期培養し、IFN- $\gamma$ 依存性抗HCV効果を持つ増殖性CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK細胞とCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT細胞の誘導に成功した。しかし、抗HCV活性を獲得したりモデリング自然免疫細胞のテロメラーゼ活性は低下し、生体投与後の細胞寿命の制限およびテロメア末端保護の制限による染色体不安定性が懸念される。そこで本研究では、末梢血CD34<sup>+</sup>造血幹細胞やiPS細胞から、テロメラーゼ活性が維持されたNK/NKT細胞を効率的に誘導する技術を開発した。NK/NKT細胞の誘導効率化においては、iPS細胞維持に関わるmicroRNAの利用を試みた。

## 2. ヒト肝細胞キメラマウスを用いたリモデリングNK/NKT細胞の抗HCV効果解析

独自に開発したHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスに、リモデリングNK/NKT細胞を移入し、マウス血清中のHCV RNAとヒトアルブミン値を定量的に評価した。移入するNK/NKT細胞とキメラマウスの肝細胞との組織適合性抗原のミスマッチの程度と抗HCV効果の関連性を解析することで、細胞療法を臨床応用するための効果的な細胞ソースを判定した。また、細胞移入療法とIFN- $\alpha$ やIFN- $\beta$ あるいは抗ウイルス剤との併用効果を解析した。

### C. 研究結果

平成22年度の研究成果の概要を記す。

#### a) 末梢血増殖NK/NKT細胞のHCV複製抑制効果の解析 (担当 大段・茶山・田中)

末梢血CD56<sup>+</sup>細胞の増殖法を確立し、IL-2と抗CD3抗体の刺激によりIFN- $\gamma$ 産生を

誘導した。次に、u-PA Transgenic/*SCID*マウスにヒトの肝細胞を移植し、HCV RNA高値患者の血清を移入してHCV肝炎モデルを作製した。このアニマルモデルを用い、末梢血から増殖したCD56<sup>+</sup>細胞が有意な抗HCV効果を発揮することを確認し、免疫細胞療法として今後臨床応用し得る可能性が示唆された。

#### b) CD34<sup>+</sup>幹細胞由来NK/NKT細胞のHCV複製抑制誘導 (担当 大段・湊本・田原)

免疫細胞療法の効率を目的に、CD56<sup>+</sup> NK/NKT細胞を末梢血CD34<sup>+</sup>造血幹細胞から分化・誘導する方法を確立した。HCVレプリコン細胞を用い、分化増殖したCD56<sup>+</sup>細胞の抗HCVウイルス増幅抑制効果を検討した結果、有意な抑制効果を確認した。

#### c) ヒト肝細胞/類洞内皮細胞キメラマウスの作製 (担当 立野)

ヒト肝細胞キメラマウスへのヒト免疫細胞の生着効率の改善を期待して、キメラマウス肝臓の類洞内皮細胞をヒト類洞内皮細胞で置換することを試みた。3週齢のホストマウスにヒト肝細胞と継代培養ヒト類洞内皮細胞を同時に移植したところ、移植後1週間目の肝臓において、ヒトCD31の発現が認められ、ヒト類洞内皮細胞の生着の可能性が示唆された。

#### d) 免疫細胞誘導のためのiPS細胞の誘導効率の改善 (担当 伊藤)

自然免疫細胞誘導のためのiPS細胞の誘導効率の改善を目的として、山中4因子に加えてクロマチン修飾酵素をウイルスベクターによりマウス繊維芽細胞に導

入した。ヒストン脱ユビキチン化酵素を導入することにより幹細胞コロニーの出現頻度に差異が認められた。

#### D. 考察

HCV肝炎感染肝移植例において、門脈流域に浸潤したアロ免疫応答T細胞がIFN- $\gamma$ を介して近傍のHCV感染肝細胞内のHCV増幅を抑制することを明らかとした。この現象に基づき、組織傷害を引き起こすことなく、抗ウイルス因子/IFN- $\gamma$ を産生するNK/NKT細胞を肝臓に誘導する新規抗HCV免疫細胞療法を考案した。本研究は、自然免疫細胞であるNK/NKT細胞による抗HCV治療効率を高める目的で、末梢血CD56<sup>+</sup>細胞、CD34<sup>+</sup>造血幹細胞あるいはiPS細胞から、NK/NKT細胞を効率的に誘導する技術を開発するものである。平成22年度の研究成果は、末梢血CD56<sup>+</sup>細胞由来増殖NK/NKT細胞のHCV複製抑制効果をHCV肝炎感染ヒト肝細胞キメラマウスを用い解析したこと、末梢血CD34<sup>+</sup>幹細胞からNK/NKT細胞の誘導法を確立し、HCV複製抑制効果を*in vitro*で確認したこと、さらに臨床に類似したアニマルテストティングを目的にヒト肝細胞/類洞内皮細胞キメラマウスを作製したことで、計画通りに順調に進行している。

#### E. 結論

- 末梢血CD56<sup>+</sup>細胞からNK/NKT細胞を培養増殖し、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いHCV複製抑制効果を確認できた。

- 末梢血CD34<sup>+</sup>幹細胞からCD56<sup>+</sup>細胞の誘導法を確立し、*in vitro*でのHCV複製抑制効果の誘導に成功した。
- 臨床に類似したアニマルテストティングを目的に、ヒト肝細胞/類洞内皮細胞キメラマウスを作製した。
- 自然免疫細胞誘導のためのiPS細胞誘導効率の改善を目的として、クロマチン修飾酵素遺伝子移入の効果を検討した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

分担研究報告書に記載したため、ここでは省略する。

#### H. 知的所有権の取得状況

分担研究報告書に記載したため、ここでは省略する。

## Ⅱ. 分担研究報告

## 自然免疫細胞リモデリングによるウイルス性肝炎の新規治療法の開発

研究代表者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授  
研究分担者 茶山一彰 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授  
田原栄俊 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授  
田中純子 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授  
渕本康史 慶應義塾大学医学部小児外科 講師

**研究要旨** 肝癌合併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、移植後生体防御能の抑制により癌再発の危険性が助長される。我々は肝グラフト灌流排液から大量の未成熟natural killer (NK) 細胞が分離し、強い抗癌分子(TRA II)を誘導することに成功し、制癌免疫療法として臨床導入した。さらに肝灌流排液からIFN- $\gamma$ 産生NK/NKT細胞の誘導法を開発し、HCV性肝硬変患者に対する肝移植後に移入したところ、術後のHCV RNA量は有意に減少し、HCVが完全に排除され完治したケースも経験した。本研究は自然免疫細胞による抗HCV治療効率を高める目的で、末梢血CD56<sup>+</sup>細胞成、CD34<sup>+</sup>造血幹細胞あるいは人工多機能幹(iPS)細胞から、NK/NKT細胞を効率的に誘導する技術を開発する。

### A. 研究目的

本邦における肝癌死亡数は現在年間3万人を超え、その殆どがウイルス性肝炎などの基礎疾患を有する。ウイルス性肝炎罹患率の高い当地域においてはことさら深刻で、広島大学の学際的・先端的研究活動活性化の一環として「肝臓プロジェクト研究センター」が設置された所以である。我々は、肝移植後のアロ応答と抗HCV応答とのクロストーク機構に関わる新知見に基づき(図1)、肝内在NK/NKT細胞を用いた養子免疫療法によるHCVの根治療法の発想に至った。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

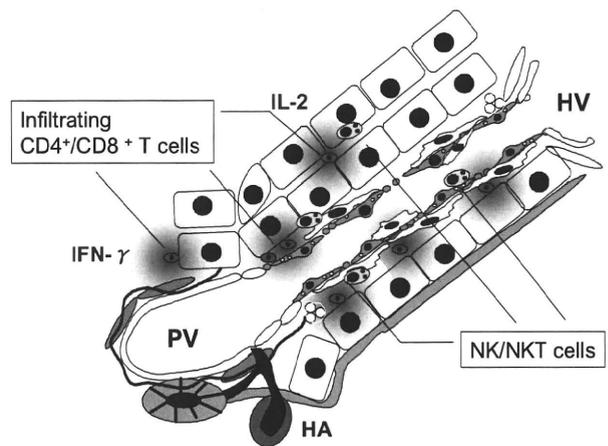


図1. 肝移植後のアロ応答と抗HCV応答とのクロストーク機構。アロ応答CD4<sup>+</sup>T細胞から産生されるIL-2により、肝内在NK/NKT細胞が活性化し、近傍のHCV感染肝細胞内でのHCV複製をIFN- $\gamma$ 依存性に抑制する。

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/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 HCV 複製抑制効果を誘導し得た (特開 2007-332103)。

本研究は、末梢血 CD56<sup>+</sup>細胞、末梢血造血幹細胞や iPS 細胞から誘導したりモデリング NK/NKT 細胞の移入療法により、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ことで、HCV 肝炎の根治を図ることを目的とする。肝疾患動物実験モデルとして、本研究グループが独自に開発した HCV 肝炎感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いる。

平成 22 年度の研究目的は、末梢血 CD56<sup>+</sup>細胞由来増殖 NK/NKT 細胞の HCV 複製抑制効果を HCV 肝炎感染ヒト肝細胞キメラマウスを用い解析することと、末梢血 CD34<sup>+</sup>幹細胞から NK/NKT 細胞の誘導法を確立し、HCV 複製抑制効果を *in vitro* で解析することである。

## B. 研究方法

### 末梢血由来増殖 NK/NKT 細胞の HCV 複製抑制効果の解析 (担当 大段・茶山・田中)

まず、末梢血 CD56<sup>+</sup>細胞の増殖法を確立するために、有効な培養系を検討した。健常人ボランティアから採取した末梢血単核球を、10%FBS 添加の RPMI1640 メディウム、あるいはヒト単球、マクロファージ、リンパ球、NK 細胞の増殖に有効とされている X-VIVO15 メディウム (5%自己血清添加あるいは非添加) を用い、IL-2 と抗 CD3 抗体の存在下で培養した。28 日間培養後の細胞生存率、細胞増殖率を検討し、またフローサイトメトリーで誘導

した細胞のフェノタイプの評価と TRAIL 表出強度、IFN- $\gamma$  産生能を解析した。抗腫瘍効果判定は、HCC 株の HepG2 を標的とする細胞傷害性試験を <sup>51</sup>Cr リリースアッセイを用いて評価した。抗 HCV 効果判定は、HCV レプリコン細胞を用いダブルチャンバーシステムによるルシフェラーゼアッセイでウイルス増幅抑制効果を検討した。同時に培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度を ELISA で解析した。

次に、u-PA Transgenic/*SCID* マウスに、ヒトの肝細胞を移植して作製したヒト肝細胞キメラマウスに HCV RNA 高値患者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。末梢血リンパ球を IL-2/抗 CD3 抗体の存在下で 4 週間培養すると、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK 細胞と CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT 細胞が増殖し、80%の純度で回収可能で、IFN- $\gamma$  依存性抗 HCV 効果を誘導し得る。この自然免疫細胞を HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに移入し、HCV 複製抑制効果のアニマルテスティングを行った (図 2)。すなわち、キメラマウス血清中の HCV RNA 量を指標として抗 HCV 効果を解析した。

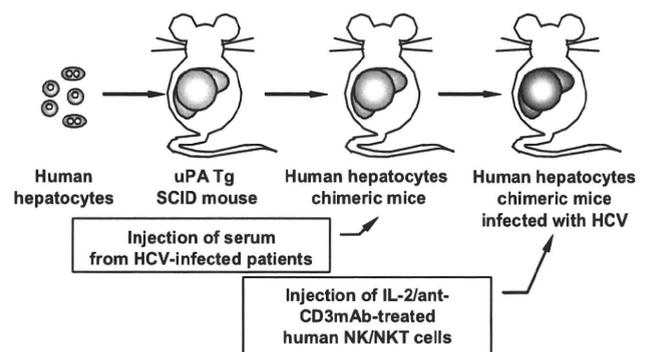


図 2. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた末梢血 CD56<sup>+</sup>細胞由来培養 NK/NKT 細胞の抗 HCV 効果の解析

## CD34<sup>+</sup>幹細胞由来 NK/NKT 細胞の HCV 複製抑制機構の解明 (担当 大段・澁本・田原)

NK/NKT 細胞は、末梢血 CD34<sup>+</sup>造血幹細胞から分化・誘導が可能である。HCV レプリコン保持肝細胞株とヒト末梢血 CD56<sup>+</sup>NK/NKT 細胞を混合培養すると、培養上清中への HCV コア抗原の遊離量が抑制される。この解析系を用い、造血幹細胞から誘導した NK/NKT 細胞の HCV 複製抑制効果を解析した。

また、肝移植時に採取される肝グラフト灌流排液から CD34<sup>+</sup>造血幹細胞を分離し CD56<sup>+</sup>NK 細胞に分化させ、HCV レプリコン保持肝細胞株を用い抗 HCV 効果を検討した。

### C. 研究結果

#### 末梢血由来増殖 NK/NKT 細胞の HCV 複製抑制効果の解析

培養液の検討結果、IL-2/抗 CD3 抗体を加えた自己血清添加の X-VIVO メディウムが、最も効率よく末梢血から CD56<sup>+</sup>細胞を増殖することができた。28 日後の培養細胞のフェノタイプ解析では、大部分が CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞あるいは CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>細胞であり、その比率には個人差があった。HepG2 に対する抗腫瘍活性の検討結果では、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>細胞いずれにおいても強い細胞傷害性を示した。フローサイトメトリーによる誘導 CD56<sup>+</sup>細胞上の TRAIL 表出の増強と、抗 TRAIL ブロッキング抗体添加による細胞傷害性の減弱から、抗 HCC 効果は TRAIL 分子を介するものと考えられた。HCV レプリコンアッセイによ

る抗 HCV 効果解析では、誘導細胞中に CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞/CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>細胞の比率が高いほど、ウイルス増幅抑制能も高い傾向を示した。しかし、誘導細胞に抗 CD3 抗体によりパルス刺激を加えると、その比率によらず高い抗 HCV 効果を獲得し得ることが確認できた。細胞内サイトカイン染色によるフローサイトメトリーの解析では、誘導 CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞は、CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>細胞に比べ IFN- $\gamma$  産生能が高いが、抗 CD3 抗体パルス刺激によって両細胞群は同等の IFN- $\gamma$  産生能を獲得することが分かった。また、レプリコンアッセイの培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度は、抗 CD3 抗体の添加により上昇していた。この抗 HCV 効果は、抗 IFN- $\gamma$  中和抗体を添加することで減弱を認めたことから、IFN- $\gamma$  に依存するものと考えられた (図3)。このように、末梢血から増殖した CD56<sup>+</sup>細胞は、抗 HCC、抗 HCV 効果が確認でき、免疫細胞療法として、今後臨床応用し得る可能性が示唆された。

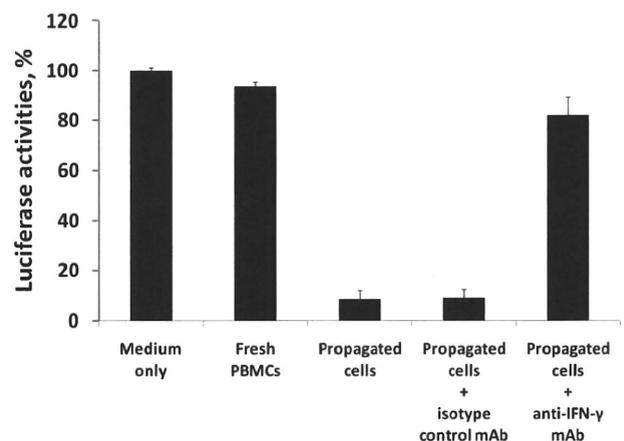


図3. IL-2/anti-CD3mAb存在下で28日間培養することにより末梢血由来CD56<sup>+</sup>細胞の抗HCV活性がIFN- $\gamma$ 依存性に上昇する。

末梢血から 28 日培養した後増殖した CD56<sup>+</sup>細胞を HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに  $60 \times 10^6$  個/日、5 日間移入すると、HCV が消失した (図 4)。

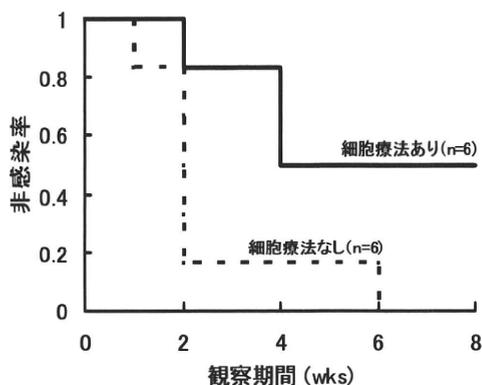


図 4. Propagated CD56<sup>+</sup>細胞移入/非移入によるヒト肝細胞キメラマウスの HCV 感染実験

#### CD34<sup>+</sup>血液幹細胞由来 NK/NKT 細胞の HCV 複製抑制機構の解明

末梢血単核球から磁気ソーティングにより CD34<sup>+</sup>細胞を分離すると純度は 85~90%であった。また、CD56<sup>+</sup>細胞の混入は全く認めなかった。この CD34<sup>+</sup>細胞を 4 種類のサイトカインの存在下で培養した。すなわち Stemline II 培養液に、造血幹細胞の自己複製における重要なシグナル伝達機構に参与する Flt3-L と SCF、および NK 細胞への分化を誘導する IL-15/IL-7 を添加し (全て 20ng/ml)、18 日間培養すると約 100 倍に増殖し、約 50-60%が CD56<sup>+</sup>細胞に分化した (図 5)。

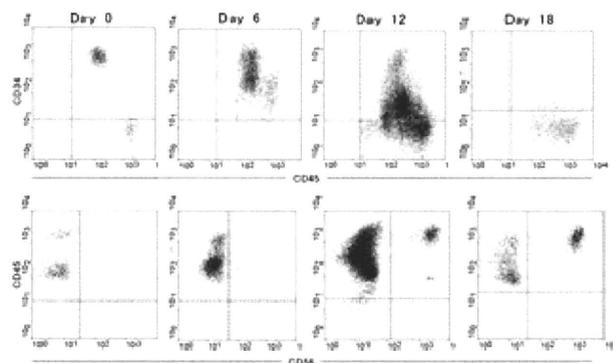


図 5. 末梢血 CD34<sup>+</sup>細胞からのリモデリング:培養期間における Phenotype の経時的変化 (CD34/CD45/CD56)

分化増殖した CD56<sup>+</sup>細胞と HCV レプリコン細胞を用いダブルチャンバーシステムによるルシフェラーゼアッセイでウイルス増幅抑制効果を検討した結果、有意な抑制効果を確認した。

同様の研究を脳死ドナーから得られるリンパ組織を用いて行った。平成 22 年 7 月 1 日に日本で脳死移植法案が改正になり、日本での脳死移植件数は増加の一途をたどっている。脳死ドナーから提供された検体を用いた抗 HCV 細胞療法の可能性を検討すべく、厚生労働科学研究費補助金の研究推進事業である外国への日本人研究者派遣事業 (財団法人 ウイルス肝炎研究財団) に 1 名の研究協力者を脳死肝移植件数の豊富なマイアミ大学に派遣した (広島大学 田中友加)。マイアミ大学は、主任研究者 (大段) のグループと「脳死ドナー肝灌流液由来 NK/NKT 細胞移入療法による肝癌再発予防」について共同研究 (FDA 承認済) を推進中である。5 例の脳死ドナーからの肝灌流液および末梢血、脾臓リンパ球を採取し IL-2 で刺激することにより抗 HCV 効果のある NK 細胞が誘導可能であるか、また、各々から CD34<sup>+</sup>幹細胞を分離、長期

培養することにより NK 細胞のリモデリングが可能であるか否かを検討した。その結果、個人差はあるものの脳死ドナーから採取した肝灌流液由来 NK 細胞は生体ドナーと同様に IL-2 刺激により抗 HCV 効果を有していた。また、CD34<sup>+</sup>細胞からの NK 細胞リモデリングも可能で、培養 28 日目に得られた NK 細胞は HCV レプリコン細胞を用いたルシフェラーゼアッセイによる HCV 増幅抑制効果を示した (図 6)。

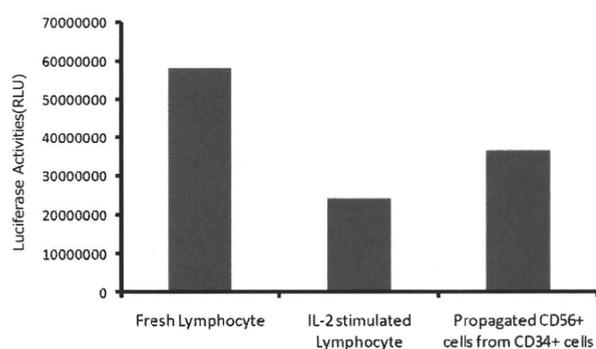


図 6. CD34<sup>+</sup>細胞から誘導した CD56<sup>+</sup>細胞は、HCV 感染レプリコン細胞の HCV 増幅抑制効果を示した。

#### D. 考察

HCV 性肝硬変に対する肝移植後の再発 C 型肝炎の進行は、移植患者以外と比較すると急速である事が分かっている。HCV 陰性患者では術後急性拒絶反応は予後と関連しないのに対し、HCV 陽性の移植患者における急性拒絶反応は予後不良因子とされている。HCV 肝炎合併例では免疫抑制療法がウイルスの増勢を助長するためと理解されている。したがって、急性拒絶反応と C 型肝炎再発、あるいはその他の原因とを的確に鑑別し、必要最低限の免疫抑制療法を実施するため、患者個々の免疫状態を把握することが重要であ

る。我々は、移植前後の免疫監視法として carboxyfluorescein diacetate succimidyl ester (CFSE) 細胞質染色とマルチパラメーターフローサイトメトリーを応用した mixed lymphocyte reaction assay (以後、CFSE-MLR と略す) を臨床導入している。CFSE 色素は細胞傷害性なく細胞内蛋白を染色し、細胞分裂回数に比例して色素が半減化する性質を有し、アロ反応性リンパ球の表面マーカーと同時に precursor frequency、mitotic index や stimulation index の定量化が可能である。CFSE-MLR により HCV 罹患肝移植患者の T 細胞のアロ応答性と HCV 複製について解析したところ、両者は密接に関係し増減することを確認した。すなわち、C 型肝炎患者に対する生体肝移植症例 12 例において術後 3 ヶ月以内 (IFN 治療開始前) に施行した 31 回の CFSE-MLR からもとめた抗ドナー CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD8<sup>+</sup>T 細胞 stimulation index と CFSE-MLR 施行時の HCV RNA 量を比較したところ、それぞれ有意な逆相関が確認された。しかし、抗サードパーティ応答と CD4<sup>+</sup>T 細胞あるいは CD8<sup>+</sup>T 細胞の stimulation index と HCV RNA 量の間には、相関関係を認めなかった。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可能性を示唆する。

次に、アロ免疫と抗 HCV 免疫との間の交差応答の可能性を検証するべく、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 (MLR) 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。抗 HCV 液性因子の解析結果から、C 型肝炎肝移植患者では、アロ免疫応答により産生される IFN- $\gamma$  が近傍の HCV 感染肝細胞内の HCV 複製を抑制するものと考えられた。移植肝の門脈流域に浸潤したアロ免疫応答 CD8<sup>+</sup>T 細胞からは IFN- $\gamma$  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。さらに、門脈流域に浸潤したアロ免疫応答 CD4<sup>+</sup>T 細胞からは IL-2 が産生されるが、近傍に存在する NK/NKT 細胞は IL-2 刺激により活発に IFN- $\gamma$  を産生し、抗 HCV 効果を発揮するものと考えられる。また、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/IFN- $\gamma$  を産生する NK/NKT 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 IL-2 と抗 CD3 抗体の存在下で長期培養し、IFN- $\gamma$  依存性抗 HCV 効果を持つ増殖性 CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK 細胞と CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT 細胞の誘導に成功した。しかし、抗 HCV 活性を獲得したりモデリング NK/NKT 細胞のテロメラゼ活性は低下し、生体投与後の細胞寿命は制限される。そこで、本研究では末梢血 CD34<sup>+</sup>造血幹細胞や iPS 細胞から、テロメラゼ活性が維持された NK/NKT 細胞を効率的に誘導する技術を開発する。本年度

は計画通り末梢血 CD34<sup>+</sup>造血幹細胞から NK 細胞の誘導に成功し、その抗 HCV 効果を確認できた。来年度は iPS 細胞からの NK/NKT 細胞の誘導法の確立とヒト肝細胞キメラマウスを用いたリモデリング NK/NKT 細胞の抗 HCV 効果解析を行う予定である。また、移入する NK/NKT 細胞とキメラマウスの肝細胞との組織適合性抗原のミスマッチの程度と抗 HCV 効果の関連性を解析することで、細胞療法を臨床応用するための効果的な細胞ソースを判定する。また、細胞移入療法と IFN- $\alpha$  や IFN- $\beta$  あるいは抗ウイルス剤との併用効果を解析する。

#### E. 結論

末梢血 CD56<sup>+</sup>細胞から NK/NKT 細胞を培養増殖し、HCV 肝炎感染ヒト肝細胞キメラマウスを用い HCV 複製抑制効果を確認できた。末梢血 CD34<sup>+</sup>幹細胞から NK 細胞の誘導法を確立し、*in vitro* での HCV 複製抑制効果の誘導に成功した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kobayashi T, Itamoto T, Tashiro H, Amano H, Oshita A, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Ohdan H. Tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2011; 29: Epub ahead of print.
2. Doskali M, Tanaka Y, Ohira M, Ishiyama K, Tashiro H, Chayama K, Ohdan H. Possibility of adoptive

- immunotherapy with peripheral blood-derived CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> cells for inducing antihepatocellular carcinoma and antihepatitis C virus activity. *J Immunother.* 2011; 34(2):129-138.
3. Ushitora Y, Tashiro H, Takahashi S, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Chayama K, Ohdan H. Splenectomy in chronic hepatic disorders: portal vein thrombosis and improvement of liver function. *Dig Surg.* 2011;28(1):9-14.
4. Kawaoka T, Hiraga N, Takahashi S, Takaki S, Mitsui F, Tsuge M, Nagaoki Y, Kimura Y, Hashimoto Y, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. 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.
5. Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ohdan H. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. *J Immunol.* 2010;184(6):3269-3275.
6. Yoshida M, Ikeda S, Sumitani D, Takakura Y, Yoshimitsu M, Shimomura M, Noma M, Tokunaga M, Okajima M, Ohdan H. Alterations in portal vein blood pH, hepatic functions, and hepatic histology in a porcine carbon dioxide pneumoperitoneum model. *Surg Endosc.* 2010;24(7):1693-1700.
7. 田中友加, 大段秀樹. 【B型肝炎・肝移植後の再発予防法の現状】高力価HBs抗体含有免疫グロブリン大量投与のアロ免疫応答に対する影響. *今日の移植.* 2011;24(1):103-107.
8. 大段秀樹. 【肝胆膵薬物治療学の進歩この30年】肝臓分野 肝移植 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;6:1182-1187.
9. 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.
10. 大段秀樹. ネオーラル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.
11. 大段秀樹. 【抗体関連型拒絶反応の病理と臨床】B細胞 lineage と抗体性拒絶反応の制御. *移植.* 2010;5:434-440.
12. 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.
13. 大段秀樹. 肝臓外科と肝内在免疫制御細胞. *Minophagen Medical Review.* 2010;3:193-205.
14. 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の最近の話題】 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;8:771-774.
15. 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.
16. 大段秀樹. 【Liver Transplant Frontier】 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.
17. 田代裕尊, 石山宏平, 大平真裕, 天野尋暢, 井手健太郎, 大下彰彦, 小林剛, 尾上隆司, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田沢宏文, 浅原利正, 大段秀樹. 生体肝移植における術後感染症とドナー肝由来活性化 natural killer 細胞療法による感染予防対策. 日本外科感染症学会雑誌. 2010;7(2):89-94.
18. Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. Journal of hepatology. 2010;53:439-443.
19. Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. Journal of gastroenterology and hepatology. 2011;26:13-18.
20. Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. Gut. 2011;60:261-267.
21. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. The Journal of general virology. 2010;91:1668-1677.
22. Kawaoka T, Hayes CN, Ohishi W, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Tsuge M, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kumada H, Chayama K. Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b. Journal of hepatology. 2011;54:408-414.
23. Noda I, Kitamoto M, Nakahara H, Hayashi R, Okimoto T, Monzen Y, Yamada H, Imagawa M, Hiraga N, Tanaka J, Chayama K. Regular surveillance by imaging for early detection and better prognosis of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus. Journal of gastroenterology. 2010;45:105-112.

24. Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Kubo M, Tsunoda T, Hayes CN, Kumada H, Nakamura Y, Chayama K. ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy--a genome-wide study of Japanese HCV virus patients. *Gastroenterology*. 2010;139:1190-1197.
25. Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, Abe H, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Mori N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, Chayama K. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *The Journal of general virology*. 2010;91:1854-1864.
26. Tsuge M, Noguchi C, Akiyama R, Matsushita M, Kunihiro K, Tanaka S, Abe H, Mitsui F, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, Chayama K. G to A hypermutation of TT virus. *Virus research*. 2010;149:211-216.
27. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Matsunaga J, Takahashi R, Takata T, Shimamoto A, Ochiya T, and Tahara H. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011; 193(2) : 409-424.
28. Matsumoto Y, Miyamoto T, Sakamoto H, Izumi H, Nakazawa Y, Ogi T, Tahara H, Oku S, Hiramoto A, Shiiki T, Fujisawa Y, Ohashi H, Sakemi Y, Matsuura S. Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly. *DNA Repair (Amst)*. 2011;10:314-321.
29. Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiyaama A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Ohno H, Kamata H, Tahara H, Isobe T, Nishimura F, Katagiri H, Oka Y, Fukushima T, Takahashi SI, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Pin1 associates with and induces translocation of CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2010;285:33018-33027.
30. Shinohara K, Sannohe Y, Kaieda S, Tanaka K, Osuga H, Tahara H et al. A chiral wedge molecule inhibits telomerase activity. *J Am Chem Soc*. 2010; 132(11) :3778-3782.
31. Waki K, Anno K, Ono T, Ide T, Chayama K, Tahara H. Establishment of functional telomerase immortalized human hepatocytes and a hepatic stellate cell line for telomere-targeting anti-cancer drug development. *Cancer Science*. 2010, 101(7) 1678- 1685.
32. Kusumoto-Matsuo R, Opresko PL, Ramsden D, Tahara H, Bohr VA. Cooperation of DNA-PKcs and WRN helicase in maintenance of telomeric D-loops. *Aging (Albany NY)*.

2010;2 (5) :274-284.

33. Kumada T, Toyoda H, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamoti A, Tada T, Tanaka J, Yoshizawa H. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. J Gastroenterol. Published Online: December 07, 2010

34. Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Hashimoto Y, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Takahashi S, amada K, Kitamoto M, Nakanishi T, Ishikawa M, Hieda M, Kakizawa H, Tanaka J, Chayama K. Transcatheter chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma and comparison of five staging systems. Hepatology Research. 2010; 40: 1082-1091.

35. 田中純子, 松尾順子. ウイルス肝炎の疫学, 最新医学, 2010, 65: 13-20.

36. 田中純子, 片山恵子. B型およびC型肝炎ウイルス感染. 治療学. 2010, 44: 14-17.

37. 田中純子. スクリーニングの理論. 予防医学指導士テキスト. 2010, 145-150.

38. Yamada Y, Hoshino K, Shimojima N, Shinoda M, Obara H, Kawachi S, Fuchimoto Y, Tanabe M, Kitagawa Y, Morikawa Y. Idiopathic hypereosinophilic syndrome in a case with ABO-incompatible liver transplantation for biliary atresia complicated by portal vein thrombosis. Pediatr Transplant. 2010

Aug;14 (5) :e49-53.

39. Fuchimoto Y, Mori M, Takasato F, Tomita H, Yamamoto Y, Shimojima N, Hoshino K, Koinuma G, Morikawa Y. A long-term survival case of tracheal agenesis: management for tracheoesophageal fistula and esophageal reconstruction. Pediatr Surg Int. 2011 Jan;27(1):103-106.

40. Fuchimoto Y, Tomita H, Takasato F, Yamamoto Y, Mori M, Shimojima N, Hoshino K, Hokuto I, Ikeda K, Morikawa Y. Survival of a congenital ileal atresia infant weighing 359g at birth after laparotomy. Pediatric Int. 2011 Feb;53(1):127-128.

## 2. 学会発表

1. Ohdan H, Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Chayama K, Asahara T. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived NK/NKT cells promotes host innate immunity and has anti-HCC, anti-HCV, and anti-infectious effects after liver transplantation. American Transplant Congress. San Diego, 2010

2. Doskali M, Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. Possibility of adoptive immunotherapy with CD56+ propagated cells for inducing anti HCV activity. 第28回日本肝移植研究会 広島. 2010

3. 田中友加, 大平真裕, 石山宏平,

- Marlen Dorskali, 田代裕尊, 大段秀樹. ドナー肝由来活性化 NK/NKT 細胞を用いた肝癌肝移植後の養子免疫細胞療法. 第 20 回日本サイトメトリー学会学術集会. 東京, 2010
4. 堀田龍一, Dorskali Marlen, 田中友加, 五十嵐友香, 橋本慎二, 平田文宏, 寺岡義布史, 山下正博, 田澤宏文, 番匠谷将孝, Basnet Nabin, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. IL-2/OIK3 刺激により活性化された末梢血由来 CD56+細胞の HCV 増殖抑制効果と抗腫瘍効果. 第 46 回日本移植学会総会. 京都, 2010
5. 茶山一彰. B 型慢性肝炎の治療, 第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010
6. 今村道雄, 越智秀典, 茶山一彰. C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療における IL28 多型と Core 領域変異の影響, 第 96 回日本消化器病学会総会. 新潟, 2010
7. 茶山一彰. C 型肝炎の最新情報, 第 46 回日本肝臓学会総会 ランチョンセミナー1. 山形, 2010
8. 今村道雄, 越智秀典, 茶山一彰. C 型慢性肝炎患者における IL28 多型とウイルス側および宿主側因子との関連, 第 46 回日本肝臓学会総会. 山形, 2010
9. 河岡友和, 高橋祥一, 田代裕尊, 大段秀樹, 茶山一彰. 肝移植後 C 型肝炎再燃に対する IFN 治療の現況と SVR 率改善のための検討, 第 46 回日本肝臓学会総会. 山形, 2010
10. 石田友希, 兵庫秀幸, 石飛朋和, 鍋島由宝, 長沖祐子, 橋本義政, 片村嘉男, 河岡友和, 高木慎太郎, 脇 浩司, 平松 憲, 川上由育, 相方 浩, 高橋祥一, 茶山一彰. 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における肝線維化と糖代謝異常の関連性について. 第 46 回日本肝臓学会総会. 山形, 2010
11. 阿部弘美, 越智秀典, 柘植雅貴, 三木大樹, 光井富貴子, 平賀伸彦, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰. C 型慢性肝炎患者に対する PegIFN/RBV 療法の治療効果と IL28locus の SNP および肝内 IFN 誘導遺伝子発現量の関連, 第 46 回日本肝臓学会総会. 山形, 2010
12. 阿部弘美, 越智秀典, 柘植雅貴, 三木大樹, 光井富貴子, 平賀伸彦, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰. IL28 の多型と C 型慢性肝炎の炎症、繊維化、 $\gamma$ GTP との関連, 第 46 回日本肝臓学会総会. 山形, 2010
13. 北本幹也, 井川 敦, 松本陽子, 山田博康, 川上由育, 茶山一彰. Genotype1b・高ウイルス量以外の C 型慢性肝炎に対する Response-guided therapy, 第 46 回日本肝臓学会総会. 山形, 2010
14. 大石和佳, 吉田健吾, 林 奉権, 楠洋一郎, 藤原佐枝子, 柘植雅貴, 茶山一彰. C 型肝炎ウイルス感染における HLA DRB1 と NKG2D 遺伝子多型の影響, 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形, 2010
15. 茶山一彰. C 型慢性肝炎の治療の予測因子, 第 28 回犬山シンポジウム, 愛知, 2010
16. Chayama K. Personalized Medicine in Chronic Hepatitis B, TASP 2010 Single Topic Conference. 台北, 2010

17. 茶山一彰. B型・C型肝炎合併CKD患者におけるステロイド薬、免疫抑制薬使用に関する考え方. 第40回日本腎臓学会西部学術大会. 広島, 2010
18. 茶山一彰. C型慢性肝炎の最新の治療. 第239回世羅郡医師会学術講演会, 広島, 2010
19. 茶山一彰. Hepatitis C Virus Replication and Response to Antiviral Drugs in Human Hepatocyte Chimeric Mice. 第7回アジア太平洋肝臓病学会議 (APASL) シングルトピックカンファレンス. 千葉, 2010
20. 柘植雅貴, 今村道雄, 茶山一彰. B型慢性肝炎における核酸アナログ治療中止例の検討. 第14回日本肝臓学会大会 第52回日本消化器病学会. 横浜, 2010
21. 越智秀典, 今村道雄, 茶山一彰. C型慢性肝炎治療効果に対するゲノムワイドSNP関連解析-IL28B遺伝子多型とHCVウィルスゲノム変異に関連して. 第14回日本肝臓学会大会 第52回日本消化器病学会. 横浜, 2010
22. 長沖祐子, 相方 浩, 橋本義政, 片村嘉男, 河岡友和, 高木慎太郎, 脇 浩司, 平松 憲, 今村道雄, 川上由育, 高橋祥一, 茶山一彰. C型肝炎に対するIFN SVR後肝発癌に対する局所治療後の再発. 予後の検討. 横浜, 2010
23. 相方 浩, 長沖祐子, 橋本義政, 片村嘉男, 河岡友和, 高木慎太郎, 脇 浩司, 平松 憲, 今村道雄, 川上由育, 高橋祥一, 茶山一彰. C型肝炎IFN SVR後の肝臓サーベイランスについての検討. 第14回日本肝臓学会大会. 横浜, 2010
24. Tsuge M, Kohno T, Abe H, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. Identification of Novel Hepatitis C Virus Deletion Mutants in Chronic Hepatitis C Patients. THE 61TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES. Boston, 2010
25. 須藤優樹, 坂田豊典, 田原栄俊. スプライシングファクターSF3B3阻害による抗がん作用機序の可能性. 第14回日本がん分子標的治療学会. 東京, 2010
26. 玉置彩, 落谷孝広, 頼岡徳在, 田原栄俊. 腎臓疾患における血液中miRNAの網羅的検出法の至適化. 第2回日本RNAi研究会. 広島, 2010
27. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Takata T, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H. ヒトの老化におけるmicroRNAの重要性. The 2nd Japanese association for RNA interferences. 広島, 2010
28. 瀧上真吾, 中村垂由美, 山中祐介, 田原栄俊. 細胞老化に関わるHDAC2の転写活性化因子の同定. 第2回RNAi研究会. 広島, 2010
29. 須藤優樹, 坂田豊典, 田原栄俊. スプライシングファクター SF3B3 siRNAによる核酸医薬品の可能性. 第2回日本RNAi研究会. 広島, 2010
30. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Takata T, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H. miR-22 provides a direct link between cellular senescence and tumorigenesis. The 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer