36. 田中友加，荒木慧，大段秀樹．アロ応答T細胞のサイトイカイン産生能とSTATシグナル解析による分子標的免疫モニタリング法の開発．第47回日本移植学会総会．仙台, 2011
37. 田代裕尊，茶山一彰，大段秀樹．ドナー由来活性化リンパ球細胞療法による生体肝移植後の敗血症予防．第15回日本肝臓学会大会．福岡, 2011
38. Ohdan H. Adoptive immunotherapy for inducing anti-HCC and anti-HCV activity after liver transplantation.21st World congress of the international association of surgeons, gastroenterologists and oncologists. 東京, 2011
39. Ohdan H. Role of macrophage in transplantation.The 2011 fall conference of the Korean association of immunologists. Korea, Seoul, 2011
40. Ohdan H, Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Chayama K, Asahara T. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived NK/NKT cells promotes host innate immunity and has anti-HCC, anti-HCV, and anti-infectious effects after liver transplantation. American Transplant Congress. 2010
41. Doskali M, Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. Possibility of adoptive immunotherapy with CD56+ propagated cells for inducing anti HCV activity.第28回日本肝移植研究会 広島．2010
42. 田中友加，大平真裕，石山宏平，Marlen Doskali，田代裕尊，大段秀樹．ドナー肝由来活性化NK/NKT細胞を用いた肝癌肝移植後の養子免疫細胞療法．第20回日本サイトメトリー学会学術集会．2010
43. 堀田龍一，Doskali Marlen，田中友加，五十嵐友香，橋本慎二，平田文宏，寺岡義布史，山下正博，田澤宏文，番匠谷将孝，Basnet Nabin，井手健太郎，尾上隆司，田代裕尊，大段秀樹．IL-2/OKT3刺激により活性化された末梢血由来CD56+細胞のHCV増殖抑制効果と抗腫瘍効果．第46回日本移植学会総会．2010

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（総合）研究報告書（平成22-24年度）

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：C型慢性患者では，生体肝移植後，移植肝へのC型肝炎ウイルス(HCV)の再感染が生じる．このため，C型慢性肝疾患に対する生体肝移植の予後は，他疾患に対するものよりやや不良である．生体肝移植術後のHCV再感染に対し，PEG-IFN/リバビリン(RBV)併用療法によるウイルス排除が試みられているが，難治性の症例も多く存在する．当院での生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV療法の成績とIL28B遺伝子多型(rs8099917)の関連の検討の結果，ドナーおよびレシピエントのいずれのIL28B遺伝子多型も治療効果に関与しており，IL28B TG/GGはTTに比べ難治性であった．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 TTの症例はTG/GGの症例に比べ，肝内ISGsの発現が低く，IFN投与後に強く誘導されるため治療効果が高いことを見出し，難治性のIL28B遺伝子型を有する症例には，何らかのISGs誘導を増強するあるいはISGsの関与しない治療法の開発が望ましいと思われた．ヒト肝細胞キメラマウスを用いて種々の薬剤の抗HCV効果およびHCV感染阻害効果を検討したところ，コレステロールトランスポーター阻害剤であるエゼチミブがHCV感染阻害効果を有することを見出され，今後，臨床応用が期待される．

A. 研究目的

われわれは，遺伝子1型あるいは2型のC型慢性肝炎患者においてIL28B遺伝子(rs8099917)の多型が，PEG-インターフェロン(IFN)/リバビリン併用療法(PR)の治療効果に関与していることを報告した．本研究では，C型肝炎患者に対する生体肝移植後のHCV再感染に対するIFN治療効果の関連を明らかにする．さらにヒト肝細胞キメラマウスを用いてIL28B遺伝子多型がどのようにIFN治療効果に影響を及ぼしているのか，あるいは薬剤によるHCV感染予防効果を検討した．

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．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．何故IL28B TTの患者ではIFN治療効果が高いのかを検討した．IFN治療前の肝生検サンプルを用いて肝臓内ISGs発現量を検討したところ，IL28B TTの症例は，TG/GGの症例に比べ，PKR，MxA，OASなどのISGsの発現は低値であった．IFN投与後の肝臓内ISGs発現量の検討はヒト肝細胞キメラマウスを用いて行った．IL28B TTあるいはTGのヒト肝細胞を移植したマウスにHCVを感染後，IFN-α1500 IU/gを投与し，6時間後に肝臓内ISGs（PKR，MxA，OAS）発現量を測定した．肝臓内ISGs発現量はいずれもIL28B TTのヒト肝細胞を移植したマウスにおいて高値であった．

ヒト肝細胞キメラマウスにHCV感染前，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-IFNRBV 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．IL28B TT の症例において治療効果が高い要因の一つとして，TT の症例は，TG/GG の症例に比べ，肝内 ISGs の発現が低く，IFN 投与後により，その発現がより強く誘導されていること示唆された．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 遺伝子多型は肝臓内 ISGs 発現と関連して IFN 治療効果と関与している可能性がある．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があり，今後の臨床応用が期待される．

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

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

4) Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N,

Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. Hepatology 54(3); 764-71, 2011

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

2) Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H, Tashiro H, Ohdan H and Chayama K. IL28B polymorphism has a possibility as a guide to pegylated interferon plus ribavirin therapy even after curative treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

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

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

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

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）
（分担）研究報告書（平成22-24年度）

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、増殖能力を保持した NK 細胞を分化誘導することができる iPS 細胞を樹立するため、予めテロメラーゼ遺伝子を導入した線維芽細胞を用いて iPS 細胞の誘導を行い、樹立した複数のクローンの性状を調べた。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

末梢血リンパ球からNK細胞を大量に得るためには、サイトカインを用いた選択的な培養条件と大量の血液の確保が必要である。NK細胞の増幅にはIL-2によるCD56陽性細胞の選択的な誘導方法が知られており、およそ一月でCD56陽性細胞を数十倍に増幅可能であるが、一月以降は増殖能を失い、増幅効率と得られるNK細胞の質ともに十分ではない。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が、得られたNK細胞は量・質ともに改善の余地がある。そこで、より増殖能力を保持したNK細胞を分化誘導できるiPS細胞を樹立するために、予めテロメラーゼ遺伝子を発現する線維芽細胞を用いてiPS細胞を誘導し、分化誘導後もテロメラーゼが働いてテロメアが短縮しないiPS細胞の樹立を試みた。

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

正常線維芽細胞TIG-3にレンチウイルスでテロメラーゼ遺伝子hTERTを導入した。Puromycin含有培地を用いてウイルスが感染した細胞を選択した。多能性遺伝子Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycをそれぞれ発現するレトロ

ウイルスをテロメラーゼ発現TIG-3細胞に感染させ、フィーダー細胞上ES培地でおよそ1ヶ月間培養した。出現したiPS細胞コロニーをピックアップして2ヶ月以上継代を繰り返し、hTERT-iPS細胞を樹立した。

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）

iPS細胞の樹立に用いた正常線維芽細胞TIG-3、及び本研究に用いた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る。したがって、倫理面において考慮すべき問題はない。

C. 研究結果

テロメラーゼ発現TIG-3細胞から得られたiPS細胞コロニーは、親株であるTIG-3細胞から得られたiPS細胞のコロニーと同様に細胞のサイズが小さく、核の比率が大きい、そして扁平な単層のコロニーを形成した。内在性の多能性遺伝子の発現を調べた結果、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-mycに加えてNanogの発現が認められた。さらにES細胞マーカーであるNanogとともに、SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81の発現を免疫蛍光法にて確認した。さらに適切な培養条件下で胚葉体の形成が可能であり、胚葉体形成を介した分化誘導では、外胚葉、中胚葉、内胚葉由来の形態を呈する細胞の出現が認められた。

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。レトロウイスルを用いた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、エピソーマル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

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

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

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。エピソーマルベクターを用いた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。

エピソーマル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

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

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 Disord 13 (2012) 51.

[4] Y. Kudo, S. Iizuka, M. Yoshida, T. Tsunematsu, T. Kondo, A. Subarnbhesaj, E.M. Deraz, S.B. Siriwardena, H. Tahara, N. Ishimaru, I. Ogawa, T. Takata, Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13) Directly and Indirectly Promotes

Tumor Angiogenesis, ***J Biol Chem*** 287 (2012) 38716-38728.

[5] Y. Matsumoto, T. Miyamoto, H. Sakamoto, H. Izumi, Y. Nakazawa, T. Ogi, H. Tahara, S. Oku, A. Hiramoto, T. Shiiki, Y. Fujisawa, H. Ohashi, Y. Sakemi, S. Matsuura, Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly, ***DNA repair***, 10 (2011) 314-321.

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

[7] D. Xu, F. Takeshita, Y. Hino, S. Fukunaga, Y. Kudo, A. Tamaki, J. Matsunaga, R.U. Takahashi, T. Takata, A. Shimamoto, T. Ochiya, H. Tahara, miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence, ***J Cell Biol.***193 (2011) 409-424.

2. 学会発表

発表者名：嶋本　顕、田原栄俊
題名：Generation of induced pluripotent stem cells from Werner syndrome patients
学会名：第19回日本血管生物医学会／第1回 Asia-Pacific Vascular Biology Meeting
発表年月日：2011年12月10日
会場　：東京ステーションコンファレンス

発表者名：嶋本　顕、田原栄俊
題名：Generation of induced pluripotent stem cells from Werner syndrome patients
学会名：10th Annual Meeting ISSCR
発表年月日：2012年6月15日
会場　：パシフィコ横浜

発表者名：嶋本　顕、田原栄俊
題名：ウェルナー症候群から学ぶ老化機構
学会名：第54回日本老年医学会学術集会
発表年月日：2012年6月28日
会場　：東京フォーラム

発表者名：嶋本　顕、田原栄俊
題名：リプログラミングはウェルナー症候群患者由来細胞の早期老化を抑制する
学会名：第35回日本分子生物学会年会
発表年月日：2012年12月11日
会場　：福岡国際会議場

H.　知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

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）
（分担）研究報告書（平成22-24年度）

肝疾患関連患者数の推計

研究分担者　田中 純子
広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 疫学・疾病制御学

研究要旨

本研究班では肝疾患関連患者のうち「無症候性キャリア」、「肝移植後患者」の患者数推計を行った。

1．無症候性キャリア数の推計

我が国に未だに感染を知らないまま潜在している肝炎ウイルスキャリアがどのくらいであるかに関して、一般集団における肝炎ウイルスキャリア率を元に推計を試みた。まず、2001年から2006年までに得られた日本赤十字血液センターの初回供血者3,748,422人のデータから推定するとC型肝炎ウイルス(HCV)キャリア率は0.25%、B型肝炎ウイルス(HBV)キャリア率は0.31%となった。また、大規模集団として、2002年から2006年の5カ年計画で実施された老人保健法による住民健診受診者を対象とした「肝炎ウイルス検診」の結果では、HCVについては、8,634,509人が検査を受け、99,950人のHCVキャリアが見出されている（HCVキャリア率：1.2%)。また、HBVについては、8,704,587人が検査を受け、このうち100,983人のHBVキャリアが見出されている（HBVキャリア率：1.2%)。

これら2つの大規模集団における肝炎ウイルスキャリア率から、未だに感染を知らないまま社会に潜在していると考えられるHCVキャリア数とHBVキャリア数を推計すると、HCVでは807,903人（95%CI：68.0-97.4万人,2005年時点)、HBVでは903,145人（95%CI:83.7-97.0万人，2005年時点）となった。

この数値は2000年時点に同様の方法で推計したキャリア数より減少しており、肝炎ウイルス検査の推進や治療の普及などの施策により、社会に感染を知らないまま潜在するキャリア数が減少したと考えられた。

これまでの疫学調査により得られた知見すなわち、我が国における肝炎ウイルスの水平感染は、ハイリスク行為を除くと発生は低いこと、母子感染はHBV母子感染予防対策によるselective vaccinationによりキャリア化阻止がなされていること、HCVの母子感染はほとんど認められないこと等、から考えると、我が国の肝炎対策としては現在肝炎ウイルスに感染している人への対策が重要であるといえる。

肝炎ウイルスに感染して人を社会における存在状態別に分類し、1）未だに感染を知らないまま潜在している肝炎ウイルスキャリアに対する対策、2）患者としてすでに通院・入院しているキャリアへの対策、3）感染を知ったが継続的な受診をしないままでいるキャリアに対する対策、とそれぞれのキャリアについての対策をひきつづき行っていくことが必要といえる。

2．肝移植後患者数の推計の試み

重度肝機能障害者による身体障害者手帳の交付対象者は「3ヶ月以上Child-Pugh分類グレードC」または「肝移植を受け、抗免疫療法を実施」のいずれかに該当することである。本研究班ではこのうち、「肝移植を受け、抗免疫療法を実施」に該当する肝移植後患者数の2020年までの推計を行った。解析には肝移植症例登録報告（日本肝移植研究会 2010）に掲載された肝移植後患者数および肝移植後生存率を用いた。その結果2010年時点における期待生存者数は4,322~4,728人、2020年時点における期待生存者数は7,670~7,797人であり、今後10年間で 8,000 人を超えない結果となった。なお、本推計値には脳死肝移植患者や海外移植実施分を含んでおらず、また今後10年間で年間肝移植件数や肝移植後生存率が変化しないという仮定の下で行った。

協力研究者　秋田智之（同　疫学・疾病制御学）

A. 研究目的

本研究班では肝疾患関連患者のうち「無症候性キャリア」、「肝移植後患者」の患者数推計を行った。

1．無症候性キャリア数の推計

我が国における肝癌死亡は3.4万人（2008年時点）であり、肝細胞癌死亡の約8割はHCVあるいは HBVに起因している。肝癌死亡を減少させるには肝炎ウイルスキャリアに対する対策が必要であり、我が国に未だに感染を知らないまま潜在している肝炎ウイルスキャリアがどのくらいであるかを明らかにすることを目的として、一般集団における肝炎ウイルスキャリア率を元に推計を試みた。

2．肝移植後患者数の推計の試み

重度肝機能障害者による身体障害者手帳の交付対象者は「3ヶ月以上Child-Pugh分類グレードC」または「肝移植を受け、抗免疫療法を実施」のいずれかに該当することである。本研究班では、重度肝機能障害者認定を受ける可能性のある患者のうち「肝移植を受け、抗免疫療法を実施」している患者数の推計を行った。

B. 研究方法

1．無症候性キャリア数の推計

2001年1月から2006年12月までの６年間に得られた日本赤十字血液センターの初回供血者3,748,422人のデータから得られるHCVキャリア率及びHBVキャリア率を各地域別に算出し、当該地域の人口を用いて、各地域別にキャリア数を推計した。
また、2002年から2006年の5カ年計画で実施された老人保健法による住民健診受診者を対象とした「肝炎ウイルス検診」では、HCV検査受診者8,634,509人、HBV受診者8,704,587人のデータから各地域別の肝炎ウイルスキャリア率を算出し、各地域別の人口と併せてキャリア数を算出した。
初回供血者集団は40歳未満が多いこと、「肝炎ウイルス検診」は40歳から74歳が対象であることから、キャリア数の推計には40歳未満については初回供血者集団のデータを用い、40歳から74歳については「肝炎ウイルス検診」から得られたデータを用いてキャリア数の推計を行った。

2．肝移植後患者数の推計の試み

重度肝機能障害者のうち肝移植後患者数の推計を下記の方法で行った。なお、本解析には脳死肝移植患者や海外移植実施分は含めていない。

（１）肝移植後生存率の推定（男女別、年齢区分別）

肝移植症例登録報告（日本肝移植研究会、2010）に掲載された男女別、年齢区分（18歳未満、18歳以上）別にみたレシピエントの累積生存率（6時点：移植後1,3,5,10,15,20年時点）から、近似曲線をあてはめて肝移植後年数ごとの生存率を推定した（最小二乗法）。

（２）肝移植後患者の期待生存者数の推計（男女別、年齢区分別）

１）現時点までの肝移植後患者数

現時点までの肝移植後患者数は肝移植症例登録報告に掲載された2010年末までの累積生体肝移植後患者数を用いた。なお、すべての患者は肝移植後平均3年または7年経過していると仮定した。以下、肝移植後平均3年経過したと仮定した場合を【術後3年モデル】、平均7年経過した場合を【術後7年モデル】とおいた。

２）新規の肝移植後患者数

新規の肝移植後患者数として、毎年2010年肝移植件数と同数の肝移植患者が発生すると仮定した。

３）肝移植後患者の期待生存者数の推計

現時点までの解移植後患者（１）および新規の肝移植後患者（２）の生命予後はそれぞれ１．で推定した推計生存率に従うものと仮定した。

（倫理面への配慮）

本研究はすでに集計･公表されたデータだけを解析に用いているため、「疫学研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」に抵触するものではない。

C. 研究結果

1．無症候性キャリア数の推計

2001年1月から2006年12月までの６年間に得られた日本赤十字血液センターの初回供血者3,748,422人のデータからHCVキャリア率は0.25%であり、HBVキャリア率は0.31%となった。

また、2002年から2006年の5カ年計画で実施された老人保健法による住民健診受診者を対象とした「肝炎ウイルス検診」の肝炎ウイルスキャリア率をみると、HCVについては、8,634,509人が検査を受け、99,950人のHCVキャリアが見出され(HCVキャリア率:1.2%）、HBVについては、8,704,587人が検査を受け、このうち100,983人のHBVキャリア（HBVキャリア率：1.2%）が見出された。

40歳未満については初回供血者集団のデータから得られたキャリア率を用い、40歳から74歳については「肝炎ウイルス検診」から得られたキャリア率を用いて、我が国におけるHCVキャリア数とHBVキャリア数を推計すると、HCVキャリアの推計数は807,903人(95%CI:68.0-97.4万人,2005年時点)、HBVキャリアの推計数は903,145人（95%CI:83.7-97.0万人,2005年時点）となった。

２．肝移植後患者数の推計の試み

（１）肝移植後生存率の推定（男女別、年齢区分別）

図1の上に男女別、下に年齢区分別にみた肝移植後の累積生存率（点）と推定生存率（生存曲線）を示した。この推定生存率をもとに、患者数推計を行った。

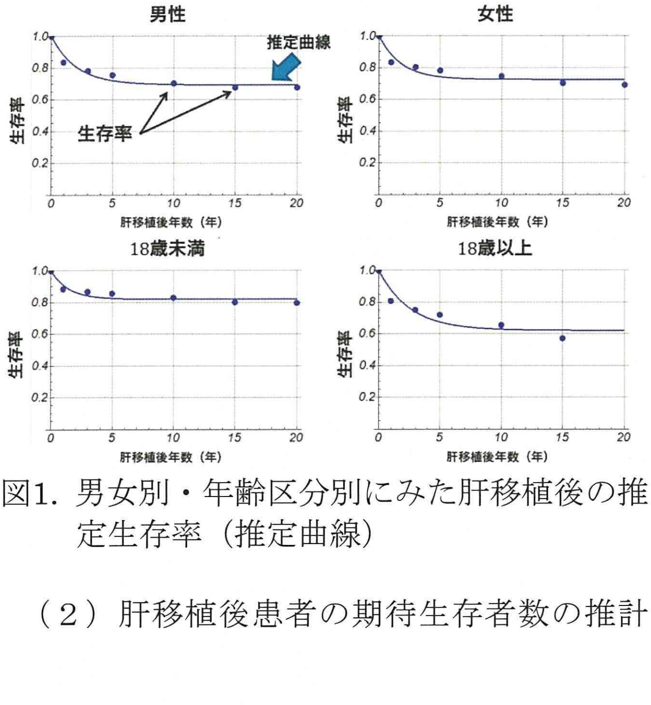

図1．男女別・年齢区分別にみた肝移植後の推定生存率（推定曲線）

（２）肝移植後患者の期待生存者数の推計（男女別、年齢区分別）

１）現時点までの肝移植後患者数

現時点（2010年末）までの肝移植後患者数は6,097人であった。これには死亡した症例も含まれている。男女別にみると男性2,923人、女性3,174人、年齢区分別にみると18歳未満2,224人、18歳以上3,873人であった。

２）新規の肝移植後患者数

新規患者数は444例であった。男女別にみると男性192例、女性252例、年齢区分別にみると18歳未満149例、18歳以上295例であった。

３）肝移植後患者の期待生存者数の推計

2010年から2020年の、肝移植後期待生存者数の推移を図2に示した。2010年の期待生存者数は、【術後3年モデル】で4,698~4,728人、【術後7年モデル】で4,322~4,372人であった。2020年の期待生存者数はどちらのモデルでもほぼ同様で7,670~7,797人であった。

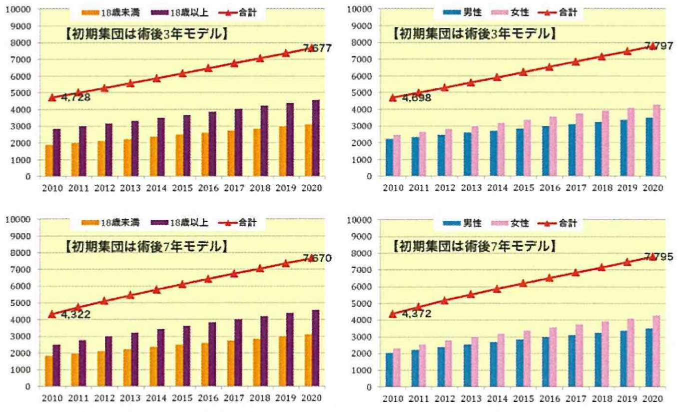

図2．男女別・年齢区分別に算出した期待生存者数の推移（上が【術後3年モデル】、下が【術後7年モデル】）

D. 考察 ＆ E. 結論

１．無症候性キャリア数の推計

2つの大規模集団における肝炎ウイルスキャリア率から、未だに感染を知らないまま社会に潜在していると考えられる肝炎ウイルスキャリア数を推計すると、HCVキャリア数は807,903人（95%CI: 68.0-97.4万人,2005年時点）、HBVキャリア数は903,145人（95%CI:83.7-97.0万人, 2005年時点）となり、2000年時点に同様の方法で推計したキャリア数より減少しており、肝炎ウイルス

検査の推進や治療の普及などの施策により、社会に感染を知らないまま潜在するキャリア数が減少したと考えられた。

これまでの疫学調査により得られた知見すなわち、我が国における肝炎ウイルスの水平感染は、ハイリスク行為を除くと発生は低いこと、母子感染はHBV母子感染予防対策によるselective vaccinationによりキャリア化阻止がなされていること、HCVの母子感染はほとんど認められないこと等、から考えると、我が国の肝炎対策としては現在肝炎ウイルスに感染している人への対策が重要であるといえる。

肝炎ウイルスに感染して人を社会における存在状態別に分類し、1) 未だに感染を知らないまま潜在している肝炎ウイルスキャリアに対する対策、2) 患者としてすでに通院・入院しているキャリアへの対策、3) 感染を知ったが継続的な受診をしないままでいるキャリアに対する対策、とそれぞれのキャリアについての対策をひきつづき行っていくことが必要といえる。

2．肝移植後患者数の推計の試み

今回の推定では、2020年において生存している肝移植後患者の期待生存者数は7,600~7,800人であった。前回行った、2006年のデータを用いた推計値も8,000人を超えておらず、ほぼ同様の結果になった。今後、肝移植数が急増したり、肝移植後生存率が著しく改善したりしない限り、推計値は大きく変化しないものと考えられる。

G. 研究発表

1．論文発表

1) Kumada T, Toyoda H, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Tanaka J Characteristics of elderly hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma patients Journal of Gastroenterology and Hepatology 2013;28(2):357-364.

2) Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Niinomi T, Yasuda S, Ando Y, Yamamoto K, Tanaka J Effect of nucleos(t)ide analogue therapy on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B patients: a propensity score analysis Journal of Hepatology 2013;58(3):427-433.

3) 片山惠子、田中純子 肝炎・肝癌の疫学 Annual Review 消化器 2013;88-93.

4) 仁科惣治、栗原淳子、則安俊昭、糸島達也、山本和秀、田中純子、日野啓輔 岡山県における肝炎ウイルス検診陽性者の医療機関受診等に関する追跡調査 肝臓 2013;54(1):84-86.

5) 田中純子 C型肝炎はどのように日本で蔓延し肝癌をもたらしたのか -肝癌抑制の実地診療のすすめかた- Medical Practice 2013;30(2):194-202.

6) Matsuo J, Mizui M, Okita H, Katayama K, Aimitsu S, Sakata T, Obayashi M, Nakanishi T, Chayama K, Miyakawa Y, Yoshizawa H, Tanaka J, (Hiroshima Hepatitis Study Group) Follow up of the 987 blood donors found with hepatitis C virus infection over 9-18 years Hepatology Research 2012;42(7):637-647.

7) Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Taguchi Y-h Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease PLoS ONE 2012;7(10):e48366.

8) 片山惠子、松尾順子、秋田智之、田渕文子、酒井明人、田中純子 肝炎ウイルス検査の受診状況等に関する聞き取り調査報告 肝臓 2012;53(11):707-720.

9) 田中純子 わが国におけるＢ型肝炎・Ｃ型肝炎ウイルスキャリアの現状 化学療法の領域 2012;28(1):18-27.

10) 田中純子 B型肝炎に関する疫学調査の最新情報 医学のあゆみ 2012;242(5):373-380.

11) 田中純子 わが国におけるC型肝炎の疫学 臨牀消化器内科 2012;27(11):1413-1422.

12) 田中純子、三浦宜彦 わが国における肝癌の疫学 肝胆膵 2012;65(6):985-992.

13) 田中純子. 肝癌の疫学と対策. 内科　特集 肝癌診療の最前線−知っておきたい診断・治療の新情報−. 2012;386-392.

14) 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. 2011; 54(4):185-95.

14) Tomoguri T, Katayama K, Tanaka J, Yugi H , Mizui M, Miyakawa Y, Yoshizawa H. Interferon alone or combined with ribavirin for acute prolonged infection with

hepatitis C virus in chimpanzees. Intervirology. 2011; 54(4):229-32.
15) Kumada T, Toyoda H, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamoti A, Tada T, Tanaka J, Yoshizawa H. Predictive value of tumor markers for hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus. Gastroenterol. 2011; 46:536-44.
16) Sugiya N, Nakashima, Takasugi N, Kawai A, Kiribayashi K, Tanaka J, Endogenous may prevent bone loss in postmenopausal hemodialysis patients. Osteoporos Int. 2011; 22:1573-79.
17) 田中純子. 肝炎ウイルスの感染予防について. ガイドライン/ガイダンス 慢性肝炎. 2011;14-19.
18) 田中純子、片山惠子. Ⅱ.C型肝炎 我が国におけるC型肝炎の疫学-国際比較を含めて-. 新時代のウイルス性肝炎学. 2011;15-22.
19) 田中純子、松尾順子. Ⅲ.B型肝炎 我が国におけるB型肝炎の疫学-国際比較を含めて-. 新時代のウイルス性肝炎学. 2011;327-334.
20) 松尾順子、田中純子. C型肝炎ウイルスキャリアの慢性肝炎発症率. 日本医事新報. 2011;50-51.
21) 田中純子、片山惠子. B型肝炎 C型肝炎の疫学. Medical Practice. 2011;1347- 1353.

2. 学会発表

1) Tanaka J Hepatitis C in Japan The 10th JSH single topic conference (東京) 2012.
2) Tanaka J Epidemiological studies from Japan Viral hepatitis policy forum and workshop -North Asia-(CEVHAP) (台湾 (台北)) 2012.
3) 田中純子、小山富子、池田健次 肝炎ウイルス持続感染者の病態推移に関する数理疫学的研究 第16回日本肝臓学会大会 (神戸) 2012.
4) Akita T, Ohisa M, Tanaka J Etiological-based mathematical model for hepatocellular carcinoma mortality XXVIth International Biometric Conference (2012 IBC) (兵庫) 2012.
5) 田中純子 ウイルス肝炎・肝がんの疫学 第22回肝臓週間 肝炎ウイルスの克服と肝がん予防 (岐阜) 2012.
6) 田中純子 疫学的視点からみたウイルス肝炎の現状 第17回日本医療政策機構朝食会 (東京) 2012.
7) 田中純子 topics on hepatitis C and hepatitis B from an epidemiological viewpoint ACCJ(American Chamber of Commerce in Japan) Luncheon speech (東京) 2012.
8) 田中純子 肝がんになりやすいグループを認識する 日本肝臓学会 肝がん撲滅週間 市民公開講座 (三島) 2012.
9) 田中純子 我が国における肝炎ウイルス感染者数の推計について-社会における存在状態4分類別にみた検討- 第48回日本肝臓学会総会 (金沢) 2012.
10) 田中純子 疫学的視点からみたB型肝炎の課題 第48回日本肝臓学会総会 モーニングセミナー2 (金沢) 2012.
11) 松尾順子、片山惠子、 中島歩、 田中純子、広島透析患者肝炎study group 透析患者における肝炎ウイルス感染状況の推移と予後についての解析の試み 第48回日本肝臓学会総会 (金沢) 2012.
12) Sato T, Akita T, Tanaka J. Evaluation of strategies for pandemic influenza(H1N1) control and prevention in Japan based on a total number survey in a closed area simulated by mathematical models. IEA World Congress Of Epidemiology, 7th- 11th August 2011. Edinburgh. 2011
13) Tanaka J. Infectivity of HBV. IPFA/PEI International Workshop on "Surveillance and Screening of Blood Borne Pathogens". Dublin. 2011
14) Matsuo J, Okita H, Mizui M, Katayama K, Tabuchi A, Akita T, Nakashima A, Tanaka J, Hiroshima Hepatitis Study Group. Progress of liver disease in hepatitis C virus carriers found at the blood donation and its outcomes : 18- year cohort study on 1021 carriers. 46th Annual Meeting of the European association for the study of the Liver. Berlin. 2011
15) Fujimoto M, Matsuo J, Tabuchi A, Katayama K, Nakashima A, Akita T, S.H.Do. Tanaka J. Study on hepatitis viral infection among general population in Cambodia. Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2011. Bangkok. 2011
16) 田中純子. 感染を知らないまま潜在している肝炎ウイルスキャリアの推計について. 第39回日本肝臓学会西部会. 岡山. 2011
17) 片山惠子、松尾順子、秋田智之、田中純子. 肝炎ウイルス持続感染と血液透析患者の予後についての解析の試み. 第39回日本肝臓学会西部会. 岡山. 2011
18) Son D.H., Svay S, Fujimoto M, Goto N, Tabuchi A, Matsuo J, Katayama K, Tanaka J.

The sero-epidemiological pilot study on the prevalence of hepatitis viral infection among school students in Cambodia. 第9回日本予防医学会学術総会. 東京. 2011

19) 藤本真弓、松尾順子、郷裕子、片山惠子、藤井紀子、Do Huy Son、SVAY SOMANA、田中純子. カンボジア王国における肝炎ウイルス感染状況把握のための血清疫学調査研究-チュレイ村住民に対する調査結果-. 第9回日本予防医学会学術総会. 東京. 2011

20) 佐藤友紀、桑原正雄、堀江正憲、岸本益実、松岡俊彦、中本稔、佐々木昌弘、田中純子. H1N1pdm(2009)の大規模調査成績に基づくワクチン接種への意識・講堂に関する検討. 第9回日本予防医学会学術総会. 東京. 2011

21) 松尾順子、片山惠子、秋田智之、田中純子. 肝炎ウイルス検査に関する聞き取り調査及び肝炎ウイルス検査後の動向調査の成績. 第15回日本肝臓学会大会. 福岡. 2011

22) 片山惠子、松尾順子、秋田智之、田中純子. In-vivoにおけるHBs抗体の感染阻止能定量の試み-ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた受動免疫後のHBVgenotypeAの感染実験. 第15回日本肝臓学会大会. 福岡. 2011

23) 秋田智之、佐藤友紀、田中純子. 隔離された小地域における新型インフルエンザH1N1pdm流行動態の感染症モデルを用いた解析. 2011年度統計関連学会連合大会. 福岡. 2011

24) 田中純子. ウイルス肝炎の疫学. 第28回日本医学会総会　2011東京. web上開催. 2011

25) 佐藤友紀、秋田智之、田中純子. 甲奴町におけるpdmH1N1インフルエンザ流行動態に関する数理モデルを用いた検討. 第21回　日本疫学会学術総会. 札幌. 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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）
（分担）研究報告書（平成22-24年度）

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

研究分担者　立野知世　株式会社フェニックスバイオ
研究協力者　山﨑ちひろ　株式会社フェニックスバイオ
柳愛美　株式会社フェニックスバイオ
吉実康美　株式会社フェニックスバイオ
石田雄二　株式会社フェニックスバイオ
Eddie Wisse　Maastricht University

研究要旨　我々は、これまで、マウス肝臓の70%以上がヒト肝細胞で置換されたキメラマウスを作製してきた。このキメラマウスの肝臓は、肝細胞はヒト由来であるが、非実質細胞はマウス由来である。本研究では、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ことを期待して、キメラマウス肝臓の類洞内皮細胞(mLSEC)をヒト類洞内皮細胞（hLSEC）で置換することを目的とした。3人のドナー由来のhLSEC、および不死化hLSEC TMNK-1細胞を移植に用いた。その結果、hLSECは、2日目に比較して7日目での移植細胞の指標であるヒトCD31遺伝子発現の低下が見られた。一方、TMNK-1細胞では、移植3日目から7日目にかけてヒトCD31発現量の増加が認められたが、4週目では低下していた。以上のことから、継代培養hLSECおよび不死化hLSECは、肝臓内での増殖、置換には至らなかったが、uPA/SCIDマウスへモノクロタリンを投与2日後にヒト肝細胞と共に移植することにより、マウス肝臓への生着が認められた。今後、より若いドナー細胞や、血管内皮前駆細胞などの移植により、生着した細胞の増殖、置換が期待される。

A.　研究目的

免疫細胞のより効率的な生着や類洞内皮細胞との相互作用が可能なヒト肝細胞キメラマウスを作出するために、キメラマウスの肝臓の類洞内皮細胞（mLSEC）をヒト類洞内皮細胞（hLSEC）に置換させることを目的とした。

B.　研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスの作成

5歳/男性/アフリカ系アメリカ人または、2歳/女児 /ヒスパニック人(BD Gentest、米国)の凍結ヒト肝細胞をキメラマウスのドナー肝細胞として用いた。キメラマウスのホストマウスである3週齢のurokinase plasminogen activator transgenic/SCID (uPA/SCID) マウスへ、1匹あたり2.5×10^5個のヒト肝細胞をマウスの脾臓より注入した (20 µL)。移植後3週目、および6週目からは週1回尾静脈から2 µLの採血を実施した。採取した血液中のヒトアルブミン濃度を、抗ヒトアルブミン抗体を結合させたラテックスビーズを用いた免疫比濁法により測定し、その濃度推移をモニタリングした。

ヒト肝細胞キメラマウスからのヒト肝細胞分離

マウス血中ヒトアルブミン濃度が13 mg/ml以上の13-16週齢のキメラマウスから、コラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離した。この肝細胞にはわずかにマウス肝細胞が混入しているため、マウス肝細胞表面に特異的な抗体（66Z）に磁気ビーズを結合させたものを用いて、マウス肝細胞を除去した (2)。肝細胞の生存率をトリパンブルー染色により、マウス肝細胞の混入率をfluorescent activating cell sorting (FACS)により計測した。

hLSEC

広島大学外科学において肝切除術における切除肝の正常部位をインフォームドコンセントを行った上で採取し、hLSECを分離した。以下に示す3人のドナーより提供いただいたhLSECを用いた。（１）hLSEC1 :分離後2継代したhLSEC (76才、男性)を受領し、1継代行っ

た細胞（合計3継代）を移植に用いた。（２）hLSEC2：分離後3継代したhLSEC (65才、男性)を受領し、1継代行った細胞（合計4継代）を移植に用いた。（３）hLSEC3：分離後3継代したhLSEC (56才、女性)を受領し、４継代した細胞（合計7継代）を移植に用いた。また、1継代行った細胞を凍結保存し、融解後1回継代し（合計5継代）移植に用いた。

健常人由来のhLSEC（Cell Systems Co., Seatle, WA）にSV40TとhTERTを導入し不死化したTMNK-1細胞を、作製者である小林直哉先生より使用許諾後、都立医学研の小原道法先生より分与いただいた。19または22継代目のTMNK-1細胞を移植に用いた。

肝臓の電子顕微鏡観察

モノクロタリンはマウス肝臓の類洞内皮細胞に障害を与え除去する作用があることが知られている。そこで、17週齢のキメラマウスにモノクロタリン（Sigma-Ardrich Corp.）を投与24時間目に、2% glutaraldehyde /0.1M cacodylate buffer, pH 7.4で門脈より灌流固定後、肝臓を細切し1% OsO4/0,1M phosphate bufferで1時間後固定した。脱水後エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を作製した。また、14週齢の非移植のuPA/SCIDマウス肝臓超薄切片も同様に作製した。電子染色後、透過型電子顕微鏡により観察を行った

hLSECまたはTMNK-1細胞のキメラマウスへの移植

キメラマウスにモノクロタリンを腹腔内投与後に、上記継代培養hLSECまたはTMNK-1を脾臓より移植した(20 μL)。マウスは移植後2または3日目と7日目、14日目に解剖し肝臓を採取した（表１）。

表1 uPA/SCIDマウスへの移植実験

移植番号	移植日	hLSEC	ドナー年齢	性別	継代数	MCT (mg/kg)	移植LSEC数 (x10^5)	移植肝細胞数 (x10^5)	匹数	死亡匹数	解剖
2	2011/1/31	hLSEC1	76	男	3（凍結1込）	200	5	5（BD85キメラマウス）	10（MCT投与:5, 非投与:5）	0	day 7, 73
3	2012/7/4	hLSEC2	65	男	4	200	5	1.25（BD195）	6	4	day 7
4	2012/7/27	hLSEC3	56	女	7	400	5	2.5（BD195キメラマウス）	9	2	day 3, 7, 10
6	2012/10/17	TMNK-1	–	–	22	400	2.5	2.5（BD195キメラマウス）	6	0	day 2, 7
7	2012/12/18	TMNK-1	–	–	22	400	2.5	5（BD195キメラマウス）	15	7	day 43
8	2012/1/23	TMNK-1	–	–	19	400	2.5	5（BD195キメラマウス）	7	2	day 7, 43

表2 2キメラマウスへの移植実験

移植番号	移植日	hLSEC	ドナー年齢	性別	継代数	MCT (mg/kg)	移植LSEC数 (x10^5)	移植肝細胞数 (x10^5)	匹数	死亡匹数	解剖
1	2010/1/29	hLSEC1	76	男	3（凍結1込）	400	19	–	3	0	day 14
5	2012/8/3	hLSEC3	56	女	5（凍結1込み）	800	5	–	6	0	day 3, 7
6	2012/10/17	TMNK-1	–	–	22	800	2.5	–	4	0	day 2, 7

hLSEC細胞とヒト肝細胞の同時移植

3週齢のuPA/SCIDマウスにモノクロタリンを腹腔内投与後に、凍結融解したヒト肝細胞、またはキメラマウスより分離したヒト肝細胞と、hLSEC を混合し脾臓より移植した(20 μL)。マウスの一部は移植後3、7、10、73日目に解剖し肝臓を採取した（表１）。

TMNK-1と肝細胞の同時移植

3週齢のuPA/SCIDマウスにモノクロタリンを腹腔内投与後に、キメラマウスより分離したヒト肝細胞と、TMNK-1細胞を混合し脾臓より移植した(20 μL)。また、1部のマウスには、3週齢のuPA/SCIDマウスにキメラマウスより分離したヒト肝細胞を移植し、翌週、モノクロタリンを腹腔内投与2日後に、TMNK-1細胞を脾臓より移植し、2、7、43日目に解剖し肝臓を採取した（表１）。

定量性real-time RT-PCR法によるhStabillin IIとhCD31の定量

凍結した肝臓組織約30 mgからQIAGENのRNeasy Mini Kitを用いてRNAを抽出し、以下のようにcDNAを合成した。Total RNA 1 μg、dNTP (2.5 mM) 2 μL、ランダムプライマー 1 μLを混合し、全量13 μLを65℃で5分間変性させた後、氷冷した。この調製液に5×First-strand buffer 4 μL、100 mM DTT 1 μL、RNase-free水 1 μL、SuperScriptⅢRT逆転写酵素1 μL (200 U/μL)を加えて全量20 μLとした。この調製液を25℃で5分、55℃で60分、72℃で15分反応させた。得られたcDNAを鋳型として、以下の方法によりPCRを行った。逆転写反応液1 μLに対しforwardおよびreverse primerを5 mol/ [illegible]SYBR Green PCR Master mixが1倍量になるように加え、滅菌精製水で全量を25 μLとした。それぞれの遺伝子について7500 Real Time RT-PCR System (Applied Biosystems)を用い、50℃で2分間を1回、95℃で10分間反応させた後に95℃、15秒間及び60℃、1分間を交互に40回反応させた。Primerは、hCD31はForward: TATGCAGACCTCAGAATCTAC, Reverse CACTTAATGTGGAGCTGAG、hStabillin IIはForward: ATTCAATGTAAATGAGCTTTTGG, Reverse: CTTTATTTGATTGTCCTTATCGCを用いた。陽性コントロールとして、市販の5ドナーの肝組織プール由来のRNA(pooledヒト肝臓、Biochain Institute Inc.)から合成したcDNAを用いた。発現量は各遺伝子のサイクル数(Ct値)から2^{Ct}として表し、目的のmRNAのpooled肝臓のmRNAに対する相対比として示した。

キメラマウス肝臓におけるhCD31免疫染色

キメラマウスから採取した肝臓をホルマリ

ン固定し、パラフィンブロックを作製した。パラフィン切片を作製し、Target Retrieval Solution(DAKO)で処理後、hCD31マウスモノクローナル抗体（DAKO）およびマウスEnvision+system (DAKO) を用いて染色した。

（倫理面への配慮）

キメラマウスに移植するヒト肝細胞は、海外において適切な手続きを経て加工・販売されているものを、（株）フェニックスバイオのヒト組織利用倫理委員会において承認を得た上で、購入して使用した。

ヒト肝細胞を持つキメラマウス作製実験に関しては、（株）フェニックスバイオの動物実験倫理委員会において研究計画の承認を得た上で行った。

hLSECは、広島大学の倫理委員会で承認を得た上で、患者にインフォームドコンセントを行ったものを使用した。

ヒト肝臓由来RNAは、市販の5ドナーの肝組織プール由来のRNA(pooledヒト肝臓、Biochain Institute Inc.)を用いた。

C.　研究結果

hLSECおよびTMNK-1細胞の形態及び倍化時間

hLSECとTMNK-1細胞の形態を図1に示す。両者に顕著な差はなかった。倍加時間は、hLSEC1は約77時間、hLSEC2は約33-345時間、hLSEC3は約80時間、TMNK-1細胞は約46時間であった。

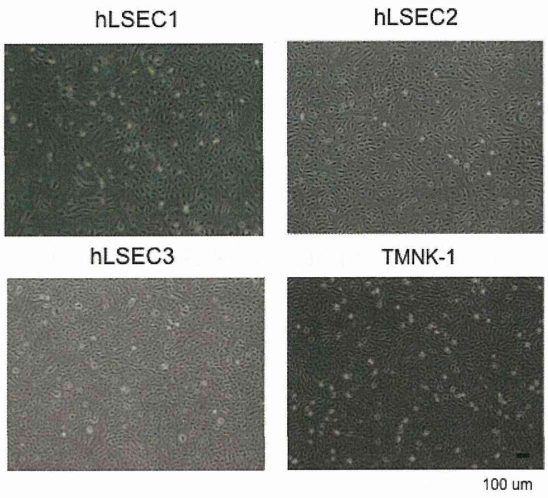

図1 hLSECおよびTMNK-1の位相差顕微鏡像

キメラマウス肝臓のモノクロタリン投与後およびホストマウス肝臓の微細構造

14週齢のキメラマウスに400 mg/kgのモノクロタリンを投与24時間後に肝臓を採取し、透過型電子顕微鏡を用いて微細構造を観察した。その結果、ヒト肝細胞で強度の脂肪変性や肝細胞死が認められたが、目的とするmLSECへの障害、剥離は観察されなかった。

ホストマウスである3週齢uPA/SCIDマウスの肝臓は、uPAの発現により肝細胞に多数の小さな脂肪滴が蓄積することから白色を呈している。7週齢以降のuPA/SCIDマウスの肝臓には、白い領域と赤い領域が観察される。赤い領域はuPAの遺伝子が欠失し、正常マウスの肝細胞のコロニーが増殖している領域である。14週齢のuPA/SCIDマウスの白い領域は、3週齢uPA/SCIDマウスの白い肝臓と同様の形態を示すと考えられ、14週齢のuPA/SCIDマウスの白い領域を採取し透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、uPA/SCIDマウス肝臓の白い領域には、類洞内皮細胞のdisse腔からの乖離が観察された。

以上の結果から、キメラマウス肝臓と3週令のuPA/SCIDマウスでは、モノクロタリンの効果が異なることが示された。

hLSEC移植キメラマウス肝臓におけるhCD31 mRNAの発現

17週齢のキメラマウス4匹にモノクロタリン400 mg/kgを1回腹腔内に投与し、24時間後に4匹中3匹に脾臓よりhLSEC1 (3継代目、1.9 $\times 10^6$個)を移植した（移植１）。また、モノクロタリン非投与およびhLSEC非移植のキメラマウス3匹、およびキメラマウスのドナー細胞を陰性コントロールとした。また、移植前のhLSECとpooledヒト肝臓を陽性コントロールとして用いた。これらのサンプルからcDNAを調整し、hStabillin IIに特異的なprimerを用いてreal-time RT-PCRを実施した。その結果、Pooledヒト肝臓ではhStabillin IIの高いmRNA発現量がみられたが、移植前のhLSECにおいては検出されなかった。モノクロタリン処理したキメラマウス肝臓では、hLSEC移植、非移植にかかわらず、hStabillin IIは検出されなかった。移植前のhLSECにおいてもhStabillin IIが検出されなかったことから、移植に用いたhLSECは継代培養の過程でhStabillin IIの発現を失った可能性が考えられた。

そこで、他のhLSECのマーカーとして、hCD31を用いることとした。hStabillin IIと同様にサンプル中のhCD31 mRNA発現量を調べたところ、陽性コントロールであるpooledヒト肝臓およびhLSECにおいてhCD31の高い発現が見られた。しかしながら、移植後14日目のキメラマウス肝臓では、hLSECを移植していな

いキメラマウス3匹と同様、hCD31 mRNAはほとんど検出されなかった。キメラマウスのドナー肝細胞においても、hCD31 mRNAはほとんど検出されなかった（図2）。したがって、キメラマウスに400 mg/kgのモノクロタリン投与後にhLSECを移植しても、キメラマウス肝臓には生着しなかったと考えられた。

3週齢のuPA/SCIDマウス5匹に200 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与し24時間後にヒト肝細胞(5×10^5個)とhLSEC1 (3継代目、5×10^5個)を脾臓より移植した（移植２）。また、5匹には非投与の状態でヒト肝細胞とhLSEC1を脾臓より移植した（移植２）。移植したヒト肝細胞は、キメラマウスから分離した肝細胞を用いた。この肝細胞の生存率は90.9%、ヒト肝細胞の純度は99.3%（マウス肝細胞混入率：0.7%）であった。尚、キメラマウスから分離したヒト肝細胞は、3週齢のuPA/SCIDマウス肝臓に生着し置換率70%以上の高置換キメラマウスが得られる事を確認している。

移植後1週目にモノクロタリン投与、非投与マウスを2匹ずつ解剖し肝臓を採取した。これらの肝臓よりcDNAを調整し、hCD31 mRNAの発現をreal-time RT-PCRにより調べた。その結果、hLSECを移植したマウスではhCD31 mRNAの発現が認められた。また、モノクロタリンを投与したマウスの方が非投与のマウスに比べて約10倍の高い発現量を示した。ただし、この発現量は、pooled肝臓に比較すると1/100程度であった。移植後11週目のマウス（モノクロタリン投与3匹、非投与3匹）を解剖し、肝臓におけるhCD31 mRNA発現量の測定を行った。その結果、移植後1週目に比較して1/100程度に低下していた（図2)。

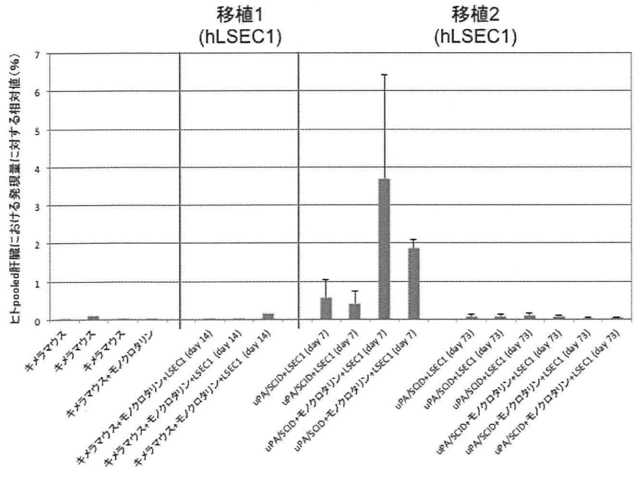

図2　hLSEC移植後の肝臓におけるhCD31 mRNAの発現量

次に、3週齢のuPA/SCIDマウス6匹に200 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与して48時間後にヒト肝細胞 (1.25×10^5個)とhLSEC2(4継代目、5×10^5個)を脾臓より移植した（移植３）。その結果6匹中4匹が死亡した。残りのマウスは移植後7日目に肝臓を採取した。次に3週齢のuPA/SCIDマウス9匹に400 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与して48時間後にヒト肝細胞 (2.5×10^5個)と新たに広島大学より新たに入手したhLSEC3(7継代目、5×10^5個)を脾臓より移植した（移植４）。その結果9匹中2匹が死亡した。残りのマウスは移植後3、7日目に肝臓を採取した。肝臓におけるhCD31遺伝子発現を定量性real-time RT-PCRにより調べたところ、3日に比べて7日目で低下していた（図３）。

キメラマウスへのhLSEC移植では、400 mg/kgモノクロタリンでは生着が認められなかったため、キメラマウス6匹に800 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与して48時間後hLSEC3 (4継代目、5×10^5個)を脾臓より移植し（移植5)、3日目と7日目に肝臓を採取した。その結果、肝臓におけるhCD31遺伝子発現は、3日目で観察されたが、7日目で低下していた（図３）。

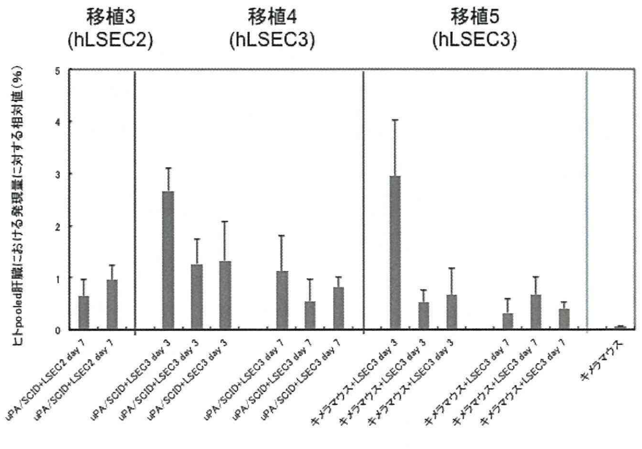

図3　hLSEC移植後の肝臓におけるhCD31 mRNAの発現量

hLSEC移植キメラマウス肝臓におけるhCD31抗体による免疫染色

hLSECを移植して3日目のキメラマウス肝臓（移植５）でhCD31 mRNAが最も高かったキメラマウス肝臓を用いて、hLSECのマーカーである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散在しているのが観察された。一方。hLSECとヒト肝細胞を移植して3日目のuPA/SCIDマウス肝臓（移植4）ではhCD31陽性細胞は観察されなかった（図４）。

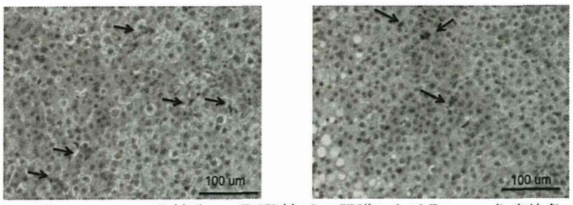

図4　キメラマウスへのLSEC3移植後3日目（移植5）の肝臓におけるhCD31免疫染色

TMNK-1移植キメラマウス肝臓における hCD31 mRNAの発現

3週齢のuPA/SCIDマウス6匹に400 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与して48時間後にヒト肝細胞（2.5×10^5個）とTMNK-1(22継代目、2.5×10^5個)を脾臓より移植し（移植6）、移植後2、7日目に肝臓を採取した。次に3週齢のuPA/SCIDマウス15匹にヒト肝細胞（5×10^5個）を移植し、翌週、400 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与して48時間後にTMNK-1(22継代目、2.5×10^5個)を脾臓より移植したところ（移植7）、15匹中7匹が死亡したため、追加でヒト肝細胞（5×10^5個）とTMNK-1(19継代目、2.5×10^5個)を7匹に移植した（移植8）。移植後2、7、43日目に肝臓を採取した。肝臓におけるhCD31遺伝子発現を調べたところ、2日に比べて7日目で一旦増加したが、43日目では低下していた。（図５）

キメラマウス4匹に800 mg/kgのモノクロタリンを腹腔内投与して48時間後にTMNK-1(22継代目、2.5×10^5個)を脾臓より移植し（移植6）、2日目と7日目に肝臓を採取した。肝臓におけるhCD31遺伝子発現は、2日目に比べて7日目で低下していた（図５）。

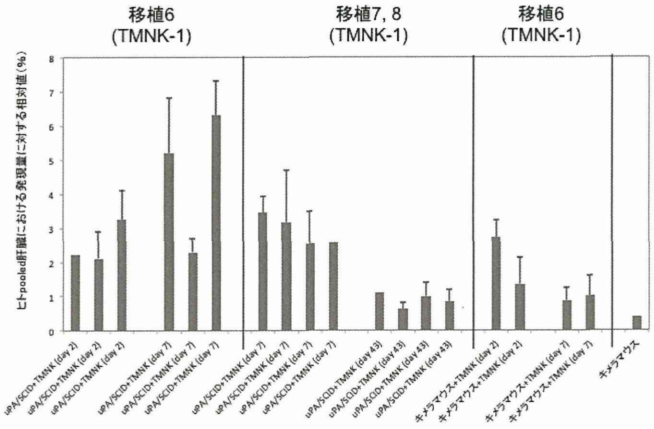

図5　TMNK-1移植後の肝臓におけるhCD31 mRNAの発現量

TMNK-1移植キメラマウス肝臓における hCD31抗体による免疫染色

TMNK-1を移植して7日目のキメラマウス肝臓（移植6）を用いて、hLSECのマーカーである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散在しているのが観察された。一方。hCD31 mRNAが低かったキメラマウス肝臓（移植6）では肝臓が広範囲に壊死しているのが観察された。このことは、移植したTMNK-1細胞が肝臓に塞栓を起こしたことによるものと考えられた（図６）。

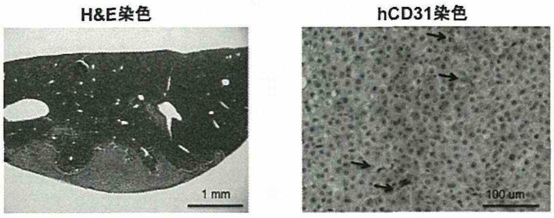

図6　uPA/SCIDマウスへのTMNK-1細胞移植後7日目（移植6）の肝臓における組織染色

D.　考察

3人のドナー由来のhLSECを用いて、キメラマウス肝臓に生着させる方法を試みたところ、モノクロタリンを800 mg/kgをキメラマウスに投与後、hLSEC を移植することにより、また、200または400 mg/kgのモノクロタリンを投与後のuPA/SCIDマウスにヒト肝細胞とhLSECを同時移植することにより、hCD31の発現が観察され、キメラマウス肝臓にhLSECが生着したと考えられた。しかしながら、3日目の発現が最も高く、7日目では低下していた。不死化細胞であるTMNK-1細胞をドナー細胞として用いたところ、7日目でhLSECの約2倍のhCD31の発現が観察された。また、hLSECとは異なり、2日目よりも7日目の発現の方が高かった。しかしながら、43日目には低下していた。hLSECやTMNK-1を移植したマウス肝臓のhCD31の免疫染色の結果からは、移植した細胞がコロニーを形成して増殖しているような像は観察されなかった。これらのことから、hLSECやTMNK-1はキメラマウスやuPA/SCIDマウス肝臓に生着するが、ヒト肝細胞の増殖と同様な増殖は起こらなかったと考えられた。

今後、より若いドナー由来のhLSECやヒト血管内皮前駆細胞（hEPC）などを移植細胞として用いることにより、マウス肝臓での増殖が期待される。

E.　結論

キメラマウスやuPA/SCIDマウスにモノクロタリンを投与することにより、hLSECやTMNK-1細胞が生着する方法を確立した。しかし、生着後、これらの細胞の活発な増殖が促進されず、本研究においては、mLSECをhLSECに置換することはできなかった。

G.　研究発表

1．論文発表

1. Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, Yoshizato K, Kobayashi E. Transplantation of Engineered Chimeric Liver With Autologous Hepatocytes and Xenobiotic Scaffold. Annals of Surgery 2013;257(3):542-547.

2. Kakuni M, Morita M, Matsuo K, Katoh Y, Nakajima M, Tateno C, Yokoi T. Chimeric Mice with a Humanized Liver as an Animal Model of Troglitazone-induced Liver Injury. Toxicology Letter 2012;214(1):9-18.

3. Hasegawa M, Tahara H, Inoue R, Kakuni M, Tateno C, Ushiki J. Investigation of Drug-drug Interactions Caused by Human Pregnane X Receptor-mediated Induction of Cytochrome P450 3A4 and 2C Subfamilies in Chimeric Mice with a Humanized Liver. Drug Metab Dispos 2012;40(3):474-480.

4. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe A, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe Necroinflammatory Reaction Caused by Natural Killer and Dendritic Cells in Human Hepatocyte Chimeric Mouse. Hepatology 2012;56(2):555-566.

5. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. J Hepatol. 2011;54(5):872-878.

6. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Predictability of Metabolism of Ibuprofen and Naproxen Using Chimeric Mice with Human Hepatocytes. Drug Metabolism and Disposition 2012;40(12):2267-2272.

7. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. Prediction of in vivo hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. Drug Metab Dispos. 2012;40(2):322-328.

8. Mashimo T, Takizawa A, Kobayashi J, Kunihiro Y, Yoshimi K, Ishida S, Tanabe K, Yanagi A, Tachibana A, Hirose J, Yomoda J, Morimoto S, Kuramoto T, Voigt B, Watanabe T, Hiai H, Tateno C, Komatsu K, Serikawa T. Generation and Characterization of Severe Combined Immunodeficiency Rats. Cell Reports 2012;2(3):685-694.

9. Fujiwara S, Fujioka H, Tateno C, Taniguchi K, Ito M, Ohishi H, Utoh R, Ishibashi H, Kanematsu T, Yoshizato K. A novel animal model for in vivo study of liver cancer metastasis.World J Gastroenterol. 2012;18(29):3875-3882.

10. Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheyen F, Inoue K, Sato K, Kudo A, Arii S, Itamoto T, Asahara T, Tsunoda T, Yoshizato K. Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers. Laboratory Investigation 2013;93(1):54-71.

11. 加国雅和、立野知世、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた抗肝炎ウイルス薬効評価系、ファルマシア 2012;4:956-958.

12. 立野知世、ヒト肝細胞キメラマウス—肝臓肥大のメカニズムに関して—生化学　特集「肝臓の発生・再生」宮島篤編、生化学 2012;84:699-706.

13. 石田雄二、立野知世、吉里勝利、ヒト化肝臓をもつキメラマウスを用いた創薬研究、最新疾患モデルと創薬応用研究の最前線、遺伝子医学 MOOK 2012;22:38-43.

14. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. J Hepatol. 2011, 54(5):872-878.

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. Yoshizato K, Tateno C, Utoh R. Mice with Liver Composed of Human Hepatocytes as an Animal Model for Drug Testing. Curr Drug Discov Technol 2012;9(1):63-76.

17. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, 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 wildtype clone in vivo. Hepatology, 2011;54:781-788.

18. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama