

201227009B(1/2)

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

自然免疫細胞リモデリングによる
ウイルス性肝炎の新規治療法の開発

平成 22 年度～平成 24 年度 総合研究報告書

(1/2 冊)

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 22 年度～24 年度 総合研究報告書

(1/2 冊)

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
--	---

資料（研究分担者による3年間の報告）

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・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	25
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	28
4. 肝疾患関連患者数の推計 田中 純子	32
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	38
6. 人工多機能幹細胞に関する研究 伊藤 敬	48
7. タイ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 瀧本 康史	50

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
--------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	69
------------------	----

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 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。本研究は、末梢血造血幹細胞や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する。研究内容は、末梢血成熟リンパ球、CD34⁺幹細胞、あるいは人工多機能幹(iPS)細胞から増殖性NK/NKT細胞を分化後にリモデリングして抗HCV活性を誘導することと、独自に開発したHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスに移入し抗HCV効果を解析することに大別される。

研究分担者

茶山 一彰 広島大学大学院 消化器・代謝内科 教授（平成22～23年度）
今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 助教（平成24年度）
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（平成24年度）

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

(担当 大段、田中友、茶山、今村)

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

2. 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、瀧本、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。

3. 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、田中友、田原)

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。

4. 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。

5. 臨床に類似したアニマルテストイ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。2010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ータリンを投与後、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、2011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。

6. 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、今村、田中友)

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。

7. 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、茶山、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、Nkp46とNKG2Dおよび抗腫瘍分子TRAILの発現が増強し、これを移植後3日目に点滴静注する。レシピエントのIL28B遺伝子多型とNK細胞移入後のHCV量との関連を解析した。

8. NK細胞の受容体と機能関連分子の解析 (担当 大段、田中友)

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NKG2 familyがあるが、それぞれの表出強度に依存して抗ウイルスを発揮する。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。これらの受容体を、肝移植施行患者において網羅的に解析した。

9. 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。

10. 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細胞の分化に必要な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。

11. 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)

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日間培養して、NK細胞に分化させた。

C. 研究結果

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

(担当 大段、田中友、茶山、今村)

末梢血CD56⁺細胞の増殖法を確立し、IL-2と抗CD3抗体の刺激によりIFN- γ 産生を誘導した。次に、u-PA Transgenic/SCIDマウスにヒトの肝細胞を移植し、HCV RNA

高値患者の血清を移入してHCV肝炎モデルを作製した。このアニマルモデルを用い、末梢血から増殖したCD56⁺細胞が有意な抗HCV効果を発揮することを確認し、免疫細胞療法として今後臨床応用し得る可能性が示唆された。

2. 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、瀧本)

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。

3. 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、田中友、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。

4. 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。

5. アニマルテストィ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。

6. 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、今村、田中友)

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。

7. 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、茶山、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ド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。

8. NK細胞の受容体と機能関連分子の解析

(担当 大段、田中友)

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。

9. 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。

10. 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。

11. 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 (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。

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。今後、広島大学において、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。

本研究では、iPS細胞からのCD56⁺NK細胞のリモデリング法を確立した。今後、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 polomerやNPC1L1拮抗薬 Ezetimibeなど有望な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

- ・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。
- ・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。
- ・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。
- ・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。

資料

(研究分担者による 3 年間の報告)

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、末梢 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 細胞を効率的に誘導し、抗C型ウイルス (HCV) 治療効果を目的とした自然免疫細胞免疫療法の開発に関する基礎研究と一部の臨床研究である。CD56⁺NK 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を検討し、誘導 NK 細胞のフェノタイプを解析した。また、HCV 含有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* で確認した。さらに HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルを用い、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。肝由来活性化 NK 細胞移入療法を肝移植後に臨床応用し、効果を解析した。

A. 研究目的

本邦における肝癌死亡数は現在年間 3 万人を超え、その殆どがウイルス性肝炎などの基礎疾患を有する。ウイルス性肝炎罹患率の高い当地域においてはことさら深刻で、広島大学の学際的・先端的な研究活動活性化の一環として「肝臓プロジェクト研究センター」が設置された所以である。我々は、肝移植後のアロ応答と抗C型ウイルス(HCV)応答とのクロストーク機構に関わる新知見に基づき、肝内在 natural killer (NK) /NKT 細胞を用いた養子免疫療法による HCV の根治療法の発想に至った。一般に、ウイルスが感染すると NK 細胞の非特異的応答によりウイルスは排除される。しかし、HCV 感染では HCV の E2 蛋白と NK 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(特開 2007-332103)。

本研究は、末梢血 CD56⁺細胞、末梢血造血幹

細胞や iPS 細胞から誘導したリモデリング NK 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が目的である。

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 細胞を本研究グループが独自に開発した 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。

B. 研究方法

骨髄 CD34⁺造血幹細胞由来 CD56⁺NK 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。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。

iPS細胞からのCD56⁺NK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。

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排液、および、末梢血中のNK細胞の表面マーカー

をフローサイトメトリーで解析し、肝予備能とNK細胞活性化/機能分子の關連について検討を行った。

C. 研究結果

骨髄CD34⁺造血幹細胞由来CD56⁺NK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)。

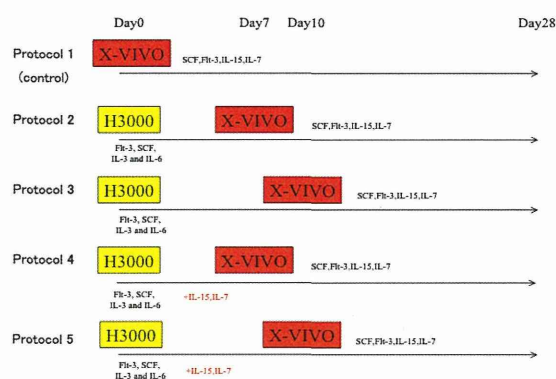


図1. 骨髄CD34⁺造血幹細胞からNK細胞を誘導するプロトコール

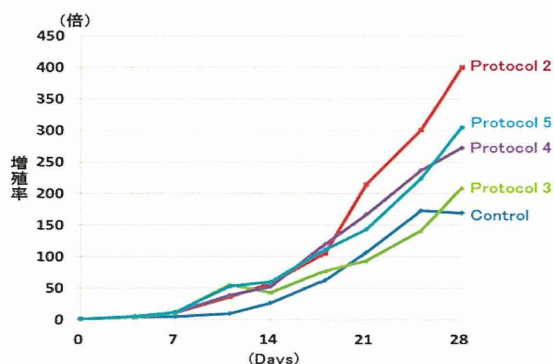


図2. 各プロトコールにおける細胞増殖効率

また、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Kp46およびTRAILが表出し、かつIFN- γ 産生能が亢進することを確認した。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3)。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4)。これらの結果は、CD34⁺幹細胞からのリモデリングによるNK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。

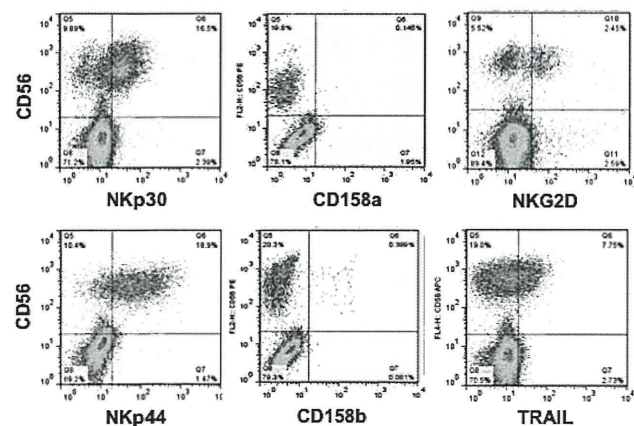


図3. リモデリング細胞の phenotype 解析 (Day28) Protocol 2

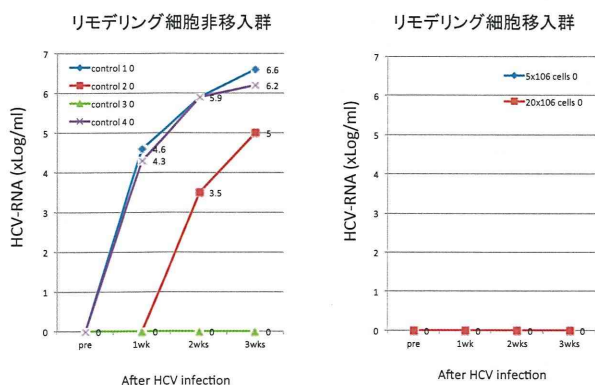


図4. HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* 検証

iPS細胞からのCD56⁺NK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5)。

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。

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。

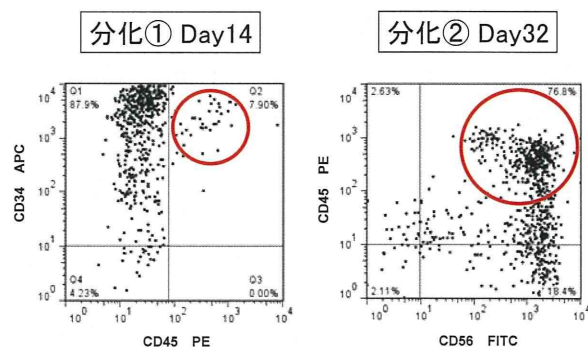
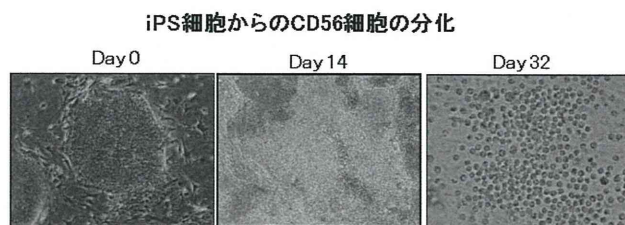


図5. iPS (Tic) 細胞から CD56⁺ NK 細胞への分化

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、NK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(FasL, 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、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比べ低下しており、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の強発現群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、強発現群では術後1週間目にHCVウイルス量は有意に抑制されていた。しかし、この差は術後経過とともに消失したことから、ドナー肝のNKp46の強発現は肝移植術後再感染早期のウイルスのreplicationの抑制に関連することを示唆した。

D. 考察

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、本研究を継続してきた。

臨床解析では、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、NK療法の実施によって、術後のHCV-RNA量の低下を示すことがわかったが、一方でその効果には個体差があることも判明した。NK細胞は、自己のHLAと結合するKIRの発現からの教育を受けたか否かによってLicensedタイプとUnlicensedタイプに分類し得る。これまでのリモデリングで得られたNK細胞はKIRの発現がなく、Unlicensedタイプに属する。今後は、HCV効果の増強にどちらのタイプが優位に働くかを確認し、リモデリング効率をあ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、グラフト肝内のNK細胞のNKp46の表出強度が移植後のHCV増幅と深く関わることを判明した。今後NKp46を介した抗HCV機構を解明したい。

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*および*in vivo*モデルで確認した。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。

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推移との関連を解明した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 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].
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Kobayashi T, Itamoto T, Tashiro H, Amano H, Oshita A, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Ohdan H. Tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2011; 29:Epub ahead of print.
 18. Doskali M, Tanaka Y, Ohira M, Ishiyama K, Tashiro H, Chayama K, Ohdan H. Possibility of adoptive immunotherapy with peripheral blood-derived CD3⁻ CD56⁺ and CD3⁺CD56⁺ cells for inducing antihepatocellular carcinoma and antihepatitis C virus activity. *J Immunother*. 2011; 34(2):129-38.
 19. Ushitora Y, Tashiro H, Takahashi S, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Chayama K, Ohdan H. Splenectomy in chronic hepatic disorders: portal vein thrombosis and improvement of liver function. *Dig Surg*. 2011;28(1):9-14.
 20. Basnet NB, Ide K, Tahara H, Tanaka Y, Ohdan H. Deficiency of N-glycolylneuraminic acid and Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc epitopes in xenogeneic cells attenuates cytotoxicity of human natural antibodies. *Xenotransplantation*. 2010;17(6):440-448.
 21. Kawaoka T, Hiraga N, Takahashi S, Takaki S, Mitsui F, Tsuge M, Nagaoki Y, Kimura Y, Hashimoto Y, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Tashiro H, Ohdan H, Chayama K. Prolongation of interferon therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation: analysis of predictive factors of sustained virological response, including amino acid sequence of the core and NS5A regions of hepatitis C virus. *Scand J Gastroenterol*. 2010;45(12):1488-96.
 22. Tahara H, Ide K, Basnet N, Tanaka Y, Ohdan H. Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. *Xenotransplantation*. 2010;17(3):188-96.
 23. Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ohdan H. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid

- hydroxylase-deficient mice. *J Immunol.* 2010;184(6):3269-75.
24. Yoshida M, Ikeda S, Sumitani D, Takakura Y, Yoshimitsu M, Shimomura M, Noma M, Tokunaga M, Okajima M, Ohdan H. Alterations in portal vein blood pH, hepatic functions, and hepatic histology in a porcine carbon dioxide pneumoperitoneum model. *Surg Endosc.* 2010;24(7):1693-700.
 25. 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
 26. 田中友加, 大段秀樹. 【B型肝炎・肝移植後の再発予防法の現状】 高力価HBs抗体含有免疫グロブリン大量投与のアロ免疫応答に対する影響. 今日の新移植. 2011;24(1):103-107.
 27. 大段秀樹. 【肝胆膵薬物治療学の進歩 この30年】 肝臓分野 肝移植 肝移植の免疫抑制療法におけるセルセプトの役割. 肝・胆・膵. 2010;6:1182-1187.
 28. 大段秀樹, 井手健太郎, 伊禮俊充, 田澤宏文, 田中友加, 五十嵐友香. 臓器移植におけるB細胞性免疫応答とその制御法 抗HLA抗体関連拒絶反応の克服. 今日の新移植. 2010;23(6):783-788.
 29. 大段秀樹. ネオオーラル10年の歩み 解明されたシクロスポリンの新規作用 B-1細胞への分化抑制作用. 今日の新移植. 2010;23(6):722-728.
 30. 大段秀樹. 【抗体関連型拒絶反応の病理と臨床】 B細胞lineageと抗体性拒絶反応の制御. 移植. 2010;5:434-440.
 31. 尾上隆司, 大段秀樹. T細胞の経口トレンス誘導と肝類洞内皮細胞. 臨床免疫・アレルギー科. 2010;54(5):604-612.
 32. 大段秀樹. 肝臓外科と肝内在免疫制御細胞. *Minophagen Medical Review.* 2010;3:193-205.
 33. 野間翠, 片岡健, 佐々田達成, 梶谷桂子, 尾崎慎治, 高橋護, 春田るみ, 有広光司, 大段秀樹. 肝移植後9年を経て発症した乳癌の1例. 乳癌の臨床. 2010;25(4):479-483.
 34. 田代裕尊, 田妻進, 佐々木民人, 茶山一彰, 浅原利正, 大段秀樹. 【原発性硬化性胆管炎の最近の話題】 原発性硬化性胆管炎に対する肝移植の適応と問題点. 胆と膵. 2010;8:771-774.
 35. 井手健太郎, 大段秀樹. 【術前・術後に要注意 併存疾患の手術リスクと対策】 特殊薬剤服用中の手術 副腎皮質ホルモン剤 ステロイド投与患者における周術期管理. 外科. 2010;72(9):955-958.
 36. 大段秀樹. 【Liver Transplant Frontier】 肝移植における免疫モニタリング. 今日の新移植. 2010;23(3):63-369.
 37. 田代裕尊, 石山宏平, 大平真裕, 天野尋暢, 井手健太郎, 大下彰彦, 小林剛, 尾上隆司, 伊禮俊充, 田原裕之, 番匠谷将孝, 田沢宏文, 浅原利正, 大段秀樹. 生体肝移植における術後感染症とドナー肝由来活性化natural killer細胞療法による感染予防対策. 日本外科感染症学会雑誌. 2010;7(2):89-94.
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. 神戸. 2012
 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. 愛知. 2012
 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. 愛知. 2012
 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. 富山. 2012
 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. Boston, America. 2012
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. Boston, America. 2012
 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. Boston, America. 2012
 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 細胞療法の有効性. 第112回日本外科学会定期学術集会. 千葉. 2012
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
20. 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
21. 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
22. 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ーミラノ基準を逸脱した症例の検討ー. 第66回日本消化器外科学会総会. 名古屋, 2011
23. 大段秀樹, 講演肝癌/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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. 大段秀樹. 肝移植後の肝癌/肝炎再発に対する免疫細胞療法. 第47回日本肝癌研究会. 静岡, 2011
29. 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
30. 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
31. Ohdan H. Tolerance monitoring in liver transplantation. CAST 2011 アジア移植学会. 韓国, ソウル, 2011
32. 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
33. 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
34. 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
35. 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ー活性化NK細胞療法の臨床経過報告ー. 第47回日本移植学会総会. 仙台, 2011