

平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究

課題番号：H22-肝炎-一般-008

予定期間：H22年度からH24年度まで

研究代表者：下遠野 邦忠

所属研究機関：千葉工業大学

所属部局：附属総合研究所

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 60, 60, 0009 円, 2年目 58, 522, 000 円

I. 研究の意義

- (1) HCV の持続感染・増殖を支える宿主要因がよくわかっていない。
- (2) HCV の持続的増殖による宿主側の機能変化が不明である。
- (3) 既存の治療薬とは異なる新しいタイプの抗 HCV 薬がない。
- (4) ヒト遺伝子編集酵素による HCV 複製制御機構は不明である
- (5) 抗 HCV 治療に対するマイクロ RNA の挙動は不明である。
- (6) 日本人に最も多い HCV 1b 型のウイルス複製系が少ない。
- (7) HCV による糖尿病素因誘導の分子機序はいまだ明らかにされていない。
- (8) HCV による糖尿病の発症を予防する方策が明確でない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCV の持続感染・増殖を支える宿主要因の解明。
- (2) HCV を排除するための新たな治療法の開発に繋がる。
- (3) 新しい抗ウイルス機構として、ヒト遺伝子編集酵素による複製制御システムが生まれる。
- (4) マイクロ RNA の解析を通して抗ウイルス治療開発の布石とする。
- (5) HCV 1b 型での治療抵抗性機構を解明し、治療法の手がかりとする。
- (6) HCV による制御される新たな宿主因子によるウイルス制御機構が明らかになる。
- (7) HCV による糖尿病の発症を予防する方策の確立を期待できる。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者（下遠野）

- (1) アポリポタンパク質EがHCV粒子に会合して存在し、感染性を規定している事を明らかにした。
- (2) HCV の感染にリポ蛋白質受容体が複数関与する事を明らかにした。
- (3) 高マンノース型レクチンが抗 HCV 作用を示す事を明らかにした。

・研究分担者

- (1) Hsp90 が HCV RNA の翻訳制御に係わる宿主因子であることを見出した。(高久)
- (2) HCV NS5A により GLUT2 と HNF-1 α の遺伝子発現が抑制されることを証明した。(堀田)

- (3) AMP キナーゼを活性化すると、HCV 感染が抑制されることを培養細胞系で証明 (堀田)
- (4) 感染細胞の違いにより異なる宿主遺伝子発現プロファイルを示すことを明らかにした。(加藤)
- (5) 長期間 HCV ゲノム複製が維持されている Li23 細胞で特異的に発現量が上昇している 5 遺伝子と低下している 5 遺伝子を同定した。および特異的に発現変化しているマイクロ RNA 分子種を同定した。(加藤)
- (6) 慢性持続感染した肝組織の HCV に薬剤耐性変異が潜在的にある事を明らかにした。(丸澤)
- (7) HCV 感染・炎症を伴う肝組織に遺伝子編集酵素 (AID 他) が発現されることを確認した。(丸澤)
- (8) IFN 耐性 HCV 株にも抗ウイルス効果のあるマイクロ RNA を同定した。(村上)
- (9) HCV Core のアミノ末端に相互作用する宿主因子を複数同定した。(大島)
- (10) HCV 1b 型由来の新たな HCV サブゲノムレプリコンを 4 種類樹立した。(杉山)
- (11) ノックアウトマウス解析から、HCV の抑制に Riplet が重要であることを発見した。(押海)
- (12) DDX60 分子が、RIG-I によるウイルス RNA 認識を促進することを発見した。(押海)
- (13) HCV 感染しゲノム複製するマウス細胞を樹立した。(押海)

IV. 平成 24 年度の課題

- (1) HCV RNA の翻訳反応を指標とした抗 HCV 剤開発に向け低分子化合物の開発をする。
- (2) SMYD3 と NS5A の相互作用が糖・脂質代謝関連や発癌に及ぼす影響の解析。
- (3) これまでに同定した遺伝子について、ヒト肝細胞における機能解析を行う。
- (4) HCV により発現変動を示した遺伝子とマイクロ RNA 遺伝子との関係を解析する。
- (5) HCV の持続複製により発現変異した遺伝子を人的に制御し抗 HCV 剤開発に向ける。
- (6) ヒト遺伝子編集酵素 AID, APOBEC2 による HCV 制御機構を *in vitro* の培養系で解析する
- (7) 感染性を示す 1b 型全長 HCV ゲノムを作成する。
- (8) リポ蛋白質受容体と HCV 感染を明らかにして新たな抗 HCV 剤開発に向けた研究を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

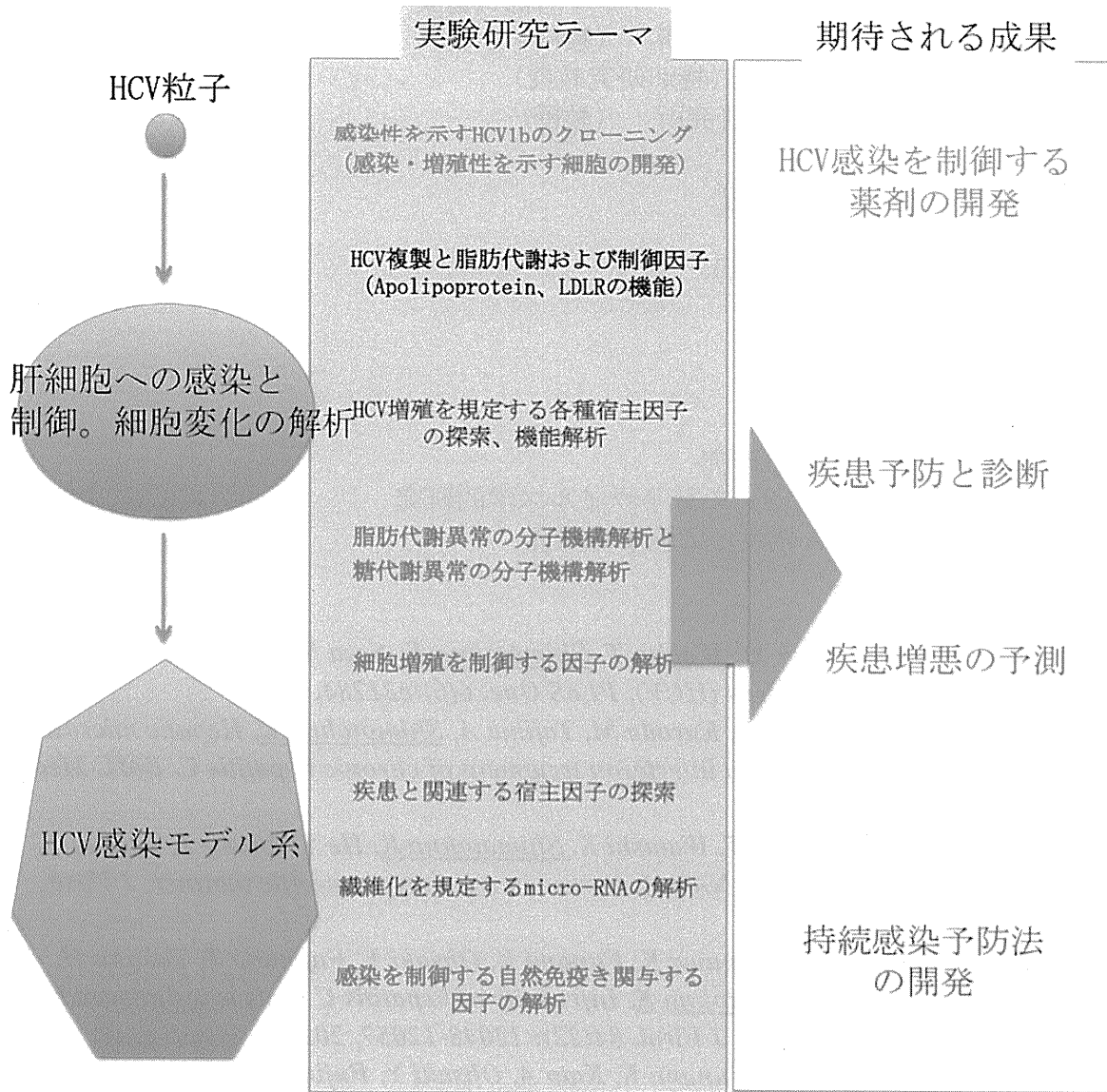
- (1) HCV 増殖による細胞機能修飾の理解が進み、治療効果の向上を目指した抗 HCV 薬や発癌抑制薬の創薬研究につながる事が期待される。
- (2) HCV 感染者の治癒あるいは QOL 改善に向けての基礎研究の充実
- (3) 遺伝子編集酵素によるウイルス制御機構を明らかにすることで、HCV 感染症への新しい治療戦略の開発が期待できる。
- (4) 宿主因子を制御する事による、耐性ウイルスが生じない抗ウイルス剤が開発される。

VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1. Shimizu Y, Hishiki T, Ujino S, Sugiyama K, Funami K, Shimotohno K. Lipoprotein components associated with hepatitis C virus is essential for virus infectivity. *Current Opinion in Virology*. 1: 19-26, 2011
2. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 6(6):e21284, 2011
3. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F,

- Shimotohno K, Fujita T, Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. PLoS One. 6(5):e19799, 2011
4. Morohashi K, Sahara H, Watashi K, Iwabata K, Sunoki T, Kuramochi K, Takakusagi K, Miyashita H, Sato N, Tanabe A, Shimotohno K, Kobayashi S, Sakaguchi K, Sugawara F. Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B. PLoS One. 6(4):e18285. 2011
5. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: A necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. Virus Res. 2011 in press.
6. Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C Virus Infection Promotes Hepatic Gluconeogenesis through an NS5A-Mediated, FoxO1-Dependent Pathway. J Virol, 85(17): 8556-8568, 2011.
7. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved *n*-1 glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis c virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. J Med Virol. (in press)
8. Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. Biochem. Biophys. Res. Commun., 409: 663-668 (2011).
9. Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. J Viral Hepat 2011 (in press).
10. Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T. Genetic Heterogeneity of Hepatitis C Virus in Association with Antiviral Therapy Determined by Ultra-deep Sequencing. PLoS ONE. 6: e24907, 2011.
11. Endo Y, Marusawa H, Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links inflammation to carcinogenesis. J Gastroenterology. 46: 6-10, 2011.
12. Ueda Y, Takada Y, Marusawa H, Egawa H, Uemoto S, Chiba T. Individualized extension of pegylated interferon plus ribavirin therapy for recurrent hepatitis C genotype 1b after living-donor liver transplantation. Transplantation. 90: 661-5, 2010.
13. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. PLoS One. 6(1):e16081,2011
14. Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, and Seya T. DDX60, a DExD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor mediated signaling Mol. Cell. Biol. 31(18): 3802-3819, 2011.
15. Oshiumi H, Sakai K, Matsumoto M, 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. 40(4): 940-948, 2010.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和47年～昭和58年 国立遺伝学研究所 分子遺伝部 (研究員)
 昭和53年～昭和56年 米国 ウィスコンシン大学 McArdle 癌研究所 (博士研究員)
 昭和58年～平成6年 国立がんセンター研究所 ウイルス部 (室長・部長)
 平成6年～平成19年 京都大学 ウイルス研究所 (教授・所長)
 平成19年～21年 慶應義塾大学 医学部 (特別研究教授)
 平成21年～現在 千葉工業大学 附属総合研究所 (教授)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

三浦 謹一郎 (国立遺伝学研究所)
 Howard M. Temin (米国 McArdle 癌研究所)
 杉村 隆 (国立がんセンター研究所)

・主な研究課題

- (1) レトロウイルスの複製機構の解析
- (2) レトロウイルスベクターに関する研究
- (3) ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV) の分子ウイルス学的研究
- (4) HCVの複製機構およびウイルス発がんに関する研究

・これまでの研究実績

- Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). PLoS One. 6(6):e21284, 2011*
- Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. BMC Med Genomics. 3(1): 48, 2010.*
- Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. J Virol. 84(22):11761-1170, 2010.*
- Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. J Virol. 84(22): 12048-12057, 2010.*
- Shimizu Y, Hishiki T, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Kato A, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Shimotohno K. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. Virology. 407(1):152-915, 2010*
- Arimoto K, Funami K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by tripartite motif protein 23 (TRIM23) is critical in antiviral defense. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(36): 15856-15861, 2010*
- Ohshima T, Mukai R, Nakahara N, Matsumoto J, Isono O, Kobayashi Y, Takahashi S, Shimotohno K. HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. J Cell Biochem. 111(1): 187-194, 2010*
- Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Combination therapy for hepatitis C virus with heat-shock protein 90 inhibitor 17-AAG and proteasome inhibitor MG132. Antivir Chem Chemother. 20(4): 161-167, 2010.*
- Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus*

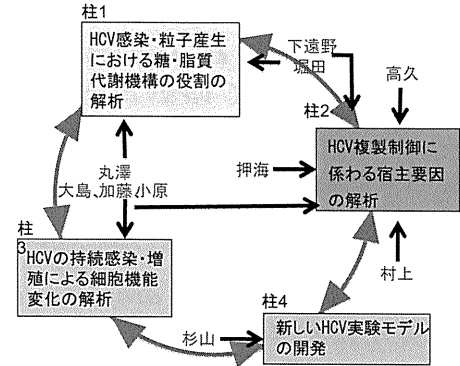
- utilizes lipid droplet for production of infectious virus. Proc Jpn Acad* 85(7): 217-228, 2009
- Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. *Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. Hepatology.* 50(3): 689-696, 2009
- Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. *Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. Cancer Sci.* 100: 1943-1950, 2009
- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T and Shimotohno K., Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104 : 7500-7505, 2007
- Miyinari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. Nat Cell Biol.* 9(9):1089-1097, 2007
- Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. *Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. J Biol Chem.* 282(45):32765-32772, 2007
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyinari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. **Mol Cell.** 19 :111-122, 2005.
- Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. **Hepatology.** 38 :1282-1288. 2003
- Hijikata, M, Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K., Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 90: 10773-10777, 1993
- Tajima, K., Shimotohno, K. and Oki, S. Natural horizontal transmission of HCV in microepidemic town in Japan. **Lancet**, 337: 1410-1411, 1991
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 9524-9528, 1990
- Kitado, H., Chen, I.S.Y., Shah, N.P., Cann, A.J., Shimotohno, K. and Fan, H. U3 sequences from HTLV-I and -II LTRs confer pX protein response to a murine leukemia virus LTR. **Science**, 235: 901-904, 1987
- Shimotohno, K., Takano, M., Teruuchi, T. and Miwa, M. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83: 8112-8116, 1986
- Shimotohno, K., Miwa, M., Slamon, D.J., Chen, I.S.Y., Hoshino, H., Takano, M., Fujino, M. and Sugimura T. Identification of new gene products coded from X regions of human T-cell leukemia viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 302-306, 1985
- Wachsman, W., Shimotohno, K., Clark, S.C., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Expression of the 3' terminal region of human T-cell leukemia virus. **Science**, 266: 177-179, 1984
- Slamon, D.J., Shimotohno, K., Cline, M.J., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia virus. HTLV-I and HTLV-II. **Science**, 266: 61-65, 1984
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Loss of intervening sequence in genomic mouse α -globin DNA inserted in an infectious retrovirus vector. **Nature**, 299: 265-268, 1982
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. **Cell**, 26: 67-77, 1981
- Shimotohno, K., Mizutani, S. and Temin, H.M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. **Nature**, 285: 550-554, 1980

肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究
(H22-肝炎一般-008) (H22~H24)

各班員の研究課題

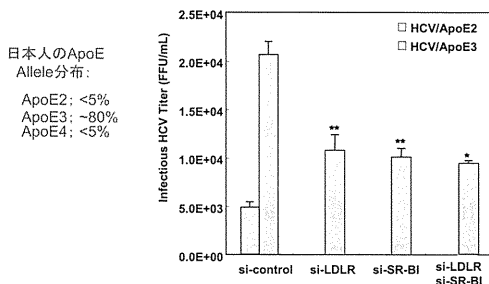
下遠野 邦忠 (代表) (千葉工大・附属研)	HCV粒子感染による代謝異常と疾患の分子基盤
高久 洋 (千葉工大・工)	HCV複製制御に関する宿主因子の解明とその機能解析
堀田 博 (神戸大院・医)	HCVによる糖・脂質代謝異常惹起の分子機序の解析
加藤 宣之 (岡山大院・医)	持続的なHCV複製による細胞機能変化の解析
小原 恭子 (鹿児島大・農)	持続的なHCV感染により生じる病原性の原因となる宿主因子の解析
杉山 和夫 (慶應義塾大学・医)	1b遺伝子型の感染性HCVの開発とその応用
村上 善基 (京都大院・医)	マイクロRNAによるHCV複製制御の解析
丸澤 宏之 (京都大学・医)	ヒト遺伝子編集酵素によるHCV感染制御機構の解析
大島 隆幸 (徳島文理大・薬)	翻訳後修飾を介したシグナル伝達制御機構の解析と抗HCV剤の探索
押海 裕之 (北海道大院・医)	HCV複製制御に係わる自然免疫関連分子Ripletの機能解析

役割分担



柱1 HCV感染・粒子産生における糖・脂質代謝機構の役割の解析

(1) HCV粒子感染には複数のリポ蛋白質受容体が必要である(下遠野)



- (1) ApoE2 を産生する細胞に由来するHCV (HCV/ApoE2) の感染性は低い。
- (2) HCV/ApoE3の感染にはLDLRとSR-BIの両方の存在が必要である。
(さらに、これらの以外のリポ蛋白質受容体を利用していることも示唆する)

(2) HCV NS5A がヒストンメチル基転移酵素SMYD3と会合してヒストンメチル化を抑制する(in vitro)(堀田)。

SMYD3 : SET- and MYND-domain-containing-3

SET domain

(リジンのメチル化酵素ドメイン)

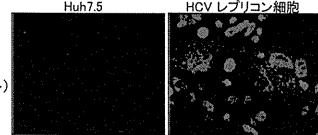


zf-MYND domain

(タンパク質結合ドメイン)

(肝細胞がん、大腸がんおよび乳がんで過剰発現)

NS5A SMYD3の相互作用(赤いスポット)



一次抗体: α-SMYD3 (Rabbit pAb)
α-NS5A (Mouse mAb)

柱2 HCV複製制御に係る宿主要因の解析

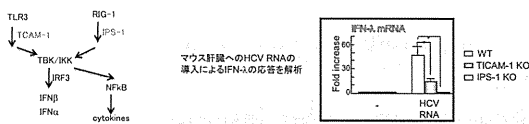
(1) Hsp90がHCV翻訳を制御する事を見出した(高久)。

HCV RNAの翻訳にはHsp90/eIF3c/HCV IRES複合体形成が必須であり、Hsp90阻害剤処理により、複合体が形成されなくなる。



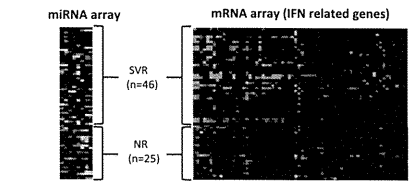
HCV IRESからの翻訳反応の特異的な阻害に向けた研究へ

(2) HCVによるIFN-λの誘導はTLR3およびIPS-1のシグナルに依存する(押海)。



(3) DDX60はRIG-IのRNA結合を促進してI型インターフェロン産生を誘導する(押海)。

(4) IFNとリバリン投与後のNR/SVRのmiRNA解析およびmRNA array解析を行い、両者での違いを調べた(村上)。



NRで発現が多いmiRNA

miR-143 → ISG15の抑制。

miR-143, 145, 18a

SVRで発現が多いmiRNA

miR-27b → HERC5の抑制。

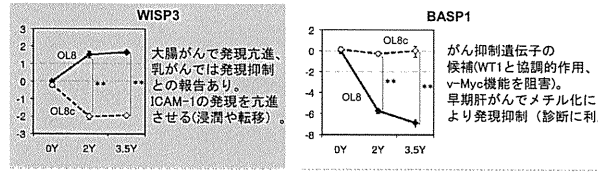
miRNAの解析がインターフェロン治療効率を予測できる可能性がある。

柱3. HCVの持続感染・増殖による細胞機能変化の解析

(1) HCV RNAの長期複製により不可逆的に発現変動した宿主遺伝子の同定 (加藤)

Li 23 (HuH-7とは異なる新規ヒト肝細胞株) を用いて解析
HCV 1b full genome replicon細胞を2年間以上培養して、発現が変化した宿主因子を同定。

不可逆的に発現レベルが亢進した遺伝子	不可逆的に発現レベルが低下した遺伝子
<i>WISP3</i> : Wnt1 inducible signaling pathway protein 3	<i>BASP1</i> : Brain abundant, membrane attached signal protein 1
<i>TBC1D4</i> : TBC1 domain family member 4	<i>CPB2</i> : Carboxypeptidase B2
<i>ANGPT1</i> : Angiotensin 1	<i>ANXA1</i> : Annexin A1
<i>SEL1L3</i> : Sel-1 suppressor of lin-12-like 3	<i>SLC1A3</i> : Solute carrier family member 3
<i>CDKN2C</i> : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C	



(2) コレステロール代謝酵素のひとつがHCVにより亢進(小原)
(DeHydroCholesterol Reductase 24 (DHCR24))

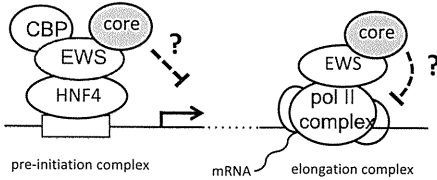
肝がんなどでDHCR24の亢進がみられる

DHCR24は以下の機能を司る。

- i) Cholesterol 合成に関与する。
Acetyl-CoA → Lanosterol → DHCR24 → Cholesterol
- ii) Oxidative stress を制御する。
- iii) Regulation of p53の機能を抑制する。
- iv) DHCR24ノックダウンは抗HCV作用を示す。
- v) 抗コレステロール剤(U18666A) 投与により、キメラマウスへのHCV感染持続が抑制される。

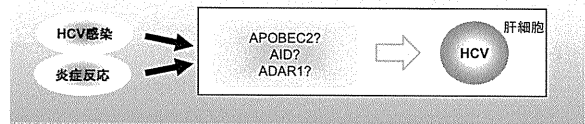
(5) HCV Coreタンパク質は転写因子HNF4の機能を修飾する可能性がある(大島)
CoreがEWSと会合する事を見いだした。

CoreはEWSと会合して核内移行を阻害する結果HNF4依存的な転写を抑制する、あるいはpol II機能を抑制する可能性が考えられる。



脂質代謝異常?
肝機能障害?

(3)HCV感染により誘導される遺伝子編集酵素はHCV replicon配列に変異を導入すると同時に宿主DNAに変異を導入する(丸澤)



HCV RNAへの遺伝子変異解析

遺伝子編集酵素	変異数 (n / total)	変異頻度 (n / 10 ⁴ bp)
ADAR1	2 / 4,163	4.80
ADARB1	2 / 4,163	4.80
APOBEC3F	0 / 4,887	0
APOBEC3G	0 / 5,068	0
AID	0 / 4,706	0

HCV replicon cells に編集酵素を導入した後でISDR領域の配列を解析した。

(4)本邦の未治療例にNS3/4A プロテアーゼ阻害剤の耐性変異が潜在している (丸澤)

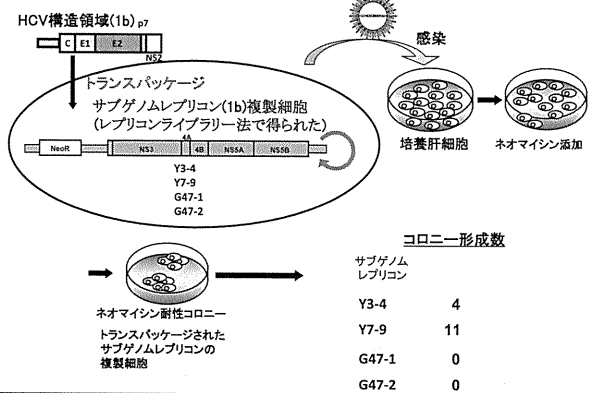
耐性アミノ酸変異	薬剤	耐性株を有する症例の頻度	各症例における耐性株の存在比(%) [*]
T54S/A	Telaprevir Boceprevir	20 / 27 (74.1%)	0.49 (0.21-06.9)
V55A	Boceprevir	16 / 27 (59.3%)	0.4 (0.23-1.53)
V36A/M	Telaprevir Boceprevir	12 / 27 (44.4%)	0.47 (0.20-0.88)
V170A/T	Boceprevir	11 / 27 (40.7%)	0.52 (0.20-1.03)
A156T/V	Telaprevir	7 / 27 (25.9%)	0.35 (0.20-0.80)
R155K/T/Q	Telaprevir Boceprevir	5 / 27 (18.5%)	0.42 (0.22-0.62)
A156S	Telaprevir Boceprevir	3 / 27 (11.1%)	0.35 (0.24-0.83)
D168A/V/T/H	MK-7009 BI-201335	0 / 27 (0%)	

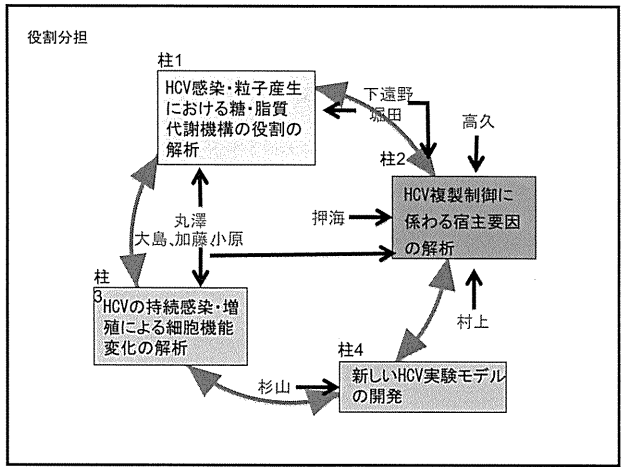
^{*} median(range)

HCVゲノムの変異は病態形成や治療効果と深く関連する可能性あり

柱4. 新しいHCV実験モデルの開発

(1) HCVサブゲノムレプリコン(1b)細胞へのトランスパッケージによる感染性レプリコンの樹立(杉山)





平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題： 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課題番号： H22-肝炎-一般-009予定期間： H22 年度から H24 年度まで研究代表者： 大段 秀樹所属研究機関： 広島大学所属部局： 大学院医歯薬学総合研究科職名： 教授年次別研究費(交付決定額)：1年目 37,180,000 円 2年目 33,462,000 円**I. 研究の意義**

- (1) 肝臓移植後の C 型ウイルス (HCV) 再感染は、進行が早く、予後を悪化させている。
- (2) 肝移植患者では、一般患者に比べインターフェロン療法の効果が低い。
- (3) HCV 感染患者は、自然免疫機能が低下している。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCV 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試験を行う。
- (2) 細胞移入療法に使用し得る自然免疫細胞をリモデリングする。
- (3) HCV 肝硬変に対する肝移植後の HCV 肝炎患者の根治療法が可能となる。
- (4) 肝移植のみならず、HCV 肝炎患者の根治治療が可能となる。
- (5) 肝臓に対する肝移植における癌再発予防が可能となる。

III. 2 年間の研究成果

・研究代表者 (大段秀樹)

- (1) 末梢血リンパ球から増殖させた natural killer (NK) 細胞/NKT 細胞の抗 HCV 効果を HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスで確認した。
- (2) ヒト末梢血 CD34⁺造血幹細胞から NK 細胞の分化・誘導に成功した。
- (3) ヒト末梢血 CD34⁺造血幹細胞から誘導した NK 細胞の抗 HCV 作用を *in vitro* で確認した。
- (4) 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。
- (5) 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。
- (6) 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。

・研究分担者 (茶山一彰)

- (1) HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを作製した。
- (2) ヒト肝細胞キメラマウス内におけるリモデリング NK 細胞/NKT 細胞の生存期間を解析した。
- (3) HCV 感染患者における宿主の IL28B 遺伝子と IFN 治療効果の関係を HCV 感染ヒト肝細胞キメラ

マウスを用いて解析した。

(4) 生体肝移植後の HCV 再感染に対するインターフェロン/リバビリン療法に対する Virological response 率の解析を行った。

・研究分担者(田原栄俊)

(1) ヒト線維芽細胞からヒト iPS 細胞を樹立した。

(2) iPS 細胞の維持に関わる microRNA を解析した。

(3) iPS 細胞からのリプログラミングにおける hTERT の関与について解析した。

(4) テロメラーゼ遺伝子導入体細胞からの iPS 細胞の誘導と維持についての検討を行った。

・研究分担者(田中純子)

(1) リモデリング自然免疫細胞の抗 HCV 作用に関する実験結果を統計学的に判定した。

(2) HCV 感染肝移植患者の長期予後に関する疫学解析を行った。

(3) わが国における肝炎ウイルス感染の疫学に関する成績をまとめた。

(4) 肝移植後を「肝機能障害」と位置づけた場合の障害者数の将来推定の試みを実施した。日本肝移植研究会のまとめた、性・年齢別累積生存率、性・年齢別肝移植後患者数、性・年齢別実績新規患者数の数値を元に、肝移植後の患者数の将来推計を、今年度と来年度に行う予定である。

・研究分担者(立野知世)

(1) 抗 HCV 療法を評価し得るヒト肝細胞とヒト類洞内皮細胞を置換したキメラマウスの作製を試みた。

・研究分担者(伊藤敬)

(1) HCV の増勢と関わる肝再生の分子機構を解析した。

(2) 未分化幹細胞誘導において、ヒストン脱ユビキチン化酵素により幹細胞コロニーの出現頻度に差異が認められることを確認した。

・研究分担者(瀧本康史)

(1) CD34⁺造血幹細胞の年齢別増殖活性を解析した。

(2) HCV 感染患者に対する血液不適合肝移植後の免疫状態を解析した。

IV. 平成 24 年度の課題

(1) ヒト iPS 細胞から NK/NKT 細胞を分化・誘導効率を改善する。

(2) 誘導 NK/NKT 細胞のテロメラーゼ活性を解析する。

(3) ヒト iPS 細胞の維持に関わる microRNA を利用し、誘導の効率化を試みる。

(4) ヒト CD34⁺幹細胞あるいは iPS 細胞から誘導した NK/NKT 細胞の HCV 複製抑制効果について、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いてアニマルテストを行う。

(5) 誘導 NK/NKT 細胞と IFN- α や IFN- β 、抗ウイルス剤との併用効果を、キメラマウスを用いて解析する。

(6) HCV 肝炎症例を対象に免疫細胞療法を臨床応用する場合の対象症例の選定を目的とした当該地域での疫学的評価を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 肝炎の治療成績の向上に伴い、難治性肝疾患に従来費やされた医療費が軽減される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

大段 秀樹 (研究代表者)

- (1) Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3-CD56+ cells for inducing anti-hepatocellular carcinoma and anti-hepatitis C virus activity. Doskali M, Tanaka Y, Ohira M, Ishiyama K, Tashiro H, Chayama K, Ohdan H. Journal of Immunotherapy. J Immunother 34(2):129-38. 2011.
- (2) Tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. Kobayashi T, Itamoto T, Tashiro H, Amano H, Oshita A, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Ohdan H. J Hepatobiliary Pancreat Sci 18(5): 689-699. 2011.
- (3) Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma classified as Child-Pugh class B. Kuroda S, Tashiro H, Kobayashi T, Oshita A, Amano H, Ohdan H. World J Surg 35(4):834-841. 2011.
- (4) Impact of Pegylated Interferon Therapy on Outcomes of Patients with Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma After Curative Hepatic Resection. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H. Ann Surg Oncol. 6[Epub ahead of print]. 2011.

茶山一彰 (研究分担者)

- (1) 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 2011;54(3):764-771.
- (2) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo. Hepatology 2011;54(3):781-788

田中純子 (研究分担者)

- (1)Tanaka J, Koyama T, Mizui M, Katayama K, Matsuo J, Akita T, Nakashima A, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Total Numbers of Undiagnosed Carriers of Hepatitis C and B Viruses in Japan Estimated by Age- and Area-specific Prevalence on the National Scale. Intervirology;54:185-195, 2011.

立野知世 (研究分担者)

- (1) 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. 167:e29-37, 2011.

伊藤敬 (研究分担者)

- (1)Shindo, H. Yasui, K. Yamamoto, K. Honma, K. Yui, K. Kohno, T. Ma, Y. Chua, K. J. Kubo, Y. Aihara, H.Ito, T. Nagayasu, T. Matsuyama, T. Hayashi, H.2011. Interferon regulatory factor-4 activates IL-2 and IL-4 promoters in cooperation with c-Rel. Cytokine.

Ⅶ. Ⅲ (2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)。

昨年度に、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⁺造血幹細胞を用いて培養条件を試行錯誤し、誘導 NK/NKT 細胞を効率的に増殖させる培養法を確立した。すなわち、血液幹細胞培養液 (H3000) に Flt3 (FMS-like tyrosine kinase 3)、SCF (幹細胞因子)、IL-3、IL-6 を添加して 1 週間培養し骨髄由来 CD34⁺ 細胞を未分化のまま増殖させ、その後サイトカインを IL-15、IL-17 に変更し、X-VIVO medium で 2 週間培養することで、400 倍の増殖効率で細胞傷害性分子表出を有する NK 細胞への分化・誘導に成功した (図 3 : プロトコル 2)。また、HCV レプリコン保持肝細胞株 (Huh-7) を用いた 抗 HCV 抑制機能解析において、プロトコル 2 で誘導した NK 細胞が最も強い HCV ウイルス複製抑制効果を発揮した (図 3)。

一方、iPS 細胞から NK 細胞の誘導にも成功した。2 種類のヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞 (01, T i c) 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・誘導を行ったところ、形態学およびフェノタイプ解析で CD56⁺細胞への分化を確認し得た (図 4)。今後、共同研究者らによる研究成果を集結し、テロメラーゼ遺伝子導入体細胞から誘導した iPS 細胞からの NK 細胞への分化・誘導や iPS 細胞の維持に関わる microRNA を用いた誘導効率の改善を図る。

HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた in vivo での抗 HCV 効果実験では、末梢血由来リモデリング NK/NKT 細胞移入により、有意にキメラマウス血清中の HCV-RNA 量の減少・消失を確認した。今後は、CD34⁺造血幹細胞および iPS 細胞からのリモデリング NK/NKT 細胞でのアニマルテストを実施する。

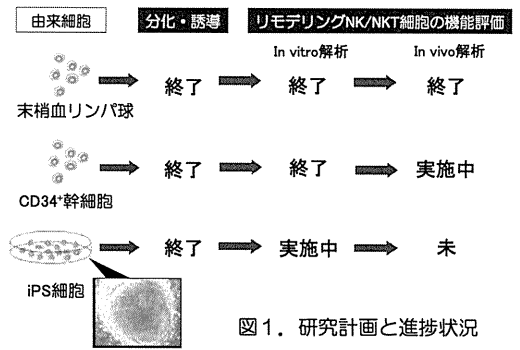


図 1. 研究計画と進捗状況

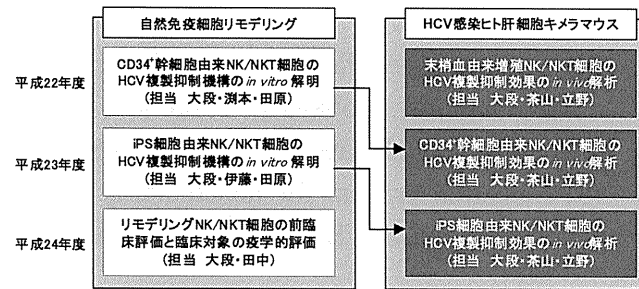


図 2. 研究の流れとチーム体制

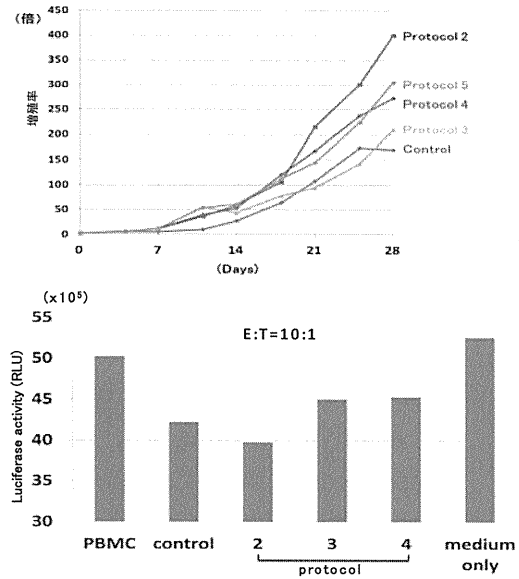


図 3. 骨髄 CD34⁺造血幹細胞由来分化細胞増殖率と HCV 増幅抑制能評価実験 (Replicon assay using Transwell system) (Day28)

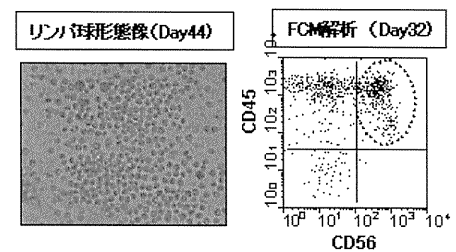


図 4. iPS 細胞からの NK/NKT 細胞の分化・誘導結果

●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

H 4. 5. 1 ~ H 5. 3. 31,	国立循環器病センター レジデント
H 5. 4. 1 ~ H 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
H 9. 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
H16. 4. 1 ~ H19. 3. 31	広島大学病院消化器診療科 助手
H19. 4. 1 ~ H20. 3. 31,	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 講師
H20. 4. 1 ~	広島大学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)、茶山 一彰 (広島大学)、山田 和彦 (鹿児島大学)

・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、 γ δ 細胞) による抗癌治療・抗 HCV 両方の開発
- 2) 免疫細胞による HCV 肝炎治療法の開発
- 3) 異種移植から発想した CD47-SIRP α を介した癌逃避機構の解明と免疫制御法の開発

・これまでの研究実績

発表業績等：

研究実績

- (1) 研究論文数 247 編 (欧文 166 編、和文 81 編、)
- (2) 著書 (レビュー) 数 32 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

平成 23 年 Mentee/Mentor Travel 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. Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRP α capable of binding to human CD47. Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, Ohdan H, Yang YG. Cell Transplant. 2011 [Epub ahead of print].
2. Significance of Platelet Count in the Outcomes of Hepatectomized Patients with Hepatocellular Carcinoma Exceeding the Milan Criteria. Amano H, Tashiro H, Oshita A, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Itamoto T, Asahara T, Ohdan H. J Gastrointest. 2011. Surg 15(7):1173-81.
3. *Tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy.* Kobayashi T, Itamoto T, Tashiro H, Amano H, Oshita A, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Ohdan H. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2011 18(5): 689-699.
4. *Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure.* Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. J Surg Res 2011 167(1): e29-37.
5. *Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma classified as Child-Pugh class B.* Kuroda S, Tashiro H, Kobayashi T, Oshita A, Amano H, Ohdan H. World J Surg 2011 35(4):834-841.
6. *Impact of Pegylated Interferon Therapy on Outcomes of Patients with Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma After Curative Hepatic Resection.* Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H. Ann Surg Oncol 2011 [Epub ahead of print].
7. Suppression of immune responses by nonimmunogenic oligodeoxynucleotides with high affinity for high-mobility group box proteins (HMGBs). Yanai H, Chiba S, Ban T, Nakaima Y, Onoe T, Honda K, Ohdan H, Taniguchi T. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 [Epub ahead of print].
8. Long-Term Outcome of Hepatic Artery Reconstruction during Living-Donor Liver Transplantation. Banshodani M, Tashiro H, Onoe T, Ide K, *Ohdan H. Transplant Proc 2011 43(5):1720-1724.
9. Treatment strategy for early hepatocellular carcinomas: Comparison of radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization and surgical resection. Tashiro H, Aikata H, Waki K, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Chayama K, Asahara T, Ohdan H. J Surg Oncol 2011 104(1):3-9.
10. Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function. Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Daskali M, Tashiro H, Ohdan H. J Transplant Epub 2011 Jul 6.

11. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver. Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. J Hepatol 2011 Jul 11. [Epub ahead of print].
12. Eradication of hepatitis C virus genotype 1 after liver transplantation by interferon therapy before surgery: Report of three patients with analysis of interleukin-28 polymorphism, hepatitis C virus core region and interferon-sensitivity determining region. Kawaoka T, Aikata H, Miyaki D, Murakami E, Azakami T, Takaki S, Nagaoki Y, Hashimoto Y, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. 2011 Hepatol Res. 41(11):1126-31.
13. *Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3-CD56+ cells for inducing anti-hepatocellular carcinoma and anti-hepatitis C virus activity.* Doskali M, Tanaka Y, Ohira M, Ishiyama K, Tashiro H, Chayama K, *Ohdan H. Journal of Immunotherapy. J Immunother 34(2):129-38. 2011.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Quantification of T-cell proliferation for individualizing immunosuppressive therapy for transplantation patients. *Ohdan H. *Clin Pharmacol Ther*. 2010 Jan;87(1): 23-26. Review.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
32. 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, Daskali 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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 May1;39(5):520-524.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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, Ishufuro M, Asahara T. *Transplantation*. 2008 Dec 15;86(11):1565-1571.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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, Banshodani M, Asahara T. Transplantation. 2008 Apr 15;85(7):1060-1064.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.