

201227009A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 25 (2013) 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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 25 (2013) 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法の確立と機能解析 大段 秀樹・田中 友加……………	15
2. 生体肝移植後のC型肝炎ウイルス再感染に対するIFN治療効果の検討 および予防法の開発 今村 道雄……………	21
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. 肝移植後患者数の推計の試み 田中 純子……………	26
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. TRAILレセプター表出による小児肝芽腫における未成熟NK細胞移入 療法有効性の検討 渕本 康史……………	36
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保健学研究院 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24年度は、1) HCV感染患者の肝NK細胞の活性化型受容体NCRとclass I受容体のKIRとNKG2 familyの表出を解析した。2) 肝移植後NK細胞療法の抗HCV効果とIL28B遺伝子多型の関連を解析した。3) 米国FDAの承認を得て、マイアミ大学で肝移植後NK細胞療法の臨床試験を開始した。4) 骨髄CD34⁺細胞からNK細胞誘導効率を改善した。5) iPS細胞からCD34⁺細胞を経てCD56⁺NK細胞を分化誘導するプロトコールを確立した。

研究分担者

今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 助教
田原 栄俊 広島大学大学院 細胞分子生物学研究室 教授
田中 純子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学 教授
立野 知世 株式会社フェニックスバイオ 取締役研究開発部長
伊藤 敬 長崎大学大学院 生化学教室 教授
瀧本 康史 国立成育医療研究センター 臓器・運動器病態外科部 外科医長
田中 友加 広島大学大学院 消化器・移植外科学 助教

A. 研究目的

我々は、natural killer(NK)細胞のC型肝炎ウイルス(HCV)感染患者における特性を解析した結果、肝機能に関連した有意な機能抑制が確認された。そこで、C型肝炎患者に対する肝移植後に、健常な移植肝から採取した活性化NK細胞を移入する抗ウイルス療法を開発し、臨床応用した。しかし、HCV増幅抑制効果は一過性であったため、幹細胞やiPS細胞からNK細胞をリモデリングする方法を開発し、そのHCV増幅抑制効果を検討した。また、以前

我々は、類洞内皮細胞が外来抗原を貪食し、T細胞を抑制する事を報告したが、その解析系としてヒト肝細胞・類洞内皮細胞キメラマウスモデルの作製を試みた。

B. 研究方法

1. NK細胞の受容体と機能関連分子の解析 (担当 大段、田中友、瀧本)

自然免疫を担うNK細胞の受容体には、活性型であるNCRと活性型と抑制型の両者が存在するclass I受容体のKIRとNKG2familyがあるが、それぞれの表出強

度に依存して抗ウイルスを發揮する。また、FasLやTRAILなどアポトーシス誘導分子の表出の程度も抗腫瘍活性と深く関わる。今年度はこれらの受容体およびNK機能関連分子に関して、肝移植施行患者を対象にフローサイトメトリーを用いて網羅的に解析した。また、このNK細胞療法は小児の肝腫瘍の多くを占める肝芽腫への適応拡大に発展しうる可能性がある。そこで、小児肝芽腫組織を用いてTRAIL受容体death receptor (DR) のDR4、DR5、decoy receptor (DcR) のDcR1/DcR2の発現を免疫染色で評価した。

2. 肝移植後NK細胞療法の抗HCV効果とIL28B遺伝子多型の関連を解析 (担当 大段、今村、田中純)

NK細胞の特徴的な機能低下を補填し、肝移植後の抗HCV機能を増強するため、ドナー肝由来活性化NK細胞療法を考案し、臨床試験を施行中である。肝移植の際、ドナーから摘出した肝臓を血液凝固を避けるため臓器灌流を行うが、その排液中のリンパ球分画の約50%がNK細胞である。これを回収し、IL-2と抗CD3抗体を添加して3日間培養する。この操作により、抗腫瘍分子TRAILの発現が増強し、これを移植後3日目に点滴静注する。今年度は活性化NK細胞上のTRAIL以外の機能分子の解析をフローサイトメトリーで行った。また、NK細胞レシピエントのIL28B遺伝子多型と生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/ribavirin併用療法の治療効果あるいはNK細胞移入後のHCV量との関連を解析した。

3. マイアミ大学で肝移植後NK細胞療法の臨床試験を開始 (担当 大段、田中友)

2010年5月に米国FDAの承認を得て、マイアミ大学病院でHCCに対する脳死下肝移植後NK細胞療法のphase I試験を開始した。年間250例の肝移植症例を経験するhigh volume centerに当研究グループ

の医師を派遣し、臨床試験を施行中である。

4. 骨髄CD34⁺細胞からNK細胞誘導効率を改善 (担当 大段、田中友)

単回の細胞療法では抗HCV効果は十分ではなく、治療の継続が必要である。そこで、必要なタイミングに十分なNK細胞を供給できるよう、末梢血リンパ球中のNK細胞を増殖し、HCV感染ヒト肝キメラマウスで有意なHCV感染抑制効果を確認した。しかし、増殖効率と活性化分子誘導の点では、成熟NK細胞を増殖するより、未成熟細胞からの分化誘導が効率的と考えられた。また、HCV感染患者の成熟NK細胞は、もはや抗HCV効果を誘導しにくい事が確認されたので、HCVに対するligandを持たないCD34⁺血液幹細胞やiPS細胞からNK細胞をリモデリングする方法の開発を目指した。

骨髄由来CD34⁺血液幹細胞からNK細胞の分化に必要と考えられている因子として、Flt3, SCF, IL-3, IL-6と、そしてIL-15とIL-7があげられる。その添加のタイミングや最適な培地の組み合わせに至る目的で、試行錯誤を行なった。

5. iPS細胞からCD56⁺NK細胞を分化誘導するプロトコルの確立 (担当 田原、田中友、伊藤)

山中4因子で誘導したiPS細胞をマウス骨髄線維芽細胞をフィーダーとして14日間培養すると、造血幹細胞(CD34⁺CD45⁺)に分化する。これを選択的に回収し、マウス胎児肝線維芽細胞、IL-15, IL-7, SCF, Flt3-L, IL-3とともに30日間培養し、NK細胞への分化誘導が効率的に行われるかを検討した。また、臨床応用に向けた外来遺伝子挿入のないiPS細胞の樹立に向けた条件検討と、完全合成培地によるフィーダーを用いないiPS細胞の培養系の確立を行った。

6. ヒト肝細胞キメラマウスモデルによる in vivo HCV感染抑制評価 (担当 大段、立野、今村)

C型肝炎ウイルスは、ヒト肝臓にのみ感染するため、アニマルモデルでの in vivo 評価が困難である。我々は、マウス肝臓の70%以上をヒト肝細胞で置換されたヒト肝細胞キメラマウスを作製し、さらにHCV持続感染した in vivo モデルを確立している。今年度は、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ため、マウス肝臓の類洞内皮細胞をヒト類洞内皮細胞で置換することを工夫した。さらに、HCV感染ヒト肝キメラマウスを用いて、新規HCV感染予防剤として期待されるエゼチミブの感染抑制評価とリモデリングNK細胞移入による感染抑制能評価を行った。

C. 研究結果

平成24年度の研究成果の概要を記す。

1. NK細胞の受容体と機能関連分子の解析 (担当 大段、田中友、澁本)

有意な表出パターンを示す2つの受容体が抽出された。まず、IFN- γ 産生能と深く関連する事が知られているNCR familyのNKp46は、末梢血レベルでは正常肝移植ドナーと移植を必要とするHCV感染患者で差を認めないが、肝局所のNK細胞では優位な表出の低下が認められ、Child-Pugh Cではさらなる down-regulationが確認された。そしてMICA、MICBなど non-classical なMHCクラス I 様蛋白質を認識して活性を促進するNKG2Dは、IFN α による抗HCV効果を仲介することが知られているが、やはり末梢レベルのNK細胞に表出の程度の差を認めなかったが、肝内在NK細胞の表出はHCV患者では健常ドナーに比べ有意に低下していた。また、NK細胞感受性の評価のために、小児肝芽腫組織を用いてTRAIL受容体 death

receptor (DR) の DR4、DR5、decoy receptor (DcR) の DcR1/DcR2 の発現を免疫組織化学染色で実施したが、今回の検討ではレセプター表出はいずれも認めなかった。今後、別症例での評価およびTRAIL以外の分子に対するレセプター表出を検討する。

2. 肝移植後NK細胞療法の抗HCV効果と IL28B遺伝子多型の関連を解析 (担当 大段、今村、田中純)

広島大学での第1相試験では、ミラノ基準外肝癌症例で、NK細胞施行例では、同時期に施行した非施行例に比べ有意な無再発生存率の改善を認めた ($p < 0.05$)。HCV感染例においては、IL-28 SNP Major 症例において、HCV-RNAの上昇が有意に抑制され、NK細胞療法のレスポンスであることが確認できたが、その効果は再感染を予防するレベルには至らなかった。次に、C型肝炎肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBVのSVR率で検討すると、レシピエント・ドナーともIL-28 SNP Major 症例で有意な高SVR率を認めた。

3. マイアミ大学で肝移植後NK細胞療法の臨床試験を開始 (担当 大段、田中友)

対象はStage IIの肝癌症例で、目標症例数は25例とした。エンドポイントは2年後の再発率である。現在まで13例施行し、有害事象を認めず、全例生存し、未だ再発例を認めていない。

4. 骨髄CD34⁺細胞からNK細胞誘導効率を改善 (担当 大段、田中友)

培養最終段階の4週間後にIL-12とIL-18を同時に添加することで、NK細胞にNKG2DやKNp46やTRAILが表出し、かつIFN- γ 産生能が亢進することを確認した。

HCVレプリコン含有肝癌細胞株を標的としたリモデリングNK細胞の培養実験では、CD34幹細胞由来のNK細胞に最も強い

抗HCV増幅抑制効果を観察できた。また、ヒト肝キメラマウスモデルを用いたHCV感染抑制実験では、細胞非移入群では、HCVウイルス量の増加が認められるのに対し、リモデリングNK細胞移入群では感染が成立せず、HCV感染抑制能が*in vivo*においても証明された。現在、HCV感染肝移植患者における再感染予防療法として臨床応用するべく、準備を進めている。研究室レベルでは、 1×10^6 個のCD34⁺細胞から 1×10^9 個の活性化NK細胞が分化誘導され、回収可能である。

5. iPS細胞からCD34⁺細胞を経てCD56⁺NK細胞を分化誘導するプロトコルを確立 (担当 田原、田中友)

培養 14 日には CD34⁺造血幹細胞分画が、32 日には NK 細胞分画が確認されたが、肝細胞キメラマウスに移入して機能解析を施行するレベルでの誘導効率にいたらなかった。現在は、テロメアーゼ活性が保持された hTERT 遺伝子を誘導した iPS 細胞からの NK 細胞の分化を試みている。

6. ヒト肝細胞キメラマウスモデルによる *in vivo* HCV感染抑制評価 (担当 大段、立野、今村)

マウス肝臓の類洞内皮細胞をヒト類洞内皮細胞 (hLSEC) で置換する工夫として、昨年度までとは異なるドナーから得られたhLSEC、および不死化hLSEC TMNK-1細胞を移植細胞として用いた。その結果、キメラマウスへの生着を確認することは出来たが、肝臓内での増殖が観察されず、さらなる工夫が必要であると示唆された。さらに、HCV感染ヒト肝キメラマウスを用いてエゼチミブの感染予防評価を行った結果、HCV感染前からの薬剤経口投与により、非投与群に比べ有意な感染阻害効果が得られた。さらに、HCV感染キメラマウスへのCD34⁺細胞からのリモデリングNK細胞移入による感染抑制能評価を

行った結果、非移入群に比べ感染の抑制傾向を認めた。今後はiPS由来リモデリングNK細胞を用いて評価を行う。

D. 考察

本研究は、自然免疫細胞であるNK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24年度の研究は、計画通りに順調に進行した。今後、ミラノ基準外肝癌に対するNK細胞移入療法を広島大学とマイアミ大学で継続する。そして、CD34⁺幹細胞から誘導したNK細胞移入療法の臨床試験を開始する予定である。一方で、臨床使用のためのiPS細胞由来NK細胞の誘導効率改善を図る。

また、HCV感染阻害が期待できる新規の治療手段を検討してきたが、その中でDNA polymerやNPC1L1拮抗薬Ezetimibeなどが有望なHCV感染阻害薬であることが検証された。今後NK細胞療法との相乗効果を期待して研究を継続する予定である。

E. 結論

- HCV 感染患者の肝 NK 細胞の活性化型受容体 NCR と class I 受容体の KIR と NKG2 family の表出を解析した。
- 肝移植後 NK 細胞療法の抗 HCV 効果と IL28B 遺伝子多型の関連を解析した。
- 米国 FDA の承認を得て、マイアミ大学で肝移植後 NK 細胞療法の臨床試験を開始した。
- 骨髄 CD34⁺細胞から NK 細胞誘導効率を改善した。
- iPS 細胞から CD34⁺細胞を経て CD56⁺NK 細胞を分化誘導するプロトコルを確立した。

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法の確立と機能解析

研究代表者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究分担者 田中友加 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 助教

研究要旨 本研究は、HCV患者に対する新規根治療法として、自然免疫細胞リモデリングによってHCV肝炎の根治を図ることを目的とし、末梢血CD56⁺細胞、CD34⁺造血幹細胞やiPS細胞からNK/NKT細胞を効率よく分化・誘導する方法を確立する。本年度は、抗HCV活性の高い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法を確立し、誘導NK細胞のフェノタイプおよび機能マーカーの発現を解析した。また、*in vitro*、*in vivo*モデルを用いたリモデリングCD56⁺細胞の抗HCVウイルス増幅抑制効果を確認した。さらに臨床肝移植症例において肝内リンパ球のフェノタイプ解析を行い、肝内NK細胞免疫活性と術後HCVウイルス推移との関連をつきとめた。

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、癌再発の有意な低下とウイルス量の減少を得た。本研究は、HCV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細胞から誘導したりリモデリング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、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。平成22~23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。

そこで、本年度は、ヒト骨髄由来CD34⁺造血幹細胞からのリモデリングNK/NKT細胞の誘導、増殖効率の増強を目指すとともに、iPS細胞からのリモデリング培養法の確立を目指した。

さらに、NK細胞療法で抗HCV効果を有した肝臓内NK細胞について、末梢血および肝臓内存在比率および機能が移植後のHCVウイルス感染抑制に寄与するか否かを確認するため、肝移植のレシピエントおよびドナーの肝内NK細胞の表面マーカーの検索を行い、肝障害度との関連性を検討し、さらに術後のHCVウイルス量の変化との関係を解析した。

B. 研究方法

1. 骨髄由来 CD34⁺造血幹細胞から NK 細胞への分化・誘導と抗 HCV 効果の評価

昨年度は、骨髄由来 CD34⁺血液幹細胞から NK 細胞の分化に必要と考えられている因子として、Flt3, SCF, IL-3, IL-6, IL-15 および IL-7 を添加因子として採用した。また、培地についても種々検討し、最終的に血液幹細胞用培地である H3000 および NK 細胞培養に適している X-VIVO を候補として挙げた。本年度は、これらの培地の組み合わせと添加のタイミングや培養日数を試行錯誤した。さらに、肝臓内免疫環境を模倣するために、肝内マクロファージが産生し、IFN- γ 産生能を高めるサイトカインとして知られる IL-12 と IL-18 の添加によるリモデリング NK/NKT 細胞のフェノタイプについて解析した。

リモデリングによって得られた細胞のフェノタイプはフローサイトメトリーによって表現系と機能分子、および細胞内 IFN- γ 産生能を評価した。抗 HCV 効果判定には、HCV レプリコンアッセイによる *in vitro* HCV 増幅抑制能評価と、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* 検証を行った。

2. iPS 細胞から NK 細胞への分化・誘導法の確立

ヒト iPS 細胞を Flt3, SCF, IL-3, IL-6, IL-7, IL-15 を添加してフィーダ細胞とともに 14 日間培養し造血幹細胞および NK 細胞への分化誘導を試みた。また、分担研究者である田原らが作成した hTERT 遺伝子導入 iPS 細胞からのリモデリングによってテロメア長を維持した、より細胞寿命の長い NK/NKT 細胞の作成が可能であるか否か検討した。

3. 肝臓内 NK 細胞フェノタイプ解析

広島大学病院で施行した肝移植症例のうち、同意の得られたレシピエント、ドナーを対象に肝臓内リンパ球として摘出肝の臓器灌流液、および、末梢血中の NK 細胞を中心とするリンパ球関連マーカーをフローサイトメトリーで解析し、肝予備能と NK 細胞表面分子の関連について検討を行った。

C. 研究結果

1. 骨髄由来 CD34⁺造血幹細胞から NK 細胞への分化・誘導と抗 HCV 効果の評価

各種の添加因子および培地の組み合わせと添加のタイミングや培養日数を試行錯誤した結果、未成熟 NK 細胞の分化には H3000 に Flt3, SCF, IL-3, IL-6, IL-15, IL-7 を添加し 1 週間培養後 X-VIVO メディウムに Flt3, SCF, IL-15, IL-7 を加え、さらに 21 日間培養で効率的に誘導し得ることを確認した。さらに、培養最終段階の 4 週間後に IL-12 と IL-18 を同時に添加することで、成熟し NKG2D や KNp46 や TRAIL が表出し、かつ IFN- γ 産生能が亢進することを確認した。様々な方法を検討し、最終的に得られた誘導細胞は、肝臓内 NK 細胞と類似して活性化マーカー (NKp30, 44, 46) および抗腫瘍分子 (TRAIL, NKG2D) を表出しつつ KIR を失っており、Unlicensed type NK 細胞様のフェノタイプを示した (図 1)。また、活発な IFN- γ 産生能を認め、*in vitro* での抗 HCV 効果と、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* 検証においても HCV 抗効果を確認した (図 2)。これらの結果は、CD34⁺幹細胞からのリモデリングによる NK/NKT 細胞を用いた抗 HCV 療法の臨床応用の可能性が示唆される。

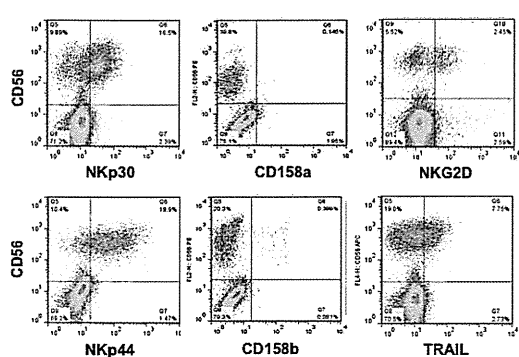


図1：ヒト骨髄CD34⁺造血幹細胞から誘導した未成熟NK細胞のフェノタイプ解析。Natural cytotoxicity receptor (NKp30・44)およびTRAIL・NKG2Dを発現するが、KIR (CD158a,b)は発現していない。

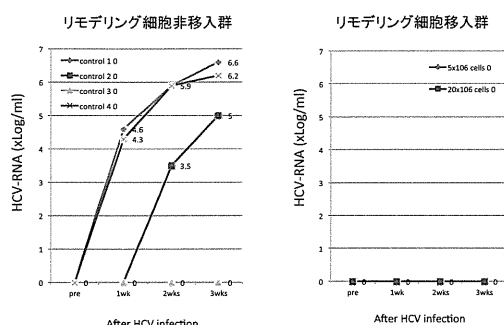


図2：ヒト骨髄 CD34⁺造血幹細胞から誘導した未成熟 NK 細胞を HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに移入した結果。リモデリングNK細胞移入によってHCV感染を回避できた。

2. iPS 細胞から NK 細胞への分化・誘導法の確立

ヒト iPS 細胞を Flt3、SCF、IL-3、IL-6 を添加して 14 日間培養し造血幹細胞に分化させた後、IL-15、IL-7、SCF、Flt3-L、IL-3 を添加し 30 日間培養することで、NK 細胞への分化が可能となったが、細胞増殖率が低く、さらなる検討が必要と考えられる。また、2 種類のヒト線維芽細胞由来 hTERT 遺伝子導入細胞 (H07, H08) を用いて、同様のリモデリングを試みたが、NK 細胞への分化誘導は確認されず、培養条件の再検討を継続中である。

3. 肝臓内 NK 細胞フェノタイプ解析

レシピエントおよびドナーの末梢血と肝灌流液中のリンパ球解析はフローサイトメトリーで実施した。項目は、Natural Killer 細胞

の表面抗原 (CD3, CD56) とともに活性化因子 (NKp30, 44, 46, NKG2D)、抑制性因子 (CD158a, CD158b)、アポトーシス誘導抗原 (Fas L, TRAIL)、IL-2 レセプター抗原 (CD25, CD122) 等の表出について評価した。その結果、末梢血 NK 細胞では、レシピエントとドナー間で有意な差は認めなかったが、肝内 NK 細胞において、肝局在 NK 細胞の活性化因子である NKp46 と NKG2D の表出が、健常人であるドナーにくらべ低下しており、またレシピエントの肝予備能の低下に伴って減少することを確認した。さらに、ドナー肝の NKp46 の発現強度を強発現と低発現群に分類し、肝移植後のレシピエントの血清中 HCV-RNA 量との相関を確認すると、NKp46 強発現では術後 1 週間目に HCV ウイルス量は抑制されていたのに対し、低発現群では術前値もしくはそれ以上の値であり有意差をみとめた。しかしながら、この差は術後経過とともに消失していることから、ドナー肝の NKp46 の強発現は肝移植術後早期 (1 週間以内) に起こるウイルスの replication の抑制能があることを示唆した。

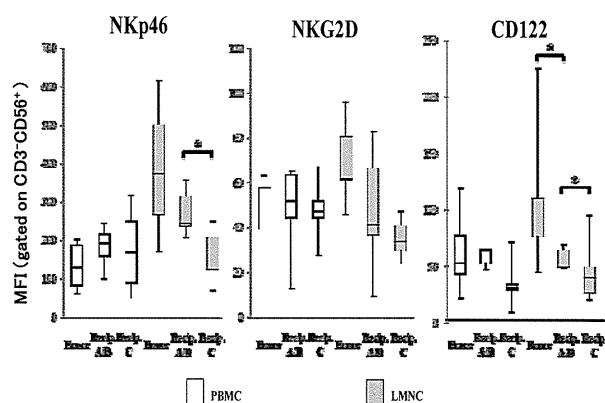


図3：肝移植ドナーおよびレシピエントの末梢血および肝内NK細胞におけるNKp46、NKG2D、CD122 (IL-2R) の発現強度。NKp46およびCD122は肝障害度にもなって発現が低下し、とくにChild-Pugh Cにおいて有意に発現低下をみとめた。

D. 考察

肝移植後には免疫抑制療法のため獲得免疫である T/B 細胞応答性が抑制される。自然免疫細胞であるマクロファージ、DC、NK 細胞はウイルス、細菌や腫瘍に対して活性を有しており、免疫抑制剤の影響を受けにくいとされている。とくに NK 細胞は、腫瘍細胞に対する傷害能や IFN 産生能が高い。しかし、肝硬変・肝臓癌の患者では NK 細胞の数・活性ともに低下していることが報告されている。そこで、我々は、活性化 NK 細胞をレシピエントに移入することで、“宿主の免疫能を低下させない制癌、抗ウイルス療法”を確立し、臨床導入している。これまでの NK 療法実施群の中で、C 型肝炎合併症例における術後のウイルス量を解析すると肝移植後活性化リンパ球移入療法の実施によって、非移入群に比べ、術後の HCV-RNA の低下を示すことがわかったが、一方でその効果には個人差があることも判明した。近年、NK 細胞には、自己の HLA からの教育を受けたか否かによって、Licenced タイプと Unlicenced タイプに分類し得ることがわかってきた。これまでのリモデリングで得られた NK/NKT 細胞は KIR の発現がなく、Unlicenced タイプと考えられる。今後は、HCV 効果の増強にどちらが優位に働くかを確認し、リモデリング高率を上げる工夫が必要と考える。また、肝移植術後のウイルス再感染において肝臓内の NK 細胞の関与を解析したが、肝臓移植レシピエントの NK 細胞の活性化は肝障害度に従って低下していることが分かった。またグラフト肝内の NK 細胞の NKp46 の表出強度が移植後の HCV 増幅と深く関わる事が判明した。今後 NKp46 を介した抗 HCV 機構を解明したい。

E. 結論

抗 HCV 活性の高い 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法を確立し、誘導 NK 細胞のフェノタイプおよび機能評価によって抗 HCV ウイルス増幅抑制効果を確認した。さらに臨床肝移植症例において肝内リンパ球のフェノタイプ解析を行い、肝内 NK 細胞免疫活性と術後 HCV ウイルス推移との関連をつきとめた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwako H, Tashiro H, Amano H, Tanimoto Y, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Nambu J, Mikuriya Y, Abe T, Ohdan H. Prognostic significance of antithrombin III levels for outcomes in patients with hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Ann Surg Oncol*. 2012. 19(9):2888-2896.
2. Oshita A, Tashiro H, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ide K, Takaki S, Takahashi S, Arihiro K, Chayama K, Ohdan H. Safety and feasibility of diet-treated donors with steatotic livers at the initial consultation for living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2012. 93(10):1024-1030.
3. Tashiro H, Ide K, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ishiyama K, Kuroda S, Tazawa H, Kono H, Aikata H, Takahashi S, Chayama K, Ohdan H. Surgical treatment for portosystemic encephalopathy in

patients with liver cirrhosis: Occlusion of portosystemic shunt in combination with splenectomy. *Hepatol Res.* 2012. 6[Epub ahead of print].

4. Ohira M, Nishida S, Tryphonopoulos P, Tekin A, Selvaggi G, Moon J, Levi D, Ricordi C, Ishiyama K, Tanaka Y, Ohdan H, Tzakis AG. Clinical-scale isolation of interleukin-2-stimulated liver natural killer cells for treatment of liver transplantation with hepatocellular carcinoma. *Cell Transplant.* 2012. 3[Epub ahead of print].

5. 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. 134(1):139-155.

6. Kobayashi T, Ishiyama K, Ohdan H. Prevention of recurrence after curative treatment for hepatocellular carcinoma. *Surg Today.* 2012. 12[Epub ahead of print].

2. 学会発表

1. Tanaka Y, Ohdan H. NK cells differentiated from hematopoietic stem cells exert anti-HCV activities. 第41回日本免疫学会学術集会. 2012. 12. 5-7. 神戸.

2. 安部智之, 田代裕尊, 尾上隆司, 石山宏平, 井手健太郎, 田澤宏文, 大段秀樹. 生体肝移植後に発生したNODAT症例についての検討. 第48回日本移植学会総会. 2012. 9. 20-22. 愛知.

3. 谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 堀田龍一, 五十嵐友香, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹.

C型肝炎患者における Natural Killer 細胞の活性化委レセプターの表出は肝予備能に依存して低下する. 第48回日本移植学会総会. 2012. 9. 20-22. 愛知.

4. 天野尋暢, 田代裕尊, 小林剛, 黒田慎太郎, 田澤宏文, 楠部潤子, 御厨美洋, 安部智之, 尾上隆司, 大段秀樹. 肝細胞癌術後多発再発に対する治療戦略. 第67回日本消化器外科学会. 2012. 7. 18-20. 富山.

5. Ohira M, Nishida S, Tryphonopoulos P, Levi D, Selvaggi G, Akin T, Fan J, Uchida K, Hibi T, Dohi T, Wepllor D, Ruiz P, Ricordi C, Ishiyama K, Ohdan H, Tzakis A. Phase I Immunotherapy Using Liver Natural Killer Cells for Preventing Recurrence of Hepatocellular Carcinoma in Cadaveric Donor Liver Transplantation. *American Transplantation Congress 2012.* 2012. 6. 2-6. Boston, America.

6. Tanaka Y, Ohdan H. Novel Immune Regulatory Strategy with Combined Anti-IL-2R α and Anti-IL-6R mAbs Therapy To Prevent T-Cell Alloimmune Responses. *American Transplantation Congress 2012.* 2012. 6. 2-6. Boston, America.

7. Hotta R, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tanaka Y, Onoe T, Ide K, Tashiro H, Ohdan H. Adoptive Immunotherapy with Donor Derived-Liver Natural Killer Cells Prevents HCC Recurrence after Liver Transplantation in Recipients Exceeding the Milan Criteria. *American Transplantation Congress 2012.* 2012. 6. 2-6. Boston, America.

8. 堀田龍一，石山宏平，大平真裕，五十嵐友香，安部智之，平田文宏，橋本慎二，森本博司，寺岡義布史，山下正博，田澤宏文，田中友加，井手健太郎，尾上隆司，田代裕尊，大段秀樹．HCC 合併肝移植症例に対する再発予防を目的とした活性化 NK 細胞療法の有用性．第 112 回日本外科学会定期学術集会．2012. 4. 12-14. 千葉.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

生体肝移植後のC型肝炎ウイルス再感染に対するIFN治療効果の検討 および予防法の開発

研究分担者 今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 助教

研究要旨： 昨年度， C型慢性肝炎患者における生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/ribavirin (RBV) 併用療法の治療効果にIL28B遺伝子 (rs8099917) 多型が関与していることを報告したが， 本年度はさらに症例数を増やし検討した． またヒト肝細胞キメラマウスを用いてエゼチミブのHCV感染予防効果について検討した． 生体肝移植後， HCV再感染を生じた22例に対するPEG-IFN/RBV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68% (11/16例) とTG/GGの50% (3/6例) に比べ高値であり， ドナーのIL28B遺伝子多型別に検討すると， TTで76% (13/17例) とTG/GGの20% (1/5例) に比べ有意に高値であった($p=0.039$)． これらの結果から生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV療法においてドナーおよびレシピエントのIL28B遺伝子多型がその治療効果に関与していることを表すものであった． ヒト肝細胞キメラマウスへのHCV投与前より薬剤を経口投与したところ， 非活性型薬剤投与群ではHCV投与1週後， 血中HCVは5頭すべて (100%) が陽性になったのに対し， エゼチミブ投与群では7頭中2頭 (29%) のみが陽性となり ($p=0.013$) ， エゼチミブのHCV感染阻害効果の可能性が示された．

A. 研究目的

昨年度， C型慢性肝炎患者における生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/ribavirin (RBV) 併用療法の治療効果にIL28B遺伝子 (rs8099917) 多型が関与していることを報告した． 本年度はさらに症例数を増やし検討した． またヒト肝細胞キメラマウスを用いてエゼチミブのHCV感染予防効果について検討した．

B. 研究方法

遺伝子1型のC型慢性肝炎患者に対する生体肝移植後にHCV再感染を生じた22例においてPEG-IFN/RBVのウイルス排除 (sustained virological response, SVR) 率とIL28B遺伝子多型の関連を検討した． またヒト肝細胞キメラマウスに10 mg/kg/BWのエ

ゼチミブあるいはControlとして非活性型の薬剤を2週間連日経口投与後， 10^5 copyのHCVを静脈内投与した． 投与1週後にマウス血液を採取し， 血中HCV RNA量をreal-time PCRにて測定した．

C. 研究結果

C型慢性肝疾患患者における生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV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68% (11/16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76% (13/17例) とTG/GGの20% (1/5例) に比べ有意に高値であった ($p=0.039$) ． 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。

ヒト肝細胞キメラマウスにおいて、非活性型薬剤投与群ではHCV投与1週後、血中HCVは5頭すべて（100%）が陽性になったのに対し、エゼチミブ投与群では7頭中2頭（29%）のみが陽性となった（ $p=0.013$ ）。

D. 考察

生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV療法には、ドナーおよびレシピエントの両者のIL28B遺伝子多型も関与していることが示された。ヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討結果から、エゼチミブがC型肝炎患者における生体肝移植後のHCV再感染の予防に有効である可能性を示すものである。

E. 結論

IL28B遺伝子多型は生体肝移植後のPEG-IFN/RBV療法の効果に関与する。ヒト肝細胞キメラマウスを用いてHCV再感染予防の検討が可能である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA, Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. Nat Med :1281-5,2012

2) Kawaoka T, Takahashi S, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Onoe T, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. IL28B SNP of donors and recipients can predict virological response to PEGIFN/RBV therapy in patients with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. J Gastroenterol Hepatol. 2012;27(9):1467-72

2.学会発表

1) 今村道雄, 阿部弘美, 平賀伸彦, 越智秀典, 茶山一彰. C型肝炎ウイルスの感染およびIFN治療におけるIL28B遺伝子多型の影響. 平成24年6月21日第77回インターフェロンサイトカイン学会, 神戸

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保健学研究院
細胞分子生物学研究室

研究要旨 生体肝移植患者に移植後 NK 細胞を導入することにより、ドナー肝組織の C 型肝炎ウイルスによる感染の防御が可能であり、患者に負担を強いることなく NK 細胞を大量に得るためには、患者自身の iPS 細胞を NK 細胞に分化誘導する方法が有効である。本研究では臨床応用に向けた外来遺伝子挿入のない iPS 細胞の樹立に向けた条件検討と、完全合成培地を用いたフィーダーを用いない iPS 細胞の培養系の確立を行った。外来遺伝子挿入のない樹立手法として末梢血リンパ球へのエピソーマルベクターの導入効率は iPS 樹立には不十分であり、センダイウイルスが優れていることが明らかとなった。また細胞外基質として組換えビトロネクチンを用いることにより、無血清完全合成培地を用いて iPS 細胞を維持培養することが可能であることを明らかにした。

A. 研究目的

iPS細胞樹立の標準的な方法は多能性遺伝子を発現するレトロウイルスやレンチウイルスを用いるものであるが、高発現可能で樹立が容易である一方、ウイルスゲノムがヒト染色体に挿入され、臨床には応用できない。臨床応用に向けた外来遺伝子挿入のないiPS細胞の樹立方法として、染色体外で安定に自律複製可能なエピソーマルベクターを用いる方法を検討した。

iPS細胞の維持培養に用いられる標準的な培養法は、他種の成分を含む血清代替品を補完した培地を用い、マウスの細胞をフィーダーとして用いる方法であるが、このような培養条件で維持されたiPS細胞は臨床には応用できない。フィーダーの代わりとなる細胞外マトリクスとして普及しているマトリゲルと、I型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、及び組換えビトロネクチンを検討した。

B. 研究方法

エピソーマルベクターとして、京都大学・山中教授らのグループが開発したpCXLE-hOCT3/4_shp53, pCXLE-hSK, pCXLE-hULを入手した。プラスミドの導入効率評価には緑色蛍光タンパク質を発現するpCXLE-EGFPを用いて、末梢血より分離・培養した末梢血

リンパ球に電気パルス法で導入することにより評価した。

フィーダーの代わりとなる細胞外マトリクスとして、マトリゲル、I型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、及び組換えビトロネクチンを培養ディッシュにコーティングし、培地には完全合成培地であるEssential 8を用いた。フィーダーを用いて維持されているiPS細胞を回収してEssential 8培地に懸濁し、それぞれの細胞外マトリクスのコーティングが施されたディッシュに播種した。5日から1週間に一度のペースで継代を行い、iPS細胞の形態を経日的に観察した。

（倫理面への配慮）

本研究に用いたiPS細胞は、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

pCXLE-EGFPをレポーターとして、末梢血より分離・培養した末梢血リンパ球に電気パルス法で導入した結果、導入効率は5～10%であった。レトロウイルスを用いたiPS細胞の樹立実験では、ウイルスの導入効率が30%以上であれば、樹立に十分なiPS細胞のコロニーを

得ることができ、平均的には40~50%の導入効率でiPS細胞の樹立を行なっている。したがって、エピソームベクターを用いた末梢血リンパ球からのiPS細胞の樹立は、その遺伝子導入効率の問題から十分に困難であることが予測された。

医薬基盤研究所・JCRB細胞バンクから入手したヒトiPS細胞を含む13株を用いて、マトリゲル、I型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、及び組換えビトロネクチンをコーティングした培養ディッシュに培養したところ、ほぼ全てのiPS細胞株はI型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンをコーティングした培養ディッシュ上で増殖の停止と分化誘導が観察された。マトリゲルをコーティングした培養ディッシュで培養した場合には、未分化の形態を保持して増殖が認められたものの、継代するとほとんどの株で分化が誘導されたが、わずかに1株は維持培養が可能であった。組換えビトロネクチンをコーティングした培養ディッシュで培養した場合には、ほとんどの株で未分化の形態を保持して2~3度の継代が可能であったが、長期にわたる維持培養はできなかった。しかし、2株は長期にわたる維持培養が可能であり、三胚葉への多分可能も維持されていることが確認された。

D. 考察

外来遺伝子挿入のないiPS細胞の樹立法は臨床応用に欠かせない技術である。また、患者の負担を軽減するために、血液細胞から分離したリンパ球をiPS細胞の樹立に用いることは、将来の応用を見据え当然の流れである。エピソームベクターを用いたiPS細胞の樹立は、線維芽細胞ではすでにプロトコルが確立されているが、リンパ球では導入効率の低さが問題となり、未だ一般的ではない。今回の実験結果もそれを反映したもので、遺伝子導入方法の改善が必要であると考えられる。

エピソームベクターとともに外来遺伝子挿入のないiPS細胞の樹立法として、センダイウイルスを用いた方法は、最近、リンパ球からのiPS細胞の樹立に応用されている。今後はより効率的なベクターの導入法として、センダイウイルスを用いた方法を採用して、リンパ球からのiPS細胞の樹立を進める予定であ

る。

多種の成分を含まない培地とフィーダーの代わりに細胞外マトリクスを組み合わせたiPS細胞の培養は、用いる細胞外マトリクスに大きく影響を受けることが明らかとなった。マトリゲルはフィーダーの代わりとなり得るが、マウスEHS腫瘍から調製されたものでマウス成分を含むことから、臨床応用には使うことができない。したがって、現時点では組換えビトロネクチンがある程度実用的ではあるが、全てのiPS細胞株が組換えビトロネクチン上で生育可能ではないので、新たな細胞外マトリクスや培養液の改良が必要である。もう一つの方法としては、臨床応用を目的として、組換えビトロネクチン上でiPS細胞を樹立することも重要な対応策であろう。

E. 結論

現時点では、リンパ球からのiPS細胞の樹立法として、センダイウイルスを用いた方法が最有力候補であり、すでに我々はその実験を進めている。また今後は、フィーダーの代わりとなる細胞外マトリクスとして、組換えビトロネクチン以外の細胞外マトリクスの検討を行うとともに、組換えビトロネクチン上でiPS細胞を樹立する実験も検討する。

G. 研究発表

1. 論文発表

[1] D. Xu, H. Tahara, The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging, *Adv Drug Deliv Rev* (DOI information: 10.1016/j.addr.2012.07.010), (2012).

[2] X. Zhang, K. Horibata, M. Saijo, C. Ishigami, A. Ukai, S. Kanno, H. Tahara, E.G. Neilan, M. Honma, T. Nohmi, A. Yasui, K. Tanaka, Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair, *Nat Genet* 44 (2012) 593-597.

[3] M. Sato, K. Shin-ya, J.I. Lee, M. Ishihara, T. Nagai, N. Kaneshiro, G. Mitani, H. Tahara, J. Mochida, Human telomerase reverse transcriptase and glucose-regulated protein 78 increase the life span of articular chondrocytes and their repair potential, *BMC Musculoskelet Disor*