

201125025A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 24 (2012) 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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 24 (2012) 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	7
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	13
2. IL28B 遺伝子多型と肝癌術後および生体肝移植後の C 型肝炎に対する IFN 治療効果との関連 茶山 一彰	20
3. 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 田原 栄俊	23
4. C 型肝炎と B 型肝炎の疫学 - 無症候性キャリア数の推計について - 田中 純子	25
5. 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	29
6. 人工多機能幹細胞に関する研究 伊藤 敬	35
7. ウイルス肝炎患者における ABO 不適合肝移植後の B 細胞免疫寛容 澁本 康史	37
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	49

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⁺細胞、CD34⁺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23年度は、a)ヒト末梢血および骨髄CD34⁺造血幹細胞からNK細胞の分化・誘導法の確立と誘導NK細胞のフェノタイプおよび細胞傷害性分子の解析、およびその抗HCV作用の確認、b)ヒト線維芽細胞由来iPS細胞からNK細胞への分化・誘導とそのフェノタイプ解析、c)臨床に類似したアニマルテストングを目的としたヒト肝細胞/類洞内皮細胞キメラマウスの作製、d)肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV併用療法(PR)の治療成績とIL28B遺伝子多型の関連性解析とNK細胞の抗HCV効果への影響の解析を行った。

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。本研究は、現在使用されている免疫抑制剤に抵抗性を示すNK/NKT細胞を用いた養子免疫療法によるHCVの根治療法の開発が目的である。

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。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、末梢血あるいは骨髄造血幹細胞やiPS細胞から誘導したリモデリング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した。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た。

B. 研究方法

1. 骨髄CD34⁺造血幹細胞由来CD56⁺NK/NKT細胞のリモデリングおよびHCV複製抑制機構の検討(担当 大段・渕本・田原)

ヒト骨髄由来CD34⁺細胞株を用いて、CD56⁺NK/NKT細胞への分化誘導を検討した。培養条件は、H3000とX-VIVO mediumを基本培地とし、Flt3(FMS-like tyrosine kinase 3)、SCF(幹細胞因子)、IL-3、IL-6およびIL-15、IL-17を加え、NK細胞への増殖効率を解析した。分化・誘導したNK/NKT細胞のフェノタイプを解析し、HCVウイルス増幅抑制効果について、HCVレプリコン保持肝細胞株(Huh-7)を用いて評価した。

2. iPS細胞からのCD56⁺NK/NKT細胞のリモデリングの検討

ヒト線維芽細胞由来iPS細胞 (01, Tic) を使用し、M210-B4をフィーダーとして、H3000にFlt3、SCF、IL-3、IL-6を添加して14日間培養し、CD34⁺CD45⁺細胞に分化させた後、AFT-024をフィーダーとして、サイトカイン (IL-15, IL-7, SCF, Flt3-L, IL-3) を添加し30日間培養し、NK細胞への分化・誘導を行った。

3. テロメラーゼ遺伝子 (hTERT) 導入-iPS細胞の樹立 (担当 田原、伊藤)

増殖能力を保持したNK細胞を分化誘導できるヒトiPS細胞を樹立するため、予めテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) を導入した線維芽細胞を用いてiPS細胞の誘導を行い、複数のクローンを樹立した。

4. 臨床に類似したアニマルテストングを目的としたヒト肝細胞/類洞内皮細胞キメラマウスの作製 (担当 立野)

キメラマウスへのヒト免疫細胞の生着およびヒト免疫細胞との相互作用をより促進させることを期待して、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した。昨年度の実験では、先ずホストマウスの類洞内皮細胞を除去する目的で17週齢のキメラマウスにモノクロタリンを投与後、継代培養したヒト類洞内皮細胞を脾臓より移植した。その結果、移植後2週目の肝臓において、ヒト類洞内皮細胞の生着は確認されなかった。そこで、本年度は、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。

5. 肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV併用療法 (PR) の治療成績とIL28B遺伝子多型の関連性解析 (担当 茶山)

遺伝子1型のC型慢性肝炎患者のうち、生体肝移植後のHCV再感染に対するPRの治

療成績とIL28B遺伝子多型の関連を検討し、さらに肝生検サンプルあるいはヒト肝細胞キメラマウスを用いてIL28B遺伝子多型と肝内ISGs発現量の関連を検討した。

C. 研究結果

平成23年度の研究成果の概要を記す。

1. 骨髄CD34⁺造血幹細胞由来CD56⁺NK/NKT細胞のリモデリングおよびHCV複製抑制機構の検討 (担当 大段、湊本)

骨髄CD34⁺造血幹細胞は、H3000 mediumに、Flt3、SCF、IL-3、IL-6を添加して7日培養後、Flt3、SCF、IL-15、IL-7を加えたX-VIVO mediumでさらに21日間培養すると、最も高い細胞増殖率が得られた。また、HCVレプリコンアッセイでは、CD34⁺幹細胞由来NK細胞の有意なHCV複製抑制効果 (IFN- γ 産生依存性) が確認された。

2. iPS細胞からのCD56⁺NK/NKT細胞のリモデリングの検討 (担当 大段、田原)

ヒト線維芽細胞由来の iPS 細胞株 (Tic) を用いて、血液幹細胞への分化を評価した結果、円形の血液細胞様の形態を示す細胞集団の出現を確認できた。培養32日目には約60%がCD56⁺NK細胞に分化した。

3. テロメラーゼ遺伝子 (hTERT) 導入-iPS細胞の樹立 (担当 田原、伊藤)

テロメラーゼ発現 TIG-3 細胞は、扁平な単層のコロニーを形成した。内在性の多能性遺伝子の発現を調べた結果、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-myc に加えてNanogの発現が認められた。さらにES細胞マーカーであるNanogとともに、SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81の発現を免疫蛍光法にて確認した。

4. アニマルテストングを目的としたヒ

ト肝細胞/類洞内皮細胞キメラマウスの作製 (担当 立野)

ヒト肝細胞およびヒト類洞内皮細胞を同時移植し、hCD31 mRNA が検出された移植 7 日目のキメラマウス肝臓を用いて、ヒト類洞内皮細胞特異的な hCD31 抗体で免疫染色を行った。その結果、hCD31 陽性細胞は肝臓中にわずかに点在しているのみであった。

5. 肝移植後の HCV 再感染に対する PEG-IFN/RBV 併用療法 (PR) の治療成績と IL28B 遺伝子多型の関連性解析 (担当 茶山、田中)

生体肝移植後の HCV 再感染に対する PR の SVR 率をレシピエントの IL28B 遺伝子多型別に検討すると、TT で 64% (9/14 例) と TG/GG の 50% (3/6 例) に比べ高値であった。ドナーの IL28B 遺伝子多型別に検討すると、SVR 率は TT で 73% (11/15 例) と TG/GG の 20% (1/5 例) に比べ高値であり、ドナーおよびレシピエントがいずれも TT の場合は 81% (9/11 例) と高い SVR 率が得られた。これらの結果は、生体肝移植後の HCV 再感染に対する PR の治療効果においても、ドナーおよびレシピエントのいずれの IL28B 遺伝子多型も関与していることを意味する。

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- γ 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- γ 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⁺細胞、CD34⁺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 23 年

度の研究成果は、CD34⁺造血幹細胞由来増殖 NK 細胞の HCV 複製抑制効果を、HCV レプリコン細胞を用い解析した。さらに、iPS 細胞からの CD56⁺NK 細胞のリモデリング法を確立し、今後、HCV 複製抑制効果を *in vitro* および *in vivo* で確認する予定である。また、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、研究計画通りに順調に進行している。

E. 結論

- ヒト骨髄由来 CD34⁺造血幹細胞から効率的な NK 細胞の分化・誘導に成功した。
- ヒト骨髄由来 CD34⁺造血幹細胞から誘導した NK 細胞のフェノタイプおよび細胞傷害性マーカー (NKG2D, CD226, TRAIL 等) の解析を終了し、抗 HCV 作用を *in vitro* で確認した。
- ヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞から NK 細胞への分化・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。

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

研究要旨 本研究は、自然免疫細胞による抗C型ウイルス（HCV）治療効率を高める目的で、末梢血 CD56⁺細胞や、CD34⁺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し、細胞免疫療法を行う事を目的とする。本年度は、CD56⁺NK/NKT 細胞を CD34⁺造血幹細胞およびヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞から分化・誘導するための培養条件の検討を行い、誘導 NK 細胞のフェノタイプおよび細胞傷害性マーカー（NKG2D, CD226, TRAIL 等）を解析した。また、HCV レプリコン細胞を用い、リモデリング CD56⁺ NK 細胞の抗 HCV ウイルス増幅抑制効果を *in vitro* で検討した結果、有意な抗 HCV 効果を確認した。

A. 研究目的

C型ウイルス（HCV）性肝硬変は、高率に肝臓癌（HCC）へ移行し、現在のところ肝移植が唯一の適応となる。我々は、HCV 合併 HCC での肝移植症例に対し、未成熟 natural killer（NK）細胞を活性化させ移入する養子療法を臨床導入し、癌再発率の有意な低下と HCV 量の一時的な減少が確認された。本研究は、HCV 感染患者に対する根治療法として、末梢血 CD56⁺細胞、CD34⁺造血幹細胞や iPS 細胞から誘導したリモデリングNK/NKT細胞の移入療法により、HCV 肝炎の根治を図ることを目的とする。

研究内容は、末梢血成熟リンパ球、CD34⁺幹細胞、あるいは iPS 細胞から増殖性 CD3⁻CD56⁺ NK 細胞および CD3⁺CD56⁺ NKT 細胞を分化後にリモデリングし、抗 HCV 活性を誘導することと、リモデリングNK/NKT細胞をHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスに移入して抗 HCV 効果を検討することに大別される。昨年度は、ヒト末梢血由来 CD34⁺造血幹細胞からのNK/NKT細胞の分化・誘導に成功したが、*in vivo* 実験に使用し得るほどの増殖は得られなかった。本

年度は、ヒト骨髄由来 CD34⁺造血幹細胞からNK細胞の誘導効率の改善と iPS 細胞からのNK/NKT細胞の誘導、増殖培養法の確立、さらにこれらの誘導細胞のHCVウイルス増幅抑制効果の確認を目的とした。

B. 研究方法

骨髄 CD34⁺造血幹細胞由来 CD56⁺NK/NKT 細胞のリモデリングおよび HCV 複製抑制機構の検討

ヒト骨髄由来 CD34⁺細胞株を用いて、CD56⁺NK/NKT 細胞への分化誘導を検討した。培養条件は、血液幹細胞培養液（H3000）あるいは X-VIVO medium を基本培地とした。これらに CD34⁺細胞の増殖に有効と考えられる Flt3（FMS-like tyrosine kinase 3）、SCF（幹細胞因子）、IL-3、IL-6 およびNK細胞への分化・誘導に關与する IL-15、IL-17 を加え、添加因子の投与時期や添加量を様々に組み合わせて検討し、NK細胞への増殖効率を解析した。次に、分化・誘導したリモデリング細胞のフェノタイプをフローサイトメトリーによって解析した。さらに、誘導したNK細胞のHCVウ

ウイルス増幅抑制効果について、HCV レプリコン保持肝細胞株 (Huh-7) を用いて *in vitro* で評価した。

iPS 細胞からの CD56⁺NK/NKT 細胞のリモデリングの検討

2 種類のヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞 (01, Tic) を使用し、M210-B4 (マウス骨髄線維芽細胞) をフィーダーとして、H3000 に Flt3、SCF、IL-3、IL-6 を添加して 14 日間培養し、造血幹細胞 (CD34⁺CD45⁺) に分化させた後、磁気分離法を用いて CD34⁺造血幹細胞に純化した。さらに AFT-024 (マウス胎児肝線維芽細胞) をフィーダーとして、サイトカイン (IL-15, IL-7, SCF, Flt3-L, IL-3) を添加した培養液で 30 日間培養し、NK 細胞への分化・誘導を行った。位相差顕微鏡による形態学的観察と、フローサイトメトリーによるフェノタイプ解析で CD56⁺細胞への分化・誘導を確認した。

リモデリング NK 細胞の HCV 増幅抑制効果の検討

CD34⁺幹細胞からリモデリングした CD56⁺細胞と HCV レプリコン保持肝細胞株 (Huh-7) を Transwell system を用いて混合培養し、48 時間後の培養上清中への HCV コア抗原の遊離量を測定した。また、リモデリング NK 細胞の IFN- γ 含有率を細胞内サイトカイン染色によってフローサイトメトリーで評価した。

C. 研究結果

骨髄 CD34⁺造血幹細胞由来 CD56⁺NK/NKT 細胞のリモデリングおよび HCV 複製抑制機構の検討

骨髄 CD34⁺造血幹細胞は、図 1 に示す通り培養液・添加因子のコンビネーションによる 5 系のプロトコールで CD56⁺細胞への分化誘導および増殖率を検討した。その結果、stem cell 培養液の H3000 medium に、Flt3、SCF、IL-3、IL-6 を添加して 7 日培養後、Flt3、SCF、IL-15、IL-7 を加えた X-VIVO medium でさらに 21 日間培養を行った群 (プロトコール 2) において、

最も高い細胞増殖率が得られた (図 2)。

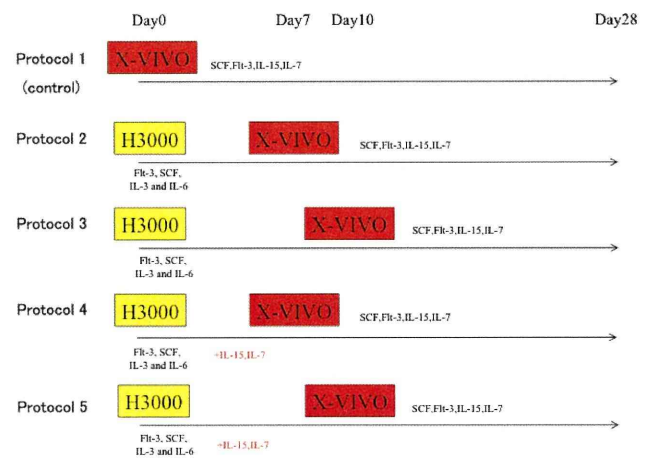


図 1. 骨髄 CD34⁺造血幹細胞から NK 細胞を誘導するプロトコール

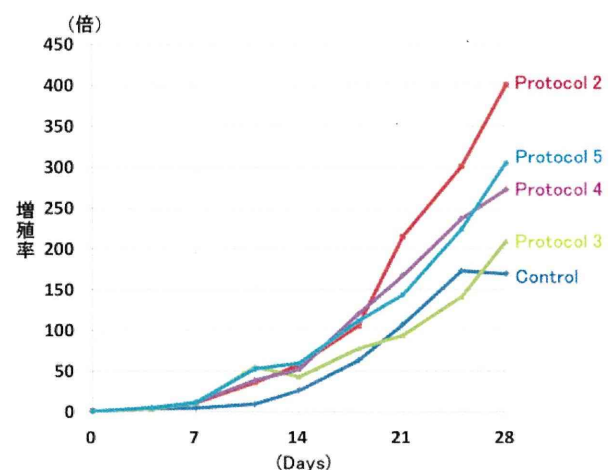


図 2. 骨髄 CD34⁺造血幹細胞由来分化細胞増殖率

さらに、フローサイトメトリーを用いてリモデリング細胞のフェノタイプ確認を行った所、各プロトコールで誘導した CD56⁺細胞のいずれも、NK 細胞マーカーの発現とともに、抑制性レセプター、活性化レセプター、細胞傷害性分子、IL-2 レセプターの発現を認めた。NK 細胞への誘導効率もプロトコール 2 で最も高かった (図 3)。

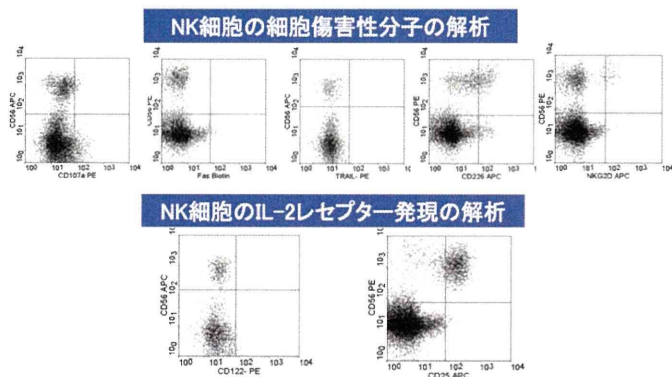


図3. リモデリング細胞の phenotype 解析 (Day28) Protocol 2

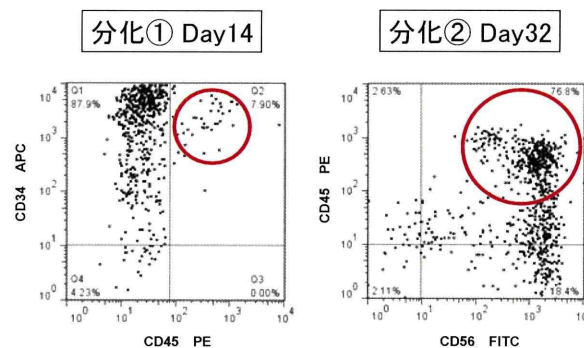


図5. iPS (Tic) 細胞から CD56+ NK 細胞への分化

iPS細胞からのCD56⁺NK/NKT細胞のリモデリングの検討

ヒト線維芽細胞由来のiPS細胞株2種類 (Tic, 01) を用いて、血液幹細胞への分化を形態学およびフローサイトメトリーにより評価した。その結果、01株では14日目以降は位相差顕微鏡観察で線維芽細胞様の形態を示し、血液細胞様の形態を呈さなかったが、Tic株においては円形の血液細胞様の形態を示す細胞集団の出現を確認できた (図4)。

iPS細胞からのCD56細胞の分化

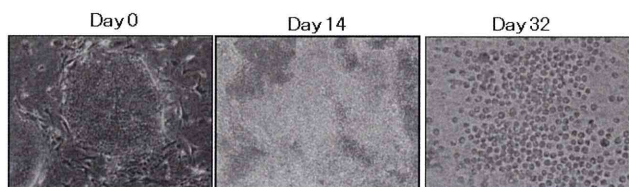


図4. iPS細胞由来NK細胞のリモデリングの確立

フローサイトメトリー解析でTic株からのリモデリング細胞のCD34⁺CD45⁺発現を解析すると、Day14, 32で各々7.9%, 76.8%の分化率を認めた (図5)。また、培養32日目におけるiPS由来リモデリングのうち約60%がCD56⁺細胞であった。

リモデリングNK細胞のHCV増幅抑制効果の検討

骨髄由来CD34⁺細胞からのリモデリングのうち、最もCD56⁺細胞への誘導効率の高かったプロトコル2の方法で得られたリモデリング細胞のHCVレプリコンアッセイによる抗HCV効果解析を行った。その結果、末梢血中に存在する健常人ボランティア由来のNK細胞のHCVウイルス増幅抑制能に比べ高い抑制傾向を示した (図6)。さらに、リモデリング細胞の細胞内サイトカイン染色によってフローサイトメトリーで解析したところ、リモデリング細胞は有意なIFN- γ 産生能を認めた。

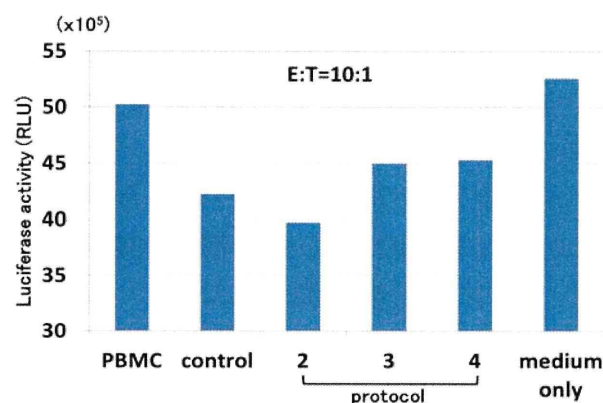


図6. リモデリング細胞のHCV増幅抑制能評価

D. 考察

非代償性肝硬変に合併する肝癌に対しては、肝移植が唯一の根治療法となり得るが、移植後癌再発の可能性が懸念される。我々は、肝移植後において、自然免疫機能を再生することで制癌効果を誘導する治療法の可能性について研究を重ねてきた。自然免疫応答を司るNK細胞は、腫瘍転移形成の初期段階に腫瘍細胞を正常細胞から識別し選択的に殺傷し得るが、肝移植後にはその機能が破綻する。我々は、ヒト肝臓内には大量のNK細胞が含有され、強力な抗腫瘍分子 (TRAIL) を誘導し得ることと、さらに術後再発率の高い中～低分化肝細胞癌はTRAIL受容体を高発現し、NK細胞を介した細胞死が誘導されやすいことを確認した。肝移植の際に、摘出したドナー肝臓の灌流排液からNK細胞を回収し、レシピエントに移入する免疫再生療法を臨床導入した。現在まで、肝癌合併肝硬変の24症例に対し施行し、安全性と有効性が確認された。

肝癌患者のうち80%強がC型肝炎を合併するが、C型肝炎からの重度肝硬変に合併した肝癌に対しても肝移植が積極的に行われる。しかし、肝移植後のC型肝炎の再発は必発で、他疾患で肝移植した場合に比べ長期予後は悪い。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、C型肝炎感染ではウイルスのE2蛋白とNK細胞上のCD81分子の結合によってNK細胞機能が抑制され、高頻度に持続感染に移行する。我々は、NK細胞を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。さらに、前述の抗腫瘍効果を期待した肝由来NK細胞移入療法を施行したC型肝炎感染患者では、ウイルスの複製を抑制する効果が確認された。ヒト肝細胞キメラマウスを用いた解析でも、NK細胞から産生されるIFN- γ に抗ウイルス効果

があることが明らかとなった。残念ながら臨床例における免疫細胞移入療法による抗HCV効果は一過性である。IFN- γ 産生NK細胞を誘導・増殖して繰り返し移入できれば、C型肝炎の根治に至る可能性があると考え、本研究を継続している。

本年度の研究により、NK細胞は骨髄由来CD34⁺造血幹細胞から効率よく分化・誘導が可能となった。活性化NK受容体 (NKG2D、NKp46、NKp30、NKp44) および抑制性受容体 (NIRs) の表出から判断して、未成熟～成熟NK細胞のリモデリングに成功したと考えられる。HCVレプリコン保持肝細胞株 (Huh-7) とCD34⁺造血幹細胞由来CD56⁺NK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が確認され、抗HCV療法への応用に期待がかかる。類似のフェノタイプを示すNK細胞はヒト線維芽細胞由来のiPS細胞からも誘導可能であり、24年度のヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* 実験が可能な程度に分化・増殖効率は改善したと考える。

E. 結論

ヒト骨髄由来CD34⁺造血幹細胞から効率的なNK細胞の分化・誘導に成功した。ヒト骨髄由来CD34⁺造血幹細胞から誘導したNK細胞のフェノタイプおよび細胞傷害性マーカー (NKG2D、CD226、TRAIL等) の解析を終了し、抗HCV作用を *in vitro* で確認した。ヒト線維芽細胞由来iPS細胞からNK細胞への分化・誘導に成功した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Tashiro H, Onoe T, Ide K, Ishiyama K, Ohdan H. Optimization of

- immunosuppressive therapy based on a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living donor liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 2012; 44(2):555-559.
2. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H. Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19(2):418-425.
3. Kajitani K, Tanaka Y, Arihiro K, Kataoka T, Ohdan H. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; Epub ahead of print.
4. 小林剛, 大段秀樹. 肝癌の治療Up to date 肝癌再発予防外科治療. 2011; 105(5):467-474
5. Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H. Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation. *Transplantation.* 2011; 92(5):575-580.
6. 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;18(5): 689-699.
7. Tashiro H, Aikata H, Waki K, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Chayama K, Asahara T, Ohdan H. Treatment strategy for early hepatocellular carcinomas: Comparison of radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization and surgical resection. *J Surg Oncol.* 2011; 104(1):3-9.
8. Amano H, Tashiro H, Oshita A, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Itamoto T, Asahara T, Ohdan H. Significance of platelet count in the outcomes of hepatectomized patients with hepatocellular carcinoma exceeding the Milan criteria. *J Gastrointest Surg.* 2011;15(7):1173-1181.
9. Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Doskali M, Tashiro H, Ohdan H. Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function. *J Transplant.* 2011; Epub ahead of print.
10. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res.* 2011; 167(1): e29-37.
11. Kuroda S, Tashiro H, Kobayashi T, Oshita A, Amano H, Ohdan H. Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma classified as Child-Pugh class B. *World J Surg.* 2011; 35(4):834-841.

2. 学会発表

1. Ohdan H. Adoptive immunotherapy for inducing anti-HCC and anti-HCV activity after liver transplantation. Lecture at Columbia University, Columbia Center for Translational Immunology. NY, USA, 2011
2. Hotta R, Tanaka Y, Doskali M, Ohira M, Hiraga N, Chayama K, Ohdan H. A possible adoptive immunotherapy with PBMC-Derived CD56+ cells for preventing HCV re-infection after liver transplantation. American Transplant Congress 2011. Philadelphia, America, 2011
3. Onoe T, Ide K, Tanaka Y, Banshoudani M, Tazawa H, Kobayashi T, Oshita A, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Continuous PGE1 injection via the portal vein for small-for-size graft improves graft function and survival in adult-to-adult living donor liver transplantation. American Transplant Congress 2011. Philadelphia, America, 2011

4. Tanaka Y, Tashiro H, Takanashi S, Chayama K, Ohdan H. Cellular Alloreactivity prior to interferon-based antiviral therapy is predictive of chronic rejection in liver transplantation recipients with recurrent hepatitis. American Transplant Congress 2011. Philadelphia, America, 2011
5. 大段秀樹. 肝移植後の免疫制御戦略. 第9回広島消化器免疫研究会. 広島, 2011
6. 天野尋暢, 田代裕尊, 大下彰彦, 小林剛, 谷本新学, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 楠部潤子, 藤國宣明, 井手健太郎, 尾上隆司, 大段秀樹. 肝細胞癌術後再発に対する治療戦略—再発危険因子の解析、再肝切除の役割と限界—. 第111回日本外科学会定期学術集会. 東京 (紙上開催), 2011
7. 井手健太郎, 尾上隆司, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 田代裕尊, 大段秀樹. 胆汁中CX3CL1測定による移植肝グラフトの評価. 第111回日本外科学会定期学術集会. 東京 (紙上開催), 2011
8. 尾上隆司, 井手健太郎, 田中友加, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 堀田龍一, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹. 生体部分肝移植後のPGE1門脈注入療法を用いた過小グラフト症候群治療の検討. 第111回日本外科学会定期学術集会. 東京 (紙上開催), 2011
9. 橋本慎二, 尾上隆司, 井手健太郎, 田中友加, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 山下正博, 寺岡義布史, 堀田龍一, 梶谷桂子, 平田文宏, 田代裕尊, 大段秀樹. 生体部分肝移植におけるタクロリムス水和物除放射性製剤の新規導入症例の検討. 第111回日本外科学会定期学術集会. 東京 (紙上開催), 2011
10. 谷本新学, 田代裕尊, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 田澤宏文, 黒田慎太郎, 大段秀樹. C型慢性肝炎による肝細胞癌切除後のPEG-IFN療法による予後改善効果. 第111回日本外科学会定期学術集会. 東京 (紙上開催), 2011
11. 田代裕尊, 相方浩, 谷本新学, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 茶山一彰, 大段秀樹. C型慢性肝炎関連肝細胞癌切除後のPEG-IFN療法による予後改善効果. 第47回日本肝臓学会総会. 東京, 2011
12. 大段秀樹. 肝臓移植後の免疫モニタリングに基づく免疫抑制の最適化. 第28回日本TDM学会・学術大会 The 28th Annual Meeting of The Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. 広島, 2011
13. 尾上隆司, 橋本慎二, 田中友加, 五十嵐友香, 井手健太郎, 石山宏平, 小林剛, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹. 過小グラフト肝移植における肝由来免疫寛容性の検討. 第7回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム. 広島, 2011
14. 天野尋暢, 小林剛, 井手健太郎, 尾上隆司, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. 進行肝細胞癌に対する肝切除の意義—ミラノ基準を逸脱した症例の検討—. 第66回日本消化器外科学会総会. 名古屋, 2011
15. 大段秀樹, 講演肝臓/肝炎の根治を目指した肝移植後の免疫細胞療法. 第39回幹細胞治療フォーラム. 東京, 2011
16. 黒田慎太郎, 田代裕尊, 藤國宣明, 楠部潤子, 田澤宏文, 谷本新学, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 番匠谷将孝, 井手健太郎, 尾上隆司, 大段秀樹. Child-Pugh B原発性肝細胞癌に対する肝切除・肝移植症例の検討. 第9回日本臨床腫瘍外科学会学術集会. 横浜, 2011
17. 尾上隆司, 田中友加, 井手健太郎, 番匠谷将孝, 五十嵐友香, 田澤宏文, 山下正博, 堀田龍一, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 田代裕尊, 大段秀樹. 過小グラフトを用いた生体部分肝移植に対するPGE門脈持続注入療法の有用性の検討. 第29回日本肝移植研究会. 仙台, 2011
18. 堀田龍一, 田中友加, Marlen Doskali, 五十嵐友香, 安部智之, 森本博司, 寺岡義布史, 山下正博, 田澤宏文, 番匠谷将孝, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. 末梢血からリモデリングした活性化CD56+細胞のHCV増殖抑制効果. 第29回日本肝移植研究会. 仙台, 2011
19. 田中友加, 井手健太郎, 尾上隆司, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. 成人生体肝移植における免疫監視下での免疫抑制剤の最小化: Operational toleranceの誘導. 第29回日本肝移植研究会. 仙台, 2011
20. 大段秀樹. 肝移植後の肝臓/肝炎再発に対する免疫細胞療法. 第47回日本肝臓学会. 静岡, 2011

21. 梶谷桂子, 田中友加, 五十嵐有香, 片岡健, 大段秀樹. TRAIL陽性NK細胞を用いたNK療法の可能性. 第19回日本乳癌学会学術総会. 仙台, 2011
22. 田代裕尊, 天野尋暢, 小林剛, 井手健太郎, 尾上隆司, 石山宏平, 大段秀樹. 進行性肝細胞癌に対する肝切除の意義・ミラノ基準を逸脱した症例の検討. 第101回広島がん治療研究会. 広島, 2011
23. Ohdan H. Tolerance monitoring in liver transplantation. CAST 2011 アジア移植学会. 韓国, ソウル, 2011
24. Onoe T, Tanaka Y, Hashimoto S, Ide K, Banshoudani M, Igarashi Y, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Continuous portal infusion of PGE1 attenuates portal hypertension and alloimmune responses in adult-to-adult living donor liver transplantation. CAST 2011 アジア移植学会. 韓国, ソウル, 2011
25. Tanaka Y, Tashiro H, Ide K, Onoe T, Ishiyama K, Ohdan H. Tailoring immunosuppressive therapy on the basis of immune monitoring by a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living-donor liver transplantation. CAST 2011 アジア移植学会. 韓国, ソウル, 2011
26. Araki K, Tanaka Y, Ohdan H. A novel method for intracellular profiling of stat activation pattern in T cells responding to allostimulation. CAST 2011 アジア移植学会. 韓国, ソウル, 2011
27. 堀田龍一, 石山宏平, 大平真裕, 五十嵐友香, 田中友加, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. HCCを合併した肝移植患者に対する術後補助療法の確立 —活性化NK細胞療法の臨床経過報告—. 第47回日本移植学会総会. 仙台, 2011
28. 田中友加, 荒木慧, 大段秀樹. アロ応答T細胞のサイトカイン産生能とSTATシグナル解析による分子標的免疫モニタリング法の開発. 第47回日本移植学会総会. 仙台, 2011
29. 田代裕尊, 茶山一彰, 大段秀樹. ドナー由来活性化リンパ球細胞療法による生体肝移植後の敗血症予防. 第15回日本肝臓学会大会. 福岡, 2011
30. Ohdan H. Adoptive immunotherapy for

- inducing anti-HCC and anti-HCV activity after liver transplantation. 21st World congress of the international association of surgeons, gastroenterologists and oncologists. 東京, 2011
31. Ohdan H. Role of macrophage in transplantation. The 2011 fall conference of the Korean association of immunologists. Korea, Seoul, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

IL28B遺伝子多型と肝癌術後および生体肝移植後の C型肝炎に対するIFN治療効果との関連

研究分担者 茶山一彰 広島大学大学院・分子病態制御内科学 教授

研究要旨 C型慢性肝炎に対するインターフェロン(IFN)の治療効果にはIL28B遺伝子多型が関与している。本研究では、肝癌根治術(肝切除術あるいはRFA)後のC型肝炎、あるいは生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV併用療法(PR)の治療成績とIL28B遺伝子多型の関連を検討し、さらに肝生検サンプルあるいはヒト肝細胞キメラマウスを用いてIL28B遺伝子多型と肝内IFN誘導遺伝子発現量の関連を検討した。肝癌根治術後に対するPRの効果は、IL28B(rs8099917) TTの症例でTG/GGの症例に比べ良好であった。生体肝移植後のHCV再感染に対するPRの効果には、レシピエントおよびドナーいずれのIL28Bも関与しており、ドナーおよびレシピエントがともにTTの場合は81%と高いSVR率が得られた。肝生検サンプルを用いた検討では、IL28B TTの症例はTG/GGの症例に比べ、治療前の肝臓内IFN誘導遺伝子(ISGs)発現量が低かった。一方、ヒト肝細胞キメラマウスを用いたIFN投与後の肝臓内ISGs発現量は、IL28B TTの肝細胞を移植したマウスにおいてTGの肝細胞を移植したマウスに比べ高値であった。これらの結果はIL28B TTの症例はTG/GGの症例に比べ、肝内ISGsの発現が低く、IFN投与後に強く誘導されるため治療効果が高いことを示唆するもので

A. 研究目的

われわれは、遺伝子1型あるいは2型のC型慢性肝炎患者においてIL28B遺伝子(rs8099917)の多型が、PEG-インターフェロン(IFN)/リバビリン併用療法(PR)の治療効果に関与していることを報告した。本研究では、肝癌根治術後のC型肝炎、あるいは生体肝移植後のHCV再感染に対するIFN治療効果とIL28B遺伝子多型の関連を明らかにする。さらにIL28B遺伝子多型がどのようにIFN治療効果に影響を及ぼしているのか

を肝臓内IFN誘導遺伝子(ISGs)発現量から検討する。

B. 研究方法

遺伝子1型のC型慢性肝炎患者のうち、肝癌の根治術(肝切除術あるいはRFA)後あるいは生体肝移植後のHCV再感染に対するPRの治療成績とIL28B遺伝子多型の関連を検討し、さらに肝生検サンプルあるいはヒト肝細胞キメラマウスを用いてIL28B遺伝子多型と肝内ISGs発現量の関連を検討した。

C. 研究結果

C型慢性肝疾患患者の肝癌根治術後のHCVに対するPRのSVR率をIL28B遺伝子多型別に検討すると、TTで34%(14/41例)とTG/GGの7%(1/14例)に比べ高値であった。生体肝移植後のHCV再感染に対するPRのSVR率をレシピエントのIL28B遺伝子多型別に検討すると、TTで64%(9/14例)とTG/GGの50%(3/6例)に比べ高値であった。ドナーのIL28B遺伝子多型別に検討すると、SVR率はTTで73%(11/15例)とTG/GGの20%(1/5例)に比べ高値であり、ドナーおよびレシピエントがいずれもTTの場合は81%(9/11例)と高いSVR率が得られた。これらの結果は、生体肝移植後のHCV再感染に対するPRの治療効果においても、ドナーおよびレシピエントのいずれのIL28B遺伝子多型も関与していることを表すものであった。このようにIL28B遺伝子多型はC型慢性肝炎患者に対するIFN療法の治療効果に関与していることが示され、肝癌治療後、生体肝移植後においてもその治療効果に関与していた。何故IL28B TTの患者ではIFN治療効果が高いのかを検討した。IFN治療前の肝生検サンプルを用いて肝臓内ISGs発現量を検討したところ、IL28B TTの症例は、TG/GGの症例に比べ、PKR, MxA, OASなどのISGsの発現は低値であった。IFN投与後の肝臓内ISGs発現量の検討はヒト肝細胞キメラマウスを用いて行った。IL28B TTあるいはTGのヒト肝細胞を移植したマウスにHCVを感染後、IFN- α 1500 IU/gを投与し、6時間後に肝臓内ISGs (PKR, MxA, OAS) 発現量を測定した。肝臓内ISGs発現量はいずれもIL28B TTのヒト肝細胞を移植したマウスにおいて

高値であった。

D. 考察

IL28B 遺伝子多型は、肝癌根治術後のHCVあるいは生体肝移植後のHCV再感染に対するIFN治療においても効果予測因子となることが判明した。IL28B TTの症例において治療効果が高い要因の一つとして、TTの症例は、TG/GGの症例に比べ、肝臓内ISGsの発現が低く、IFN投与後により、その発現がより強く誘導されていること示唆された。

E. 結論

IL28B 遺伝子多型は肝臓内ISGs発現と関連してIFN治療効果と関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Imamura M, Hiraga N, Kawakami Y, Aimitsu S, Kao JH, Kubo M, Tsunoda T, Kumada H, Nakamura Y, Hayes CN, Chayama K. IL-28B predicts response to chronic hepatitis C therapy--fine-mapping and replication study in Asian populations. *J Gen Virol* 92; 1071-81, 2011

2) 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. *J Hepatol.* 54(3); 408-14, 2011

3) Abe H, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. IL28 Variation Affects Expression of Interferon Stimulated Genes and Effect of Peg-Interferon and Ribavirin Therapy. *J Hepatol.* 2011 Jul;55(1):11-8.

4) Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology* 54(3); 764-71, 2011

5) Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. IL28B polymorphism may guide pegylated interferon plus ribavirin therapy even after curative treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepatol* 18(10); 550-60, 2011

2.学会発表

1) Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H and Chayama K. IL28B polymorphism has a possibility as a guide to pegylated interferon plus ribavirin therapy even

after curative treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

2) Chayama K, Takahashi S, Kawakami Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Ohmura T, Ishikawa H, Watanabe H, Guo T, McPhee F, Hughes EA, Kumada H. Dual Oral Combination Therapy with the NS5A Inhibitor Daclatasvir (DCV; BMS-790052) and the NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir (ASV; BMS-650032) Achieved 90% Sustained Virologic Response (SVR12) in Japanese HCV Genotype 1b-Infected Null Responders. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

3) Imamura M, Abe H, Hiraga N, Tsuge M, Takahashi S, C. Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Impact of Viral Amino Acid Substitutions and Host IL28B polymorphism on Replication and Susceptibility to Interferon of Hepatitis C Virus. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

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

研究分担者 田原 栄俊 広島大学大学院医歯薬学総合研究科
細胞分子生物学研究室

研究要旨 NK細胞は体内でのC型肝炎ウイルスの増幅を抑制する。この作用を応用して、生体肝移植後にNK細胞を移植患者に導入することにより、ドナー肝組織がC型肝炎ウイルスに感染するのを防ぎ、移植肝の機能を安定に保つことが期待される。NK細胞を患者自身から大量に得るためには、大量の末梢血細胞から分化誘導する必要があり、患者に大きな負担を強いることになる。この問題を解決するために、患者自身iPS細胞を用いて、NK細胞を大量に分化誘導する方法が有効である。本研究ではヒトiPS細胞から効率的にNK細胞を分化誘導する手法について検討した。分化誘導後のNK細胞がさらに増殖できるように、増殖能力を保持したNK細胞を分化誘導できるiPS細胞を樹立するため、予めテロメラーゼ遺伝子を導入した線維芽細胞を用いてiPS細胞の誘導を行い、複数のクローンを樹立した。

A. 研究目的

NK細胞を大量に分化誘導することを目的とし、より増殖能力を保持したNK細胞を分化誘導できるiPS細胞を樹立する目的で、予めテロメラーゼ遺伝子を発現する線維芽細胞を用いてiPS細胞の誘導を行った。

B. 研究方法

正常線維芽細胞TIG-3にレンチウイルスでテロメラーゼ遺伝子hTERTを導入した。Puromycin含有培地を用いてウイルスが感染した細胞を選択した。多能性遺伝子Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycをそれぞれ発現するレトロウイルスをテロメラーゼ発現TIG-3細胞に感染させ、フィーダー細胞上ES培地でおおよそ1ヶ月間培養した。出現したiPS細胞コロニーをピックアップして2ヶ月以上継代を繰り返し、hTERT-iPS細胞を樹立した。

（倫理面への配慮）

iPS細胞の樹立に用いた正常線維芽細胞TIG-3は、国内の複数の細胞バンクから入手可能な研究に広く使われている細胞であり、倫理面において考慮すべき問題はない。

C. 研究結果

テロメラーゼ発現TIG-3細胞から得られたiPS細胞コロニーは、親株であるTIG-3細胞から得られたiPS細胞のコロニーと同様に細胞のサイズが小さく、核の比率が大きい、そして扁平な単層のコロニーを形成した。内在性の多能性遺伝子の発現を調べた結果、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycに加えてNanogの発現が認められた。さらにES細胞マーカーであるNanogとともに、SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81の発現を免疫蛍光法にて確認した。

D. 考察

hTERT-iPS細胞コロニーは、親株からiPS細胞コロニーが出現するおおよそ20日より1週間ほど遅れて出現した。この出現の遅れはリプログラミングの遅れによるものであり、リプログラミング過程における内在性のOct3/4やNanogの発現を調べた結果、親株のリプログラミング過程においてこれら遺伝子が誘導される時期よりも遅れて誘導されることがわかった。この結果はテロメラーゼ活性の上昇、或いはテロメアの伸長がリプログラミングを負に制御することを示唆している。一方、コロニーをピックアップ後のiPS細胞の

樹立過程において、リプログラミングが不十分なiPS細胞クローンは分化やアポトーシスを引き起こして脱落するが、hTERT-iPS細胞の各クローンは安定に樹立できることがわかった。この結果は、テロメラーゼ活性の上昇、或いはテロメアの伸長がiPS細胞の初期化状態を安定な維持に機能することを示唆している。

E. 結論

テロメラーゼ発現TIG-3細胞から未分化性を維持するhTERT-iPS細胞を樹立した。NK細胞への分化誘導能、分裂寿命の延長は今後の課題であるが、hTERT-iPS細胞から分化誘導した細胞はテロメラーゼ陽性であることが予想されることから、長い分裂寿命を有する分化細胞を誘導できる可能性があり、移植用細胞の供給源として有用であることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

[1] 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, 2011;10:314-321.

[2] Tahara H. Telomere G-overhang length measurement method 2: G-tail telomere HPA, Methods Mol Biol, 2011;735:55-61.

[3] Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Matsunaga J, Takahashi R.U, Takata T, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H, miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence, The Journal of cell biology, 2011;193:409-424.

2. 学会発表

1. 嶋本 顕, 田原栄俊. Generation of induced pluripotent stem cells from Werner syndrome patients. 第19回日本血管生物医学会／第1回 Asia-Pacific Vascular Biology

Meeting. 東京. 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし