

Hideki Ohdan. Journal of Immunotherapy. 2011 in press.

#### 学会発表

1. 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. Hideki Ohdan, Masahiro Ohira, Kohei Ishiyama, Yuka Tanaka, Marlen Dorskali, Yuka Igarashi, Hirotaka Tashiro, Kazuaki Chayama, Toshimasa Asahara. 2010. American Transplant Congress.
2. Possibility of adoptive immunotherapy with CD56+ propagated cells for inducing anti HCV activity. Dorskali Marlen, Ohira Masahiro, Kohei Ishiyama, Yuka Tanaka, Toshimasa Asahara, Kazuaki Chayama, Hideki Ohdan. 2010. 第28回日本肝移植研究会 広島.
3. 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. 田中友加、大平真裕、石山宏平、Marlen Dorskali、田代裕尊、大段秀樹. 2010. 第20回日本サイトメトリ一学会学術集会
4. IL-2/OKT3 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. 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. 2010. 第46回日本移植学会総会.

#### 分担研究者

(2) 茶山 一彰

##### 発表論文

1. 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. Kawaoka T, Hiraga N, Takahashi S, Takaki S, Mitsui F, Tsuge M, Nagaoki Y, Kimura Y, Hashimoto Y, Katamura Y, Hiramatsu A, Aikata H, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. Scand J Gastroenterol. 2010. 45: 1488-1496.

(3) 立野 知世

##### 発表論文

1. In vitro evaluation of Cytochrome P450 and Glucuronidation activities in hepatocytes isolated from Liver-Humanized mice. Yamasaki C, Kataoka M, Kato Y, Kakuni M, Usuda S, Ohzone Y, Matsuda S, Adachi Y, Ninomiya SI, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K, Tateno C. Drug Metab Pharmacokinet. 2010. Oct 1.

### Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

本研究は、HCV 患者に対する根治療法として、自然免疫細胞移入療法を確立するための前臨床的研究である。*In vitro*で自然免疫NK/NKT細胞をリモデリングし、抗HCV活性を誘導することと、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスに移入して *in vivo*で抗HCV効果を検討することに大別される(図1、2)。

本年度の研究において、末梢血リンパ球分画から CD34<sup>+</sup>造血幹細胞を分離し、Flt3(FMS-like tyrosine kinase 3)、SCF(幹細胞因子)およびIL-15とIL-7を添加した培養液(Stemline II)で培養することで、NK/NKT細胞の誘導に成功した(図3)。我々は、HCVレプリコン保持肝細胞株(Huh-7)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細胞用量に依存して抑制されることはすでに確認している。この解析系を用い、CD34<sup>+</sup>造血幹細胞から誘導したNK/NKT細胞のHCV複製抑制効果を確認し得た。抗HCV機構として、細胞接触は必然ではなく、IFN- $\gamma$ に依存することが明らかとなった。また、誘導したNK/NKT細胞のテロメラーゼ活性は維持されていた。

重度免疫不全マウスとu-PA Transgenicマウス(肝臓特異的にu-PA遺伝子を発現し肝障害を生じる)を掛け合わせたu-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。我々は、末梢血リンパ球を至適濃度のIL-2/抗CD3抗体の存在下で長期培養することで(4週間)、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞とCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>NKT細胞が3000倍以上に増殖し、80%の純度で回収可能で、IFN- $\gamma$ 依存性抗HCV効果を誘導することに成功した。本年度は、この増殖NK/NKT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トを行った。キメラマウス血清中のHCV RNA量は、細胞移入により有意に減少・消失し、HCVの増勢を抑止し得た。

来年度の研究計画である「iPS細胞からNK/NKT細胞の誘導法を確立」に関する研究の準備として、ヒト相同遺伝子であるOCT3/4・SOX2・KLF4・C-MYCをヒト由来線維芽細胞に導入して樹立したヒトiPS細胞を継代培養し、マウス骨髄由来fibroblast/M2-10B4(ATCC)をfeeder細胞に使用して、CD34<sup>+</sup>血液幹細胞への分化誘導法の確立を目指している。

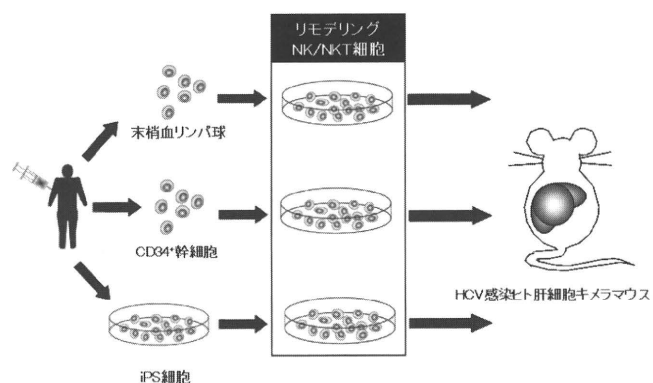


図1. 研究の概要

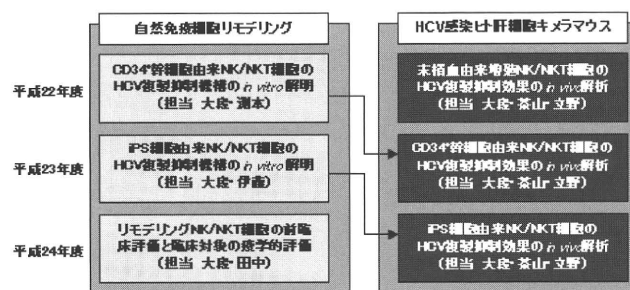


図2. 研究の流れ

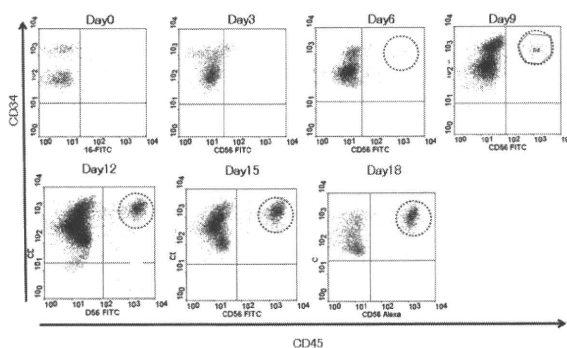


図3. CD34<sup>+</sup>細胞からNK細胞の誘導

## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

H4. 5. 1～5. 3. 31,	国立循環器病院 研究所 レジデント
H5. 4. 1～9. 3. 26,	広島大学大学院 医学系研究科 博士課程 外科系専攻
H9. 4. 1～H12. 3. 10,	Harvard Medical School/Massachusetts General Hospital 留学
H12. 5. 1～H15. 3. 31,	広島大学医学部附属病院 医員
H15. 4. 1～H16. 3. 31,	広島大学医学部附属病院 助手
H15. 7. 1～H19. 3. 30,	広島大学医学部附属病院 学部内講師
H19. 4. 1～H20. 3. 30,	広島大学院医歯薬学総合研究科 講師
H20. 4. 1～	広島大学院医歯薬学総合研究科 教授

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

雨宮 浩 (国立循環器病院)、土肥 雪彦 (広島大学大学院)、浅原 利正 (広島大学)、Megan Sykes (Harvard Medical School)。( ) 内は指導を受けたあるいは共同研究をした研究機関。

### ・主な研究課題

臓器移植医療成績の向上を目指した基礎的研究と臨床移植治療

- 1) T細胞やB細胞のうち、移植ドナー抗原に高親和性のクローンを選択的に抑制する方法の開発
- 2) 拒絶反応の早期診断と感染症との鑑別が可能な“免疫監視法”の開発
- 3) 肝内在免疫担当細胞の機能解明と制御法の開発
- 4) ドナー不足の究極的解決策として期待できる“異種臓器移植”の研究

抗ウイルス治療・抗癌治療効果の向上を目指した基礎的研究と臨床治療

- 1) 自然免疫細胞(NK、NKT、 $\gamma$   $\delta$  細胞)による抗癌治療・抗 HCV 療法の開発
- 2) 免疫制御による HCV 肝炎治療法の開発

### ・これまでの研究実績

発表業績等：

研究実績

- (1) 研究論文数 195 編(欧文 138 編、和文 56編、)
- (2) 著書(レビュー)数 30編(欧文、和文含む)

受賞歴

平成 8 年 第 14 回広島大学医学部広仁会賞

平成 15 年 第7回広島大学医学部広仁会基礎医学研究賞

平成 22 年 CHUGAI Award

(論文業績) 過去5年間の主な論文を以下に示す(研究代表者は下線。\*は Corresponding Author。)  
研究代表者 (大段秀樹)

1. *Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3-CD56+ cells for inducing anti-hepatocellular carcinoma and anti-hepatitis C virus activity.* Marlen Doskali, Yuka Tanaka, Masahiro Ohira, Kohei Ishiyama, Hirotaka Tashiro, Kazuaki Chayama, \*Hideki Ohdan. *Journal of Immunotherapy*. 2011 in press.
2. CDX2 regulates multidrug resistance 1 gene expression in malignant intestinal epithelium. Takakura Y, Hinoi T, Oue N, Sasada T, Kawaguchi Y, Okajima M, Akyol A, Fearon ER, Yasui W, Ohdan H. *Cancer Res*. 2010 Sep 1;70(17):6767-6778.
3. 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. 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. *Scand J Gastroenterol*. 2010 Jul 22.
4. Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. Tahara H, Ide K, Basnet N, Tanaka Y, \*Ohdan H. *Xenotransplantation*. 2010 May;17(3):188-196.
5. Hepatic arterial infusion of liposomal amphotericin B for multiple fungal abscesses in the liver of a patient with chronic granulomatous disease. Ogura T, Kajiume T, Sera Y, Kawaguchi H, Kobatake M, Okamoto N, Ohtsuka Y, Matsumoto K, Morita K, Kobayashi T, Ohdan H, Kobayashi M. *Rinsho Ketsueki*. 2010 May;51(5):345-348.
6. Combination therapy with docetaxel and S-1 as a first-line treatment in patients with advanced or recurrent gastric cancer: a retrospective analysis. Tanabe K, Suzuki T, Tokumoto N, Yamamoto H, Yoshida K, Ohdan H. *World J Surg Oncol*. 2010 May 19;8:40.
7. Gastrointestinal stromal tumors of the small intestine in pediatric populations: a case report and literature review. Shimomura M, Ikeda S, Takakura Y, Kawaguchi Y, Tokunaga M, Takeda H, Sumitani D, Yoshimitsu M, Hinoi T, Okajima M, Ohdan H. *Pediatr Surg Int*. 2010 Jun;26(6):649-654. Review.
8. Comparison of immunohistochemistry assays and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for analyzing hormone receptor status in human breast carcinoma. Oda M, Arihiro K, Kataoka T, Osaki A, Asahara T, Ohdan H. *Pathol Int*. 2010 Apr;60(4):305-315.
9. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, \*Ohdan H. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):3269-3275.
10. Scientific assessment of endoscopic surgical skills. Egi H, Okajima M, Kawahara T, Yoshimitsu M, Sumitani D, Tokunaga M, Takeda H, Itamoto T, Ohdan H. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2010;19(1):30-34.
11. Alterations in portal vein blood pH, hepatic functions, and hepatic histology in a porcine carbon dioxide

- pneumoperitoneum model. Yoshida M, Ikeda S, Sumitani D, Takakura Y, Yoshimitsu M, Shimomura M, Noma M, Tokunaga M, Okajima M, Ohdan H. **Surg Endosc**. 2010 Jul;24(7):1693-1700.
12. Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. \*Ohdan H. **Clin Pharmacol Ther**. 2010 Jan;87(1): 23-26. Review.
13. Successful living donor left liver transplantation by using liver graft with multiple large cysts: a case report. Amano H, Tashiro H, Itamoto T, Oshita A, Niitsu H, Ohdan H, Asahara T. **Transplant Proc**. 2009 Nov;41(9):3923-3926.
14. Remission of splenic volume in the recipient during the course of adult-to-adult living donor liver transplantation: evaluation using multislice computed tomography and semiautomatic software. Ishifuro M, Horiguchi J, Ohshita A, Itamoto T, Ohdan H, Ito K. **Transplant Proc**. 2009 Nov;41(9):3772-3774.
15. Multidisciplinary treatment including sorafenib stabilized the bone metastases of renal cell carcinoma in an immunosuppressed renal transplant recipient. Hasegawa Y, Mita K, Matsubara A, Ohdan H. **Int J Clin Oncol**. 2009 Oct;14(5):465-467.
16. Suppression of hepatocellular carcinoma recurrence after rat liver transplantation by FTY720, a sphingosine-1-phosphate analog. Ushitora Y, Tashiro H, Ogawa T, Tanimoto Y, Kuroda S, Kobayashi T, Miyata Y, Itamoto T, Asahara T, Ohdan H. **Transplantation**. 2009 Oct 27;88(8):980-986.
17. Short disease-free interval is a significant risk factor for intrapulmonary recurrence after resection of pulmonary metastases in colorectal cancer. Takakura Y, Miyata Y, Okajima M, Okada M, Ohdan H. **Colorectal Dis**. 2010 Jul;12(7 Online):e68-75.
18. Hybrid hand-assisted colectomy for transverse colon cancer: a useful technique for non-expert laparoscopic surgeons. Takakura Y, Okajima M, Yoshimitsu M, Hinoi T, Ikeda S, Ohdan H. **World J Surg**. 2009 Dec;33(12):2683-2687.
19. Retroperitoneal abscess complicated with necrotizing fasciitis of the thigh in a patient with sigmoid colon cancer. Takakura Y, Ikeda S, Yoshimitsu M, Hinoi T, Sumitani D, Takeda H, Kawaguchi Y, Shimomura M, Tokunaga M, Okajima M, Ohdan H. **World J Surg Oncol**. 2009 Oct 7;7:74.
20. *Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice.* Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Hiraga N, Imamura M, Sakamoto N, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. **J Clin Invest**. 2009 Nov;119(11):3226-3235.
21. Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells. Yamamoto H, Kitadai Y, Yamamoto H, Oue N, Ohdan H, Yasui W, Kikuchi A. **Gastroenterology**. 2009 Jul;137(1):242-252.
22. Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. Tahara H, Tanaka Y, Ishiyama K, Ide K, Shishida M, Irei T, Ushitora Y, Ohira M, Banshodani M, Tashiro H, Itamoto T, Asahara T, Imamura M, Takahashi S, Chayama K, \*Ohdan H. **Transpl Int**. 2009 Aug;22(8):805-813.
23. ABO-blood type incompatible living donor liver transplantation in a patient with Budd-Chiari Syndrome secondary to essential thrombocythemia. Kawaguchi Y, Tashiro H, Amano H, Kobayashi T, Irei T, Igarashi Y, Ide K, Oshita A, Itamoto T, Asahara T, Ohdan H. **Hepatol Res**. 2009 May

- 1;39(5):520-524.
24. *Significant correlation between spleen volume and thrombocytopenia in liver transplant patients: a concept for predicting persistent thrombocytopenia.* Ohira M, Ishifuro M, Ide K, Irei T, Tashiro H, Itamoto T, Ito K, Chayama K, Asahara T, Ohdan H. *Liver Transpl.* 2009 Feb;15(2):208-215.
25. Reconstruction of the middle hepatic vein tributary with resection of the middle hepatic vein trunk: report of a case. Itamoto T, Fukuda S, Ushitora Y, Ohdan H, Tashiro H, Yamaguchi Y, Asahara T. *Hepatogastroenterology.* 2008 Sep-Oct;55(86-87):1773-1775.
26. Prophylaxis against recurrence of HBV hepatitis after living-donor liver transplantation. Tashiro H, Itamoto T, Fudaba Y, Ohdan H, Fukuda S, Kohashi T, Amano H, Ishiyama K, Ide K, Ogawa T, Shishida M, Irei T, Ushitora Y, Ohira M, Takahashi S, Chayama K, Asahara T. *Hepatogastroenterology.* 2008 Sep-Oct;55(86-87):1746-1749.
27. Using recipient's middle hepatic vein for drainage of the right paramedian sector in right liver graft. Tashiro H, Ohdan H, Itamoto T, Fudaba Y, Amano H, Oshita A, Ishiyama K, Ushitora Y, Irei T, Ohira M, Tahara H, Banshoudani M, Tanimoto Y, Ishifuro M, Asahara T. *Transplantation.* 2008 Dec 15;86(11):1565-1571.
28. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma in elderly patients aged 75 years or more. Oishi K, Itamoto T, Kobayashi T, Oshita A, Amano H, Ohdan H, Tashiro H, Asahara T. *J Gastrointest Surg.* 2009 Apr;13(4):695-701.
29. Engraftment of human hepatocytes in the livers of rats bearing bone marrow reconstructed with immunodeficient mouse bone marrow cells. Igarashi Y, Tateno C, Tanaka Y, Tachibana A, Utoh R, Kataoka M, Ohdan H, Asahara T, Yoshizato K. *Xenotransplantation.* 2008 Jul;15(4):235-245.
30. Role of vascular endothelial growth factor-C and -D mRNA in breast cancer. Teramoto S, Arihiro K, Koseki M, Kataoka T, Asahara T, Ohdan H. *Hiroshima J Med Sci.* 2008 Jun;57(2):73-78.
31. Comparative study of the Japan Integrated Stage (JIS) and modified JIS score as a predictor of survival after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. Luo KZ, Itamoto T, Amano H, Oshita A, Ushitora Y, Tanimoto Y, Ohdan H, Tashiro H, Asahara T. *J Gastroenterol.* 2008;43(5):369-377.
32. Portal vein reconstruction using explanted recipient's native right hepatic vein. Tashiro H, Itamoto T, Amano H, Oshita A, Ohdan H, Asahara T. *Surgery.* 2008 Jul;144(1):105.
33. Role of invariant natural killer T cells in liver sinusoidal endothelial cell-induced immunosuppression among T cells with indirect allospecificity. Shishida M, Ohdan H, Onoe T, Tanaka Y, Igarashi Y, Banshoudani M, Asahara T. *Transplantation.* 2008 Apr 15;85(7):1060-1064.
34. Hepatic venous outflow obstruction after right lateral sector living-donor liver transplantation, treated by insertion of an expandable metallic stent. Tanimoto Y, Tashiro H, Itamoto T, Toyota N, Kohashi T, Amano H, Ohdan H, Ishiyama K, Oshita A, Asahara T. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2008;15(2):228-231.
35. Perioperative management of benign hepatic tumors in patients with glycogen storage disease type Ia. Oshita A, Itamoto T, Amano H, Ohdan H, Tashiro H, Asahara T. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2008;15(2):200-203.

36. Current status of liver transplantation across ABO blood-type barrier. Egawa H, Ohdan H, Haga H, Tsuruyama T, Oike F, Uemoto S, Ozawa K. **J Hepatobiliary Pancreat Surg.** 2008;15(2):131-138.
37. Reconstruction of the middle hepatic vein tributaries draining segments V and VIII of a right liver graft by using the recipient's own middle hepatic vein and vascular closure staples. Tashiro H, Itamoto T, Ohdan H, Oshita A, Fudaba Y, Ishiyama K, Kohashi T, Amano H, Fukuda S, Asahara T. **Surg Today.** 2008;38(3):289-291.
38. Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. Nakagawa T, Kajitani T, Togo S, Masuko N, Ohdan H, Hishikawa Y, Koji T, Matsuyama T, Ikura T, Muramatsu M, Ito T. **Genes Dev.** 2008 Jan 1;22(1):37-49.
39. Splenic artery steal syndrome in living donor liver transplantation: a case report. Shimizu K, Tashiro H, Fudaba Y, Itamoto T, Ohdan H, Fukuda S, Toyota N, Kakizawa H, Ushitora Y, Ogawa T, Asahara T. **Transplant Proc.** 2007 Dec;39(10):3519-3522.
40. Biliary complications after duct-to-duct biliary reconstruction in living-donor liver transplantation: causes and treatment. Tashiro H, Itamoto T, Sasaki T, Ohdan H, Fudaba Y, Amano H, Fukuda S, Nakahara H, Ishiyama K, Ohshita A, Kohashi T, Mitsuta H, Chayama K, Asahara T. **World J Surg.** 2007 Nov;31(11):2222-2229.
41. The persistent elimination of B cells responding to blood group A carbohydrates by synthetic group A carbohydrates and B-1 cell differentiation blockade: novel concept in preventing antibody-mediated rejection in ABO-incompatible transplantation. Irei T, \*Ohdan H, Zhou W, Ishiyama K, Tanaka Y, Ide K, Asahara T. **Blood.** 2007 Dec 15;110(13):4567-4575.
42. Evidence of immune tolerance to blood group antigens in a case of ABO-incompatible pediatric liver transplantation. \*Ohdan H, Zhou W, Tanaka Y, Irei T, Fuchimoto Y, Egawa H, Asahara T. **Am J Transplant.** 2007 Sep;7(9):2190-2194.
43. Microsurgical hepatic artery reconstruction during living-donor liver transplantation by using head-mounted surgical binocular system. \*Ohdan H, Tashiro H, Ishiyama K, Ide K, Shishida M, Irei T, Ohira M, Tahara H, Itamoto T, Asahara T. **Transpl Int.** 2007 Nov;20(11):970-973.
44. Alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs for xenotransplantation: where do we go from here? Cooper DK, Dorling A, Pierson RN 3rd, Rees M, Seebach J, Yazer M, Ohdan H, Awwad M, Ayares D. *Transplantation.* 2007 Jul 15;84(1):1-7. Review.
45. Should splenectomy be performed for hepatitis C patients undergoing living-donor liver transplantation? Tashiro H, Itamoto T, Ohdan H, Fudaba Y, Kohashi T, Amano H, Ishiyama K, Takahashi S, Aikata H, Chayama K, Arihiro K, Asahara T. **J Gastroenterol Hepatol.** 2007 Jun;22(6):959-960.
46. Repeat hepatectomy for recurrent hepatocellular carcinoma. Itamoto T, Nakahara H, Amano H, Kohashi T, Ohdan H, Tashiro H, Asahara T. **Surgery.** 2007 May;141(5):589-597.
47. Possible therapeutic effect of lipid supplementation on neurological complications in liver transplant recipients. Ide K, \*Ohdan H, Tahara H, Ishiyama K, Shishida M, Irei T, Ohira M, Tashiro H, Itamoto T, Asahara T. **Transpl Int.** 2007 Jul;20(7):632-635.

48. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. Ide K, Wang H, Tahara H, Liu J, Wang X, Asahara T, Sykes M, Yang YG, \*Ohdan H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5062-5066.
49. Clinicopathologic features of poorly differentiated hepatocellular carcinoma. Oishi K, Itamoto T, Amano H, Fukuda S, Ohdan H, Tashiro H, Shimamoto F, Asahara T. *J Surg Oncol*. 2007 Mar 15;95(4):311-316.
50. Clinicopathologic features of hepatocellular carcinoma patients with compensated cirrhosis surviving more than 10 years after curative hepatectomy. Fukuda S, Itamoto T, Amano H, Kohashi T, Ohdan H, Tashiro H, Asahara T. *World J Surg*. 2007 Feb;31(2):345-352.
- 51. *Adoptive transfer of TRAIL-expressing natural killer cells prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy.* Ohira M, \*Ohdan H, Mitsuta H, Ishiyama K, Tanaka Y, Igarashi Y, Asahara T. *Transplantation*. 2006 Dec 27;82(12):1712-1719.**
52. Induction of endotoxin tolerance inhibits alloimmune responses. Ishiyama K, \*Ohdan H, Tokita D, Shishida M, Tanaka Y, Irei T, Asahara T. *Transpl Immunol*. 2006 Nov;16(3-4):158-165.
53. Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity. Tokita D, Shishida M, \*Ohdan H, Onoe T, Hara H, Tanaka Y, Ishiyama K, Mitsuta H, Ide K, Arihiro K, Asahara T. *J Immunol*. 2006 Sep 15;177(6):3615-3624.
54. Radiofrequency-assisted partial splenectomy with a new and simple device. Itamoto T, Fukuda S, Tashiro H, Ohdan H, Asahara T. *Am J Surg*. 2006 Aug;192(2):252-254.
55. Characterization of anti-Gal antibody-producing cells of baboons and humans. Xu Y, Yang YG, Ohdan H, Ryan D, Harper D, Wu C, Kruger-Grey HS, Thall AD, Awwad M, Sykes M. *Transplantation*. 2006 Mar 27;81(6):940-948.
56. Near-infrared spectroscopic analysis of hemodynamics and mitochondrial redox in right lobe grafts in living-donor liver transplantation. Mitsuta H, \*Ohdan H, Fudaba Y, Irei T, Tashiro H, Itamoto T, Asahara T. *Am J Transplant*. 2006 Apr;6(4):797-805.
57. Safety of donor right hepatectomy for adult-to-adult living donor liver transplantation. Itamoto T, Emoto K, Mitsuta H, Fukuda S, Ohdan H, Tashiro H, Asahara T. *Transpl Int*. 2006 Mar;19(3):177-183.
- 58. *Difference in cytotoxicity against hepatocellular carcinoma between liver and periphery natural killer cells in humans.* Ishiyama K, \*Ohdan H, Ohira M, Mitsuta H, Arihiro K, Asahara T. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2):362-372.**



## 平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題 : 肝炎ウイルス感染における自然免疫応答の解析と新たな治療標的の探索に関する研究

課題番号 : H22-肝炎一般-010

予定期間 : H22年度からH24年度まで

研究代表者 : 松浦善治

所属研究機関 : 大阪大学

所属部局 : 微生物病研究所

職名 : 教授

年次別研究費(交付決定額) : 1年目 64,480,000円

**I. 研究の意義**

- (1) 全世界には2億人ものHCV感染者が存在する。
- (2) HCV感染は、慢性肝炎、肝硬変、そして肝細胞癌の主要な原因である。
- (3) 現行の治療法の著効率は50%ほどであり新規治療法の開発が急務である。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) HCVの宿主免疫回避機構と持続感染機構を解明する。
- (2) 患者血清由来HCVの細胞培養系を確立する。
- (3) 現行の慢性C型肝炎療法を補完する新しい免疫制御療法の開発が期待される。

**III. 1年間の研究成果**

- ・研究代表者(松浦善治)

慢性C型肝炎患者では血中のヒアルロン酸量や肝臓でのCD44の発現が高いことが知られている。レプリコン細胞でも、ヒアルロン酸の刺激によりIP-10の産生がTLR2とCD44依存的に亢進したことから、慢性C型肝炎の発症に、内在性ヒアルロン酸とCD44の相互作用が示唆された。

- ・研究分担者(竹内 理)

RIG-IのHelicase領域に変異を導入した遺伝子改変マウスは、RIG-I欠損マウスと異なり発生異常を認めなかったが、RNAウイルスに対するI型IFN産生は低下していた。また、核内IκB様分子であるIκBζがウイルス感染時に、IL-12/IL-18依存性に発現し、NK細胞活性化に重要な役割を果たしていることを見いだした。

- ・研究分担者(考藤達哉)

HCV感染者DCでは非感染者に比べて、炎症刺激によるIDO発現が高値であることを明らかにした。また、HCVの複製によってIDO発現は増強するものの、炎症刺激が加わることで、IDO発現は著明に増強することが明らかになった。

- ・研究分担者(藤田尚志)

RIG-Iのアダプター分子であるIPS-1の活性化にはミトコンドリアの融合の制御因子であるMitofusin 1(MFN1)が関与している事を明らかにした。また、RIG-Iを効率的に活性化するHCVのゲノムRNAのAU配列にRHAU蛋白質が細胞質で顆粒状に凝集することから、ウイルスRNAの認識の場である事が示唆された。

- ・分担研究者(瀬谷 司)

C57BL/6 マウスはポリオウイルスに抵抗性だが、TICAM-1 の欠損によって、肝臓、や脾臓などのマクロファージ系細胞が豊富な器官でウイルス価が上昇し、IFN $\beta$  の発現が低下して、死亡することが明らかとなった。

- ・研究分担者(土方 誠)

ヒト初代培養肝細胞における自然免疫機構を解析したところ、感染初期に IRF7 依存的な IFN $\alpha$  の一過性発現誘導が見られ、IFN13 遺伝子の発現誘導が感染後 3 時間後から 12 時間後まで著しく誘導されることを見出した。

- ・研究分担者(小原道法)

polyIC リポソーム製剤は PEG-IFN $\alpha$  の 10 倍投与よりも非常に強力な阻害活性を示した。また、その作用機序は IFN $\lambda$  を介する新規のものであった。

- ・研究分担者(池田正徳)

ヒト肝細胞株の HuH-7 と Li23 の IL28B SNP を検討した。HuH-7 は治療抵抗型の SNP (T/G) であり、Li23 は治療感受性型の SNP (T/T) であった。Li23 で複製する HCV RNA は HuH-7 で複製するものに比べて IFN $\lambda$  の感受性が約 100 倍高いことが示された。

#### **IV. 23~24 年度の課題**

- (1) HCV レプリコン細胞や JFH-1 ウイルス感染細胞における、これまでに同定された、TLR シグナル伝達経路を介した炎症性誘導の影響を解析する。
- (2) RIG-I 活性化における Helicase 活性化メカニズムを解明する。ウイルス感染認識の調節因子の遺伝子欠損マウスを作製し、ウイルス感染応答調節機構を解析する。
- (3) IDO 発現細胞と T 細胞を共培養し、IDO 活性と Th1/Th2/Th17/Treg/Tr1 などへの分化との関連性を明らかにする。pIFN $\alpha$  /RVB 治療を行う C 型慢性肝炎患者を対象として、IDO 発現と免疫細胞の動態との関連を検討する。
- (4) 得られた HCV の感染を許容する新規の自然免疫修飾細胞株を用いて抗 HCV 薬剤のスクリーニングを行う。
- (5) MyD88, TICAM-1, IPS-1, IFNAR などのノックアウトマウス由来細胞に HCV 候補レセプターを発現させ、HCV 感染による自然免疫担当細胞の外因性応答を解析する。
- (6) ヒト不死化肝細胞および初代培養肝細胞における自然免疫系シグナル経路の分子機構と HCV 感染との相互作用を検討し、抗 HCV 効果が期待できる標的分子を同定する。血清由来 HCV の増殖を許容する細胞培養系開発の試みを継続する。
- (7) polyIC リポソーム製剤により IFN $\lambda$  を誘導し、HCV 増殖を阻害する宿主因子を同定する。
- (8) 遺伝子型の異なる HCV RNA 複製細胞を作成し、IFN $\alpha$  / $\lambda$  の処理による JAK/STAT の活性化や ISG の発現を解析する。また、IFN $\lambda$  とオンコスタチン M の相乗効果を検討する。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) HCV の免疫回避機構が解明され、その責任分子を標的とした免疫制御療法は、従来の治療効果を改善することが期待される。
- (2) 保健、医療、福祉の向上に直結するとともに、高齢者医療費の低減に貢献する。

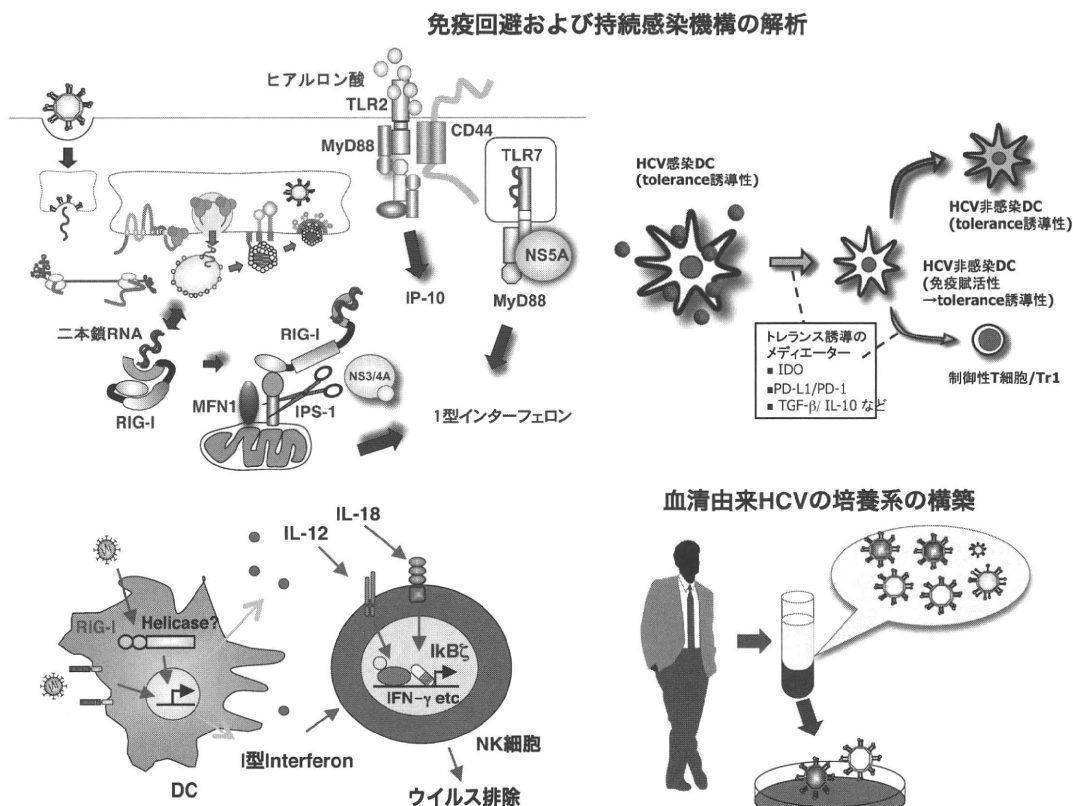
#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

- 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 Miyake T, Satoh T, Kato H, Matsushita K, Kumagai Y, Vandebon A, Tani T, Muta T, Akira S, and Takeuchi O.  $\text{I}\kappa\text{B}\zeta$  is essential for natural killer cell activation in response to IL-12 and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107:17680-17685.
  - 4 Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, and Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1512-1517.
  - 5 Miyagi T, Takehara T, Nishio K, Shimizu S, Kohga K, Li W, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, and Hayashi N. Altered interferon-alpha-signaling in natural killer cells from patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2010;53:424-430.
  - 6 Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, Julkunen I, Namiki H, Yoneyama M and Fujita T.: Virus-Infection or 5'ppp-RNA Activates Antiviral Signal through Redistribution of IPS-1 Mediated by MFN1. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1001012.
  - 7 Oshiumi H, Sakai K, Matsumoto M, and Seya T. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential. *Eur. J. Immunol* 2010; 40: 940-948.
  - 8 Azuma M, Sawahata R, Akao Y, Ebihara T, Yamazaki S, Matsumoto M, Hashimoto M, Fukase K, Fujimoto Y, and Seya T. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *PLoS ONE* 2010; 5: e12550.
  - 9 Kushima H, Wakita T, and Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol* 2010; 84:9118-9127.
  - 10 Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, Hirata Y, Sekiguchi S, Tobita Y, Hayashi Y, Hishima T, Funata N, Yonekawa H, and Kohara M. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* J. *Virol* 2010; 84:303-311.
  - 11 Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, Ikeda M, and Kato N. Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure. *J. Biosci. Bioeng* 2010; 10:374-376.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

ウイルス肝炎感染における自然免疫応答の解析と新たな治療標的の探索に関する研究



- ✓ ヒアルロン酸の刺激によりレプリコン細胞でIP-10の産生がTLR2とCD44依存的に亢進した。(松浦)
- ✓ RIG-IのHelicase領域に変異を導入した遺伝子改変マウスは、RNAウイルスに対するI型IFN産生が低下していた。また、核内IκB様分子であるIκBζがウイルス感染時に、IL-12/IL-18依存性に発現し、NK細胞活性化に重要な役割を果たしていた。(竹内)
- ✓ HCV感染者のDCでは非感染者に比べ、炎症刺激によるIDOの発現が高値であった。(考藤)
- ✓ IPS-1の活性化にMitofusin 1 (MFN1)が関与していた。(藤田)
- ✓ TICAM-1の欠損によってIFNβの発現が低下し、ウイルスの感染によりマウスが致死となった。(瀬谷)
- ✓ ヒト初代培養肝細胞では感染初期にIRF7依存的なIFNαの一過性の発現誘導が見られ、IFN13遺伝子の発現誘導が感染後3時間後から12時間後まで著しく誘導されることを見出した。(土方)
- ✓ polyICリボソーム製剤はPEG-IFNαの10倍量投与よりも強力な抗ウイルス活性を示した。また、その作用機序はIFNλを介するものであった。(小原)
- ✓ ヒト肝細胞株のIL28BのSNPを検討したところ、HuH7細胞は治療抵抗型のSNP (T/G)であり、Li23細胞は治療感受性型のSNP (T/T)であった。Li23細胞で複製するHCV RNAはHuH7で複製するものに比べてIFNλの感受性が約100倍高いことが示された。(池田)

## 研究代表者の研究歴等

### 過去に所属した研究機関の履歴

所 属	職 名	在職期間
第一製薬株式会社中央研究所	研究員	昭和 55 年 4 月-昭和 57 年 7 月
国立予防衛生研究所	研究員	昭和 57 年 8 月-平成 4 年 8 月
オックスフォード大ウイルス学研究所	研究員	昭和 59 年 9 月-昭和 61 年 9 月
国立感染症研究所ウイルス第二部	室長	平成 4 年 8 月-平成 12 年 3 月
大阪大学微生物病研究所	教授	平成 12 年 4 月-現在に至る

### 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

第一製薬株式会社中央研究所	大谷 剛 主幹研究員
国立予防衛生研究所	森田千春 室長
オックスフォード大ウイルス学研究所	David H. L. Bishop 所長
国立感染症研究所ウイルス第二部	宮村達男 部長(現所長)
大阪大学微生物病研究所	森石恒司 准教授

### 主な研究課題

- 1 HCV の感染増殖機構と病原性発現機構の分子生物学的解析。
- 2 慢性C型肝炎の新しい治療法の開発。
- 3 遺伝子治療用新規ウイルスベクターの開発。

### これまでの研究実績

1. *Involvement of PA28 $\gamma$  in the propagation of hepatitis C virus. Moriishi K., Shoji I., Mori Y., Suzuki R., Suzuki T., Kataoka C., and Matsuura Y. Hepatology, 52, 411-420 (2010).*
2. *Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. Tani H., Shiokawa M., Kaname Y., Kambara H., Mori Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. J. Virol., 84, 2798-2807 (2010).*
3. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. Yamashita T., Mori Y., Miyazaki N., Cheng H.R., Yoshimura M., Unno H., Shima R., Moriishi K., Tsukihara T., Li T.C., Takeda N., Miyamura T., and Matsuura Y. *PNAS*, 106, 12986-12991 (2009).
4. 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).
5. 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).
6. 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).
7. Processing of capsid protein by cathepsin L plays a crucial role in replication of the Japanese encephalitis virus in neural and macrophage cells. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8477-8487 (2007).
8. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8601-8612 (2007).
9. Involvement of PA28 $\gamma$ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
10. Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein. Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 80, 11265-11273 (2006).
11. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *EMBO J*, 25, 5015-5025 (2006).
12. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. *Nature*, 441, 101-105 (2006).

## 平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：ウイルス性肝炎に対する治療ワクチンの開発に関する研究

課題番号：H22-肝炎-一般-011

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：小原 道法

所属研究機関：財団法人東京都医学研究機構

所属部局：東京都臨床医学総合研究所

職名：副参事研究員・プロジェクトリーダー

年次別研究費(交付決定額)：1年目 43,400,000 円

## I. 研究の意義

C型肝炎ウイルス(HCV)及びB型肝炎ウイルス(HBV)感染症においては、感染者の肝炎から肝硬変、肝癌への進行をくい止めることが最も重要である。多く用いられているHCV感染者に対するインターフェロン治療は副作用等の問題も大きく、またHBVは現在用いられている核酸アナログ製剤では根治が困難であり、これに変わる根治療法の開発が必要とされている。また、HCV感染に対する免疫反応は感染予防のみならず、感染者における病態ときわめて密接に関連している。このためにHCV特異的免疫反応を誘導もしくは解析することは、HCV感染の進展を阻害するためには極めて重要である。

## II. 研究の目的、期待される成果

本研究では、HCV及びHBV特異的免疫賦活化による根治を目指した治療的ワクチンの開発を目指す。

(1) 特異的免疫反応は一度誘導されれば長期にわたり効果が持続することから、少ない投与回数で効果の持続が期待でき、薬剤耐性や重篤な副作用の問題も克服できるものと期待される。

(2) 本研究では細胞性免疫を効果的に誘導できるDNAワクチンを、すでに一定の効果が認められている組換えワクチニアワクチン(HCV-RVV)と組み合わせることで、さらに強力な治療効果が期待できる。

(3) HCV感染マウスモデルへのHCV-RVVの治療効果を自然免疫系因子の各種KOマウスを使って免疫応答を解析することにより、持続感染化から肝硬変、肝がんの転機をとる機序が明らかになると期待できる。

(4) HCV粒子構成蛋白質のみから構成される1回感染型HCV粒子(HCV<sub>tcp</sub>)の効率の良い産生系を確立することにより、ワクチンで誘導される抗体の各種遺伝子型HCVに対する応答を明らかにする事ができる。

## III. 1年間の研究成果

研究代表者(小原 道法)

(1) 慢性肝炎状態のHCV-Tgマウスに組換えワクチンrVV-N25を単回皮内接種し、接種後1週および4週のマウス肝臓を解析した。接種後1週目ではHCV蛋白発現量に変化はみられなかったものの、肝臓において壊死性細胞浸潤、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性といった慢性肝炎の病態の正常化が認められた。

(2) 4週目では形態異常の正常化に加え、肝臓内のHCV蛋白の減少がみられた。抗CD8抗体および抗CD4抗体の投与によりこのHCV蛋白の排除は見られなくなった。また、HCV蛋白の減少時にALT値の上昇やCTLなどによるHCV発現細胞の排除が認められなかったことから、rVV-N25接種によるHCV蛋白の制御には細胞死を伴わない何らかの蛋白排除機構が働いていることが示唆された。

(3) 肝臓の形態異常は抗CD8抗体および抗CD4抗体を投与したにも関わらず正常化していたことから、病態形成とHCV蛋白排除は別の機序であることが明らかとなった。

研究分担者(保富 康宏)

(1) HCVのすべての遺伝子領域、外殻蛋白領域、非構造蛋白領域の遺伝子を組込んだDNAワクチン(HCV-CN5、HCV-CN2、HCV-N25)を作製した。ウエスタンブロット法により、作製したHCV-DNAワクチンが*in vitro*においてHCV蛋白質を発現させることを確認した。

(2) ELISPOT法によりHCV-DNAワクチンの細胞性免疫誘導能についての評価を行ったところ、HCV-CN2、HCV-N25投与群由来の脾細胞は、それぞれEL-4/CN2、EL-4/N3-4細胞による刺激後、顕著にIFN- $\gamma$ を産生することを確認した。さらに、HCV蛋白発現腫瘍細胞移植マウスモデルを用いた*in vivo*におけるHCV特異的細胞性免疫誘導能についての評価を行ったところ、emp投与群に比べHCV-DNAワクチン投与群で有意に減少

し、マウス体内において HCV 抗原に対して強い細胞性免疫が誘導されていることが認められた。

#### 研究分担者(瀬谷 司)

(1) HCV (JFH1) 株の感染によって Core が DDX3 と結合し、DDX3-IPS-1 複合体を壊し、結果として IFN-beta の誘導活性を阻害することを証明した。

(2) マウス肝細胞に HCV の複製を許容させるために、ヒト CD81 あるいは occludin を導入した IPS-1<sup>-/-</sup> or IFNAR<sup>-/-</sup> マウス肝細胞株を樹立した。これらの細胞株は J6-HCV に感受性となり、HCV のマウス感染系が in vitro で組めるようになった。

#### 研究分担者(鈴木 亮介)

(1) 複数の遺伝子型/株の遺伝子配列を用い、HCV の core から NS2 領域を発現するプラスミドを作製し、非増殖型 HCV 粒子(HCVtcp)を得た。遺伝子型 2a の構造蛋白質を用いた場合、JFH-1 株および J6 株のいずれを用いても、HCVtcp の産生が認められた。1b の構造蛋白質を用いた場合、Con1 株および TH 株においては E1 領域に適合変異を導入する事により、HCVtcp の産生が認められた。

(2) 産生させた HCVtcp と、HCVpp および HCVcc について、抗 CD81 抗体および抗 ApoE 抗体による感染中和を Huh7.5.1 細胞を用いて調べるところ、HCVtcp および HCVcc は抗 CD81 抗体により高い感受性を示した。

#### IV. 23~24 年度の課題

(1) HCV 及び HBV 組換えワクチニアウイルスの接種・解析 (小原道法)

慢性肝炎状態の HCV/Cre-Tg に HCVN25-RVV 及び免疫活性化剤を接種し、排除・正常化効果の増強を目指す。さらに、HCV-RVV を接種したヒト HLA2.1 トランスジェニックマウスの脾細胞を HCV 感染ヒト肝臓キメラマウス(HLA2.1)に移入し、HCV-RVV による賦活化機序を解析する。また、感染性粒子を産生する HBV-Tg に HBV 組換えワクチニアウイルスを接種し、その排除・治療効果を検討する。さらに、その排除・正常化機序について解析する。

(2) HBV, HCV-DNA ワクチンの構築・接種・解析 (保富康宏)

HCV-DNA ワクチンと RVV による prime/boost ワクチンによる併用療法による治療効果機序を解析する。HBV 遺伝子発現 DNA ワクチンを作製し、HBV-Tg に接種し、HBV 蛋白質の排除及びその免疫応答を解析する。

(3) HCV-組換えワクチニアウイルスおよび HCV 発現 DNA ワクチン接種による液性免疫誘導能の解析 (鈴木亮介)

ワクチン接種した HCV/Cre-Tg から得られた血清中の中和抗体価について、各種遺伝子型のトランスパッケージング HCV を用いて測定する。

(4) HCV ワクチンの自然免疫系を介した免疫応答の解析 (瀬谷司)

自然免疫系ノックアウトマウスと交配した HCV-Tg にワクチンを投与し、自然免疫系を介した排除機序を解析する。これらマウスから樹状細胞を調整し、CTL, NK, Treg, Th1/2, Th17 細胞などに対するエフェクター誘導能を機能解析し、肝炎の病態形成にどの様に関与するかを明らかにし、治療に最も効果的な免疫系活性化法を確立する。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

HCV 感染症においては感染者の肝炎から肝硬変、肝癌への進行をくい止めることが我が国では最も重要である。特異的免疫反応は一度誘導されれば長期にわたり効果が持続することから、現状の抗ウイルス薬とは異なり、少ない投与回数で効果の持続が期待できる。また、薬剤耐性や重篤な副作用の問題を克服できるものと期待される。本研究の成果は、学術的貢献のみならず肝炎の新たな治療法開発への端緒を開き、国民の健康増進につながるとともに、肝硬変及び肝癌発症率の低下にともなう医療費削減を介して行政への貢献も可能であると考えられる。

#### VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) 小原 道法 (研究代表者)

1. Kiminori kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *Journal of Leukocyte Biology* (2010) in press.

2. Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly

designed full-genome replicon RNA. Arch. Virol. (2010) in press.

3. Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. J. Hepatology (2010) in press.

4. Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based *in situ* hybridization. J. Clin. Microbiol. 48(11):3843-3851 (2010).

5. Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. J. Med. Virol. 82(9):1545-1553 (2010).

6. Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* J. Virology 84(1):303-311 (2010).

7. 発明の名称：(発明の名称) 難治性ウイルス感染症の治療剤、①発明者：小原道法、中川慎一郎②出願日：2010年9月9日③出願番号：特願 2010-202355④出願人：(財)東京都医学研究機構⑤発明の内容の概略：インターフェロンを誘導して非常に強い抗HCV、HBV活性を示す、カチオニックリポソーム製剤

#### (2) 保富 康宏 (研究分担者)

1. Xing, Li., Wang, J.C., Li, T-C., Yasutomi, Y., Lara, J., Khurdyakaov, Y., Schofield D., Emerson, S., Purcell, R., Takeda, N., Miyamura, T. and Holland, R.C. Spatial configuration of hepatitis E virus antigenic domain. J. Virol. 2010 in press

2. Naruse, T.K., Zhiyong, C., Yanagida, R., Yamashita, T., Saito, Y., Mori, K., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T. and Kimura, A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-originate rhesus macaques. Immunogenetics 2010 in press.

3. Okabayashi, S., Uchida, K., Nakayama, H., Ohno, C., Hanari, K., Goto, I. and Yasutomi, Y. Periventricular Leucomalacia (PVL)-like lesions in two neonatal cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). J. Comp. Pathol. 2010 in press

#### (3) 瀬谷 司 (研究分担者)

1. Oshiumi, H., K. Sakai, M. Matsumoto, and T. Seya. DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase binds the RIG-I adaptor IPS-1 to up-regulate IFN-beta inducing potential. *Eur. J. Immunol.* 2010. 40: 940-948.

2. Azuma, M., R. Sawahata, Y. Akao, T. Ebihara, S. Yamazaki, M. Matsumoto, M. Hashimoto, K. Fukase, Y. Fujimoto, and T. Seya. The peptide sequence of diacyl lipopeptides determines dendritic cell TLR2-mediated NK activation. *PLoS ONE* 2010. 5: e12550.

3. Ebihara, T., M. Azuma, H. Oshiumi, J. Kasamatsu, K. Iwabuchi, K. Matsumoto, H. Saito, T. Taniguchi, M. Matsumoto, and T. Seya. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein, that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *J. Exp. Med.* 2010. (November 8).

4. Oshiumi, H., M. Miyashita, N. Inoue, M. Okabe, M. Matsumoto, and T. Seya. Essential role of Riplet in RIG-I-dependent antiviral innate immune responses. *Cell host microbe*. 2010. (in press)

5. Takaki, H., Y. Watanabe, M. Shingai, H. Oshiumi, M. Matsumoto, and T. Seya. Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN-b-inducing potential. *Molec. Immunol.* 2010. (November 9)

6. Oshiumi, H., H. Mori, M. Ikeda, N. Kato, M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, K. Shimotohno, and T. Seya. Hepatitis C virus (HCV) core protein promotes viral replication by abrogating IFN-beta-inducing function of DEAD/H BOX 3 (DDX3) helicase. *PLoS ONE*. 2010. (in press)

#### (4) 鈴木 亮介 (研究分担者)

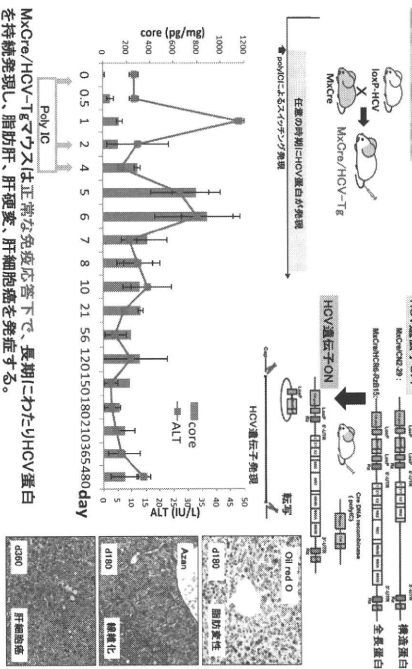
1. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. Hepatology 2010; 52: 411-420.

2. Suzuki R, Masaki T, Saeed M, Mori K, 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.

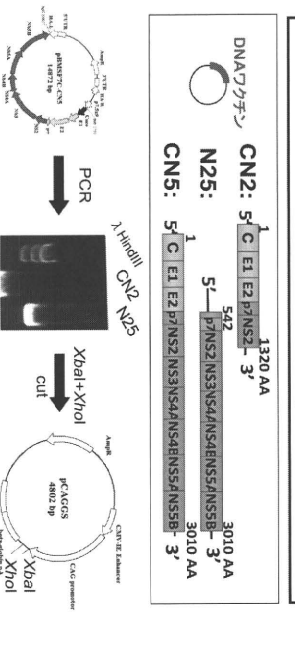


VII. Ⅲ(1年間の研究成果)の概要図

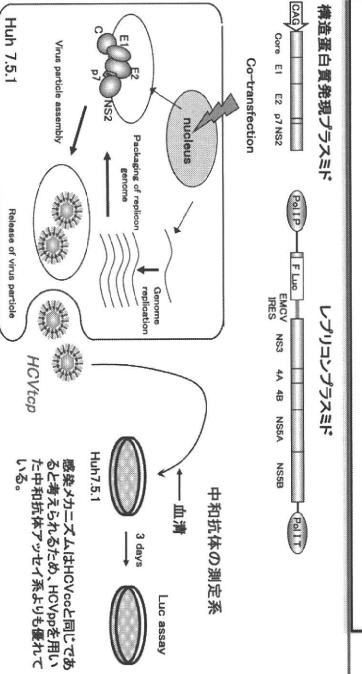
新規HOV特異感染マウスモデル(HuCre/HCV-Tg)肝臓におけるcore蛋白とALT値の経歴



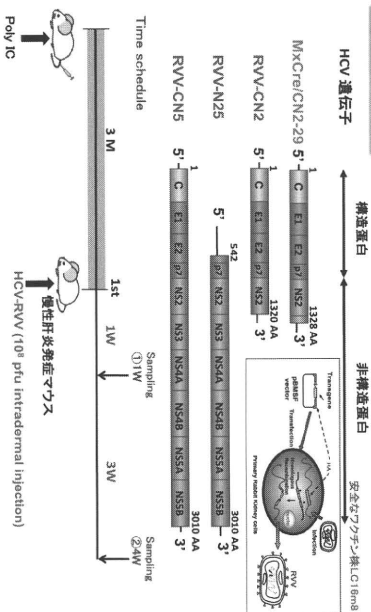
HCV遺伝子発現DNA(HCV-DNA)クワチンの作製



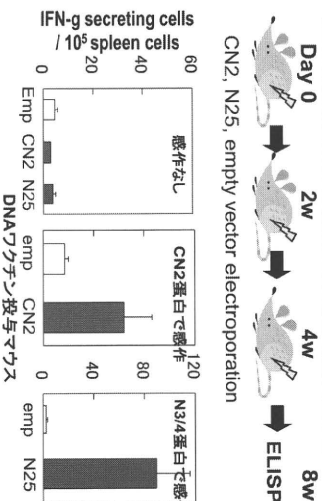
HCVtpa (trans-complemented HCV particles)産生システムを用いた中和抗体の評価



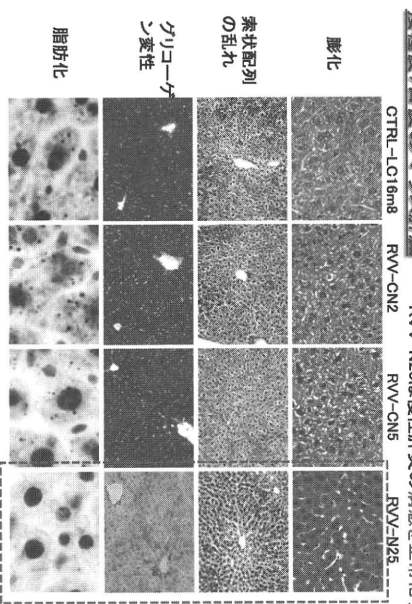
HOV遺伝子組換えクワチニアウイルス(HCV-RV)の構成とクワチン-3



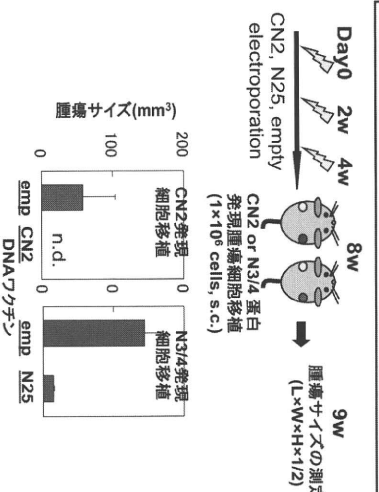
ELISPOT法による細胞性免疫誘導能評価



接種後7日後のウイルス肝臓



HCV 蛋白発現腫瘍細胞移植マウスモデルを用いた細胞性免疫誘導能評価



- (1) 慢性肝炎状態のHCV-Tgマウスに組換えクワチンRV-N25を単回皮下内接種したところ、壊死性細胞浸潤、肝細胞索の乱れ、肝細胞の膨化、グリコーゲン変性および脂肪変性といった慢性肝炎の病態の正常化が認められた。
- (2) HCV-DNAクワチンを作製し、ELISPOT法及びHCV蛋白発現腫瘍細胞移植マウスモデルを用いて細胞性免疫誘導能を評価したところ、強い細胞性免疫が誘導されていることが認められた。
- (3) これら治療効果のさらなる増強を目指して機序の解析を進めている。

## ●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1. 昭和48年4月 (財)日本ポリオ研究所 研究員 (ポリオウイルスの分子生物学的解析)
2. 昭和57年1月 北里大学薬学部公衆衛生学教室講座研究員 (ポリオウイルス遺伝子機能の解析)
3. 昭和59年5月 東京大学医学部細菌学教室受託研究員 (ポリオウイルス遺伝子機能の解析)
4. 平成元年4月 東燃、総合研究所、基礎研究所、免疫工学グループ・グループヘッド (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析)
5. 平成4年4月 東京都臨床医学総合研究所、微生物研究部門・室長 (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析)
6. 平成16年4月 東京都臨床医学総合研究所、SARS, C型肝炎等感染症プロジェクト (現・感染制御プロジェクト)・プロジェクトリーダー (C型肝炎ウイルスの分子生物学的解析) プロジェクト制の導入に伴い部門名称の変更

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1. 野本 明男：東京大学名誉教授、微生物科学研究所所長
2. 下遠野 邦忠：京都大学名誉教授、千葉工業大学客員教授
3. 宮村 達男：前国立感染症研究所所長
4. 脇田 隆宇：国立感染症研究所ウイルス二部部長

### ・主な研究課題

1. ポリオウイルスの神経病原性の研究 (ポリオウイルスの増殖機能と神経病原性が相関していることを示した)
2. ポリオウイルス生ワクチン株の全塩基配列の決定および病原性 発現遺伝子領域の研究 (弱毒及び強毒ポリオウイルス株の各遺伝子領域のキメラクローンをを用いて神経毒力を担う領域を明らかにした。)
3. ポリオウイルスの複製と病原性発現に関する研究 (5'非翻訳領域の塩基変異による翻訳効率の変化が病原性の強さに関与していることを明らかにした。)
4. C型肝炎ウイルス遺伝子のクローニング及び遺伝子機能研究 (C型肝炎ウイルスは内部認識機構により翻訳が開始されること、および遺伝子群の解析からグループに分類し、それぞれの病原性が異なることを明らかにした。)
5. C型肝炎ウイルス粒子構造の解析と複製、病原性発現に関する研究 (免疫電顕法によりウイルス粒子を同定した。)
6. C型肝炎ウイルス遺伝子を発現したトランスジェニックマウスが肝炎肝がんを発症することを明らかにした。
7. HCVの複製にスフィンゴミエリンが重要であること、合成酵素阻害剤が治療薬として有望であることを明らかにした。)

### ・これまでの研究実績

※本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体文字**で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

1. ***Okiminori kimura, Satoshi Sekiguchi, Seishu Hayashi, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Masahito Nagaki, and Michinori Kohara. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. Journal of Leukocyte Biology (2010) in press.***

2. ***Masaaki Arai, Hidenori Suzuki, Yoshimi Tobita, Asako Takagi, Koichi Okamoto, Atsunori Ohta, Masayuki Sudoh, Kunitada Shimotohno, Michinori Kohara. Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA. Arch. Virol. (2010) in press.***

3. ○Takashi Takano, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Masahiro Hayashi, Yuichi Hirata, Masaaki Satoh, Chise Tateno, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Masayuki Sudo, and Michinori Kohara. *Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes. J. Hepatology (2010) in press.*

4. Leiyun Weng, Yuichi Hirata, Masaaki Arai, Michinori Kohara, Takaji Wakita, Koichi Watashi, Kunitada Shimotohno, Ying He, Jin Zhong, Tetsuya Toyoda. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype specific manner. *J. Virol.* (2010) in press.

5. ○Hideko Nuriya, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Kyoosuke Kaji, Seishu Hayashi, Shuichi Kaneko and Michinori Kohara. *Detection of hepatitis B and C viruses in almost all hepatocytes by modified PCR-based in situ hybridization. J. Clin. Microbiol.* 48(11):3843-3851 (2010).

6. Yuri Kasama, Satoshi Sekiguchi, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Masaaki Satoh, Kazuhiko Kuwahara, Nobuo Sakaguchi, Motohiro Takeya, Yoichi Hiasa, Michinori Kohara, and Kyoko Tsukiyama-Kohara. Persistent expression of the full genome of hepatitis C virus in B cells induces spontaneous development of B-cell lymphomas *in vivo*. *Blood* (2010) in press.

7. ○Kenichi Satoh, Hiroki Takahashi, Chiho Matsuda, Takuya Umehara, Toshiyuki Tanaka, Masayuki Miyasaka, Mikio Zeniya and Michinori Kohara. *Natural killer cells target HCV core proteins during the innate immune response in HCV transgenic mice. J. Med. Virol.* 82(9):1545-1553 (2010).

8. Masaaki Satoh, Makoto Saito, Kohsuke Tanaka, Sumako Iwanaga, Salem Nagla Elwy Salem Ali, Takahiro Seki, Seiji Okada, Michinori Kohara, Shinji Harada, Chieko Kai, Kyoko Tsukiyama-Kohara. Evaluation of a recombinant measles virus expressing hepatitis C virus envelope proteins by infection of human PBL-NOD/Scid/Jak3null mouse. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* (2010) in press.

9. Chen Y-Z, Liu G, Senju S, Wang Q, Irie A, Haruta M, Matsui M, Yasui F, Kohara M, and Nishimura Y. Identification of SARS-COV spike protein-derived and HLA-A2-restricted human CTL epitopes by using a new muramyl dipeptidederivative adjuvant. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 23(1):165-77 (2010).

10. ○Yutaka Amako, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Asao Katsume, Yuichi Hirata, Satoshi Sekiguchi, Yoshimi Tobita, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Nobuaki Funata, Hiromichi Yonekawa and Michinori Kohara. *Pathogenesis of hepatitis C virus infection in Tupaia belangeri J. Virology* 84(1):303-311 (2010).

11. 発明の名称：(発明の名称) 新型インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンタンパク質遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス

①発明者：小原道法、安井文彦、迫田義博、喜田宏、村上利夫

②出願日：2010年10月15日

③出願番号：特願2010-233064

④出願人：(財)東京都医学研究機構、国立大学法人 北海道大学、(財)化学及血清療法研究所

⑤発明の内容の概略：感染予防及び治療効果を示すインフルエンザウイルス HA 遺伝子を有する組換えワクシニアウイルス

12. ○発明の名称：(発明の名称) 難治性ウイルス感染症の治療剤

①発明者：小原道法、中川慎一郎

②出願日：2010年9月9日

③出願番号：特願2010-202355④出願人：(財)東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：インターフェロンを誘導して非常に強い抗 HCV, HBV 活性を示す、カチオンリポソーム製剤

13. 発明の名称：(発明の名称) RRM2 のアンタゴニストを有効成分として含有する C 型肝炎治療剤

①発明者：小原道法、小原恭子、佐藤正明、須藤正幸

②出願日：2010年8月12日

③出願番号：特願2010-180981

④出願人：中外製薬株式会社、(財)東京都医学研究機構、国立大学法人 熊本大学

⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルス複製に必須な宿主因子 RRM2 に対する阻害剤

14. Tomohiro Nishimura, Michinori Kohara, Kosuke Izumi, Yuri Kasama, Yuichi Hirata, Ying Huang, Masahiro Shuda, Hideko Nuriya, Yuko Tokunaga, Masaaki Sato, Makoto Saito, Chieko Kai and Kyoko Tsukiyama-Kohara.

Hepatitis C virus impairs P53 via persistent over-expression of 3 $\beta$ -hydroxysterol  $\Delta$ 24-reductase. *J. Biol. Chem.* 284(52):36442-36452 (2009).

15. Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study.

*Hepatology.* Aug;50(2):393-9. (2009)

16. OKeigo Machida, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Eiji Seike, Shigenobu Tōne, Yukiko Hayashi, Yuri Kasama, Masumi Shimizu, Hidemi Takahashi, Chyoji Taya, Hiromichi Yonekawa, Nobuyuki Tanaka, and Michinori Kohara. Disruption of IFN Signaling and HCV Synergistically Enhance Lymphoproliferation through Type II CD95 and Interleukins. *Gastroenterology* 137(1):285-96. (2009).

17. Leiyun Weng, Jiamu Du, Jingling Zhou, Jianping Ding, Takaji Wakita, Michinori Kohara, Tetsuya Toyoda. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 154(5):765-773. (2009).

18. Yoshihito Ueno, Yuuji Watanabe, Aya Shibata, Kayo Yoshikawa, Takashi Takano, Michinori Kohara, Yukio Kitade. Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 17(5):1974-81. (2009).

19. 発明の名称：(発明の名称) 抗C型肝炎ウイルス効果を有するベンゾフラン誘導体

①発明者：小原道法、安井文彦、須藤正幸

②出願日：2009年4月8日

③出願番号：特願2009-93608

④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構

⑤発明の内容の概略：C型肝炎ウイルスの複製を阻害する抗酸化剤

20. Kei Ogata, Takahito Kashiwagi, Jun Iwahashi, Koyu Hara, Haruhito Honda, Tatsuya Ide, Ryukichi Kumashiro, Michinori Kohara, Michio Sata, and Nobuyuki Hamada. A mutational shift from domain III to II in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus after interferon-ribavirin therapy. *Arch Virol.* 153(8):1575-9. (2008).

21. Fumihiko Yasui, Chieko Kai, Masahiro Kitabatake, Shingo Inoue, Misako Yoneda, Shoji Yokochi, Ryoichi Kase, Satoshi Sekiguchi, Kouichi Morita, Tsunekazu Hishima, Hidenori Suzuki, Katsuo Karamatsu, Yasuhiro Yasutomi, Hisatoshi Shida, Minoru Kidokoro, Kyosuke Mizuno, Kouji Matsushima, Michinori Kohara. Prior immunization with SARS-CoV nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J. Immunology* 181(9):6337-48 (2008).

22. T. Nishimura, M. Saito, T. Takano, A. Nomoto, M. Kohara, K. Tsukiyama-Kohara. Comparative aspects on the role of polypyrimidine tract-binding protein in internal initiation of hepatitis C virus and picornavirus RNAs. *Compara. Immu. Microbio. Infect. Dis.* 31: 435-448 (2008).

23. Naoya Sakamoto, Yoko Tanabe, Takanori Yokota, Kenichi Satoh, Yuko Sekine-Osajima, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Megumi Tasaka, Yuki Sakurai, Chen Cheng-Hsin, Masahiko Yano, Shogo Ohkoshi, Yutaka Aoyagi, Shinya Maekawa, Nobuyuki Enomoto, Michinori Kohara, and Mamoru Watanabe. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J. Gastroenterology Hepatology.* 23(9):1437-47 (2008).

24. Sachiko Inubushi, Motoko Nagano-Fujii, Kikumi Kitayama, Motofumi Tanaka, Chunying An, Hiroshi Yokozaki, Hirohei Yamamura, Hideko Nuriya, Michinori Kohara, Kiyano Sada, and Hak Hotta. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J. Gen. Virology* 89: 1231-1242 (2008).

25. 発明の名称：(発明の名称) ベシクル製剤

①発明者：小原道法、中野善郎、須藤正幸 他2名

②出願日：2008年11月26日

③出願番号：特願2008-301763

④出願人：中外製薬株式会社、財団法人東京都医学研究機構、北海道システム・サイエンス株式会社

⑤発明の内容の概略：ビタミンEリポソームの肝指向型DDSとしての有効性をin vitro, in vivoの試験にて示した。