

肝臓内抗原提示細胞（マクロファージ及び類洞内皮細胞）による HCV 抗原提示機能の解明

研究分担者 的崎 尚 神戸大学大学院医学研究科 教授
尾上 隆司 国立病院機構呉医療センター臨床研究部 室長

研究要旨 C型ウイルス（HCV）持続感染には、HCV 感染に伴う抗原提示細胞の機能抑制が関与することが示唆されているが、その詳細は明らかではない。本研究では、マクロファージなどの抗原提示細胞に高発現する膜型分子 SIRP α とそのリガンド分子である膜型分子 CD47 との相互作用が HCV 感染細胞の貪食を介したマクロファージの HCV 抗原提示機能の制御に関与するかについて解析する目的で、マクロファージによる肝細胞の貪食の有無及び貪食制御に CD47-SIRP α 系が関与するかについて検討した。また、肝臓に特徴的な抗原提示細胞である類洞内皮細胞の HCV 特異タンパク質取り込み機能に関して解析し、類洞内皮細胞が HCV 抗原に対する宿主免疫を抑制している可能性を検討した。

A. 研究目的

C 型ウイルス（HCV）感染では、非常に高率に持続感染が生じ、HCV 感染を持続化させる様々な免疫抑制機構や免疫逃避機構の存在が明らかとなりつつあり、その解明が HCV 感染の新たな治療法の確立や克服において重要な課題であると考えられている。分担研究者は、これまでにマクロファージなどの抗原提示細胞に強く発現する膜型分子である SIRP α を発見し、この SIRP α がマクロファージの貪食標的となる細胞の細胞表面上に発現する CD47 と相互作用することで、マクロファージによる標的細胞の貪食を抑制的に制御することを明らかにしている。興味深いことに、HCV 感染を受けた肝組織では CD47 の発現量の増加が報告されていることから、HCV 感染細胞の免疫抑制機構や免疫逃避機構の一つとして、マクロファージによる感染細胞の貪食や HCV 抗原提示後に生じる活性化 T 細胞を介した感染細胞の排除に、感染細胞上の CD47 とマクロファージ上の SIRP α との相互作用が抑制的に作用している可能性が想定される。そこで、本研究では、マクロファージの HCV 抗原提示機能及び抗原提示を

介した T 細胞機能制御における CD47-SIRP α 系の役割を解明し、CD47-SIRP α 系を利用した HCV 感染細胞の排除に向けた新たな治療法開発のための基礎的検討を行うことを目的とする。前年度までに、マウスより単離した肝細胞において CD47 の発現及び貪食細胞であるクッパー細胞における SIRP α の発現の有無を確認した。さらに、CD47 と SIRP α の結合を阻害する抗 SIRP α 抗体による、オプソニン化 CD47 発現細胞のマクロファージによる貪食への影響について解析を進め、抗 SIRP α 抗体がマクロファージによる貪食排除の促進につながる可能性を見出した。そこで、本年度は、貪食細胞による肝細胞の貪食の有無と貪食制御への CD47-SIRP α 系の関与、並びに、抗 SIRP α 抗体を用いた新たな HCV 感染細胞の治療法開発の基礎的検討をさらに進めた。

また肝臓は免疫学的に寛容な臓器として認識されているが、そのメカニズムの一つに類洞内皮細胞による免疫抑制機構が指摘されている。同種移植モデルではマウス肝類洞内皮細胞によって抗原提示された T 細胞は Fas-FasL および PD1-PDL1 経路を介してア

ポトースに陥り、抗原特異的に免疫寛容が誘導されることが示されている。この現象は、類洞内皮細胞が HCV 由来のペプチド抗原を提示する可能性と、それによって応答した T 細胞が抑制され免疫回避される可能性を示唆する。そこで、本研究では、肝類洞内皮細胞の HCV 抗原提示機能および HCV 抗原反応性 T 細胞機能抑制を介した免疫逃避機構を解明し、その克服法を探索することを目的とした基礎的検討を行う。前年度までに、コラゲナーゼおよび機械的 digestion 法と内皮細胞マーカーである CD146 分子に対する抗体を用いた magnetic sorting 法を用いた分離法を検討し、条件を最適化した結果、高純度の類洞内皮細胞を単離することに成功した。さらに単離した類洞内皮細胞は、抗原提示に必要なクラス II、CD40、CD86 およびアポトーシス誘導分子である B7-H1 分子の表出も認めた。さらに同種マウス脾細胞を抗原として T 細胞増殖抑制能の検討を行い、類洞内皮細胞の明らかな抗同種 T 細胞反応抑制作用を確認した。そこで、本年度は、類洞内皮細胞の HCV 特異タンパク抗原取り込み能および HCV タンパク抗原に対する反応抑制の可能性を検証し、類洞内皮細胞をターゲットとした新たな HCV 感染細胞の治療法開発の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

(1) CD47-SIRP α の相互作用の阻害が、HCV などのウイルス感染肝細胞の貪食排除の促進に寄与するかについて検討する目的で、予備的検討として、M-CSF 存在下にてマウス骨髄由来細胞より得られたマクロファージとマウス肝組織より単離した肝細胞との共培養を行い、マクロファージによる肝細胞の貪食について検討した。

(2) 類洞内皮細胞の HCV タンパク抗原取り込み能を検討する目的で、蛍光ラベルした HCV タンパクである NS5A をマウスに門脈注射し、免疫組織学的に検討を行った。

(3) マウス免疫法を用いて HCV 抗原タンパクに対する特異的免疫反応マウスモデルを確立し、これを用いて HCV タンパクを取り込んだ類洞内皮細胞のもつ HCV タンパク抗原特異的反応抑制能を *in vitro* assay にて検討

した。

C. 研究結果

(1) マクロファージによる肝細胞の貪食の有無につき *in vitro* での貪食実験を行ったところ、肝細胞に発現する膜蛋白質 CD81 に対する抗体にてオプソニン化された肝細胞については、IFN- γ にて刺激したマクロファージによる貪食が確認された。さらに、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗体の存在下では、貪食の促進が認められた。一方、抗 CD81 抗体によるオプソニン化がなされていない肝細胞については、抗 SIRP α 抗体による貪食の促進は認められなかった。また、SIRP α 遺伝子欠損(SIRP α KO)マウスより調整したマクロファージでは、野生型マウス由来マクロファージに比べて抗 CD81 抗体によりオプソニン化された肝細胞の貪食の促進が認められた。

(2) 蛍光ラベルした NS5A を門脈注射したマウスにおいて注射 1 2 時間後に蛍光組織染色にて NS5A タンパクの局在を評価したところ、肝臓内への取り込みを認めた。またその局在は肝類洞を形成する類洞内皮細胞の並びににそって認められ、循環血液中の HCV タンパクが類洞内皮細胞に取り込まれることが確認された。

(3) NS5A タンパクをアジュバントと共に免疫したマウスの脾細胞を用いた増殖実験では、NS5A 抗原特異的 T 細胞反応増殖が惹起されることを認めた。さらにこの NS5A 免疫マウスの抗原特異的 T 細胞反応増殖は NS5A タンパクを門脈注入したマウスから分離した類洞内皮細胞との共培養により有意に抑制されることを見出した。また培養中の制御性 T 細胞 (Treg) の増加は認めなかったが、上清中のサイトカイン解析により、類洞内皮細胞による免疫反応抑制下では IFN- γ の分泌が有意に抑制され、IL-10 の分泌が有意に促進されていることが明らかとなった。

D. 考察

本研究において、オプソニン化されたマウス由来肝細胞がマウス骨髄由来マクロファージによりわずかながら貪食される傾向が認められた。さらに、このマクロファージによる肝細胞の貪食は、マクロファージ上の SIRP α の欠損及び CD47 と SIRP α 結合を阻害す

る抗体により促進されることが確認された。これまでに、HCV感染肝組織においてCD47の発現量の上昇が免疫組織により報告されていることから、ウイルス感染などにより外来抗原を表出した肝細胞が、クッパー細胞などのマクロファージにより貪食される際に、CD47-SIRP α 系を介して、HCV感染肝細胞の貪食が抑制されている可能性が考えられる。今後、クッパー細胞などのマクロファージによる正常肝細胞及びHCV感染細胞の貪食制御へのCD47-SIRP α 系の関与をより詳細に解析すると共に、HCV感染肝細胞でのCD47の詳細な発現解析が求められる。

類洞内皮細胞に関しては本研究によって、類洞内皮細胞がHCVタンパク抗原を取り込み、HCVタンパク反応性T細胞を特異的に抑制する能力を持つこと、さらにその抑制機構には、IL-10が関与していることが確認された。このことは、HCV感染状況下で類洞内皮細胞が免疫回避機構の一部を担い、HCV持続感染に寄与していることを示唆するものである。今後、類洞内皮細胞の免疫抑制能を減弱する可能性を探る目的に、さらにその分子機構を解析する必要がある。

E. 結論

本研究により、オプソニン化肝細胞のマクロファージによる貪食にCD47-SIRP α 系が関与する可能性が強く示唆され、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗SIRP α 抗体のHCV感染肝細胞排除への応用が期待された。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Li XJ, Goodwin CB, Nabinger SC, Richine BM, Yang Z, Hanenberg H, Ohnishi H, Matozaki T, Feng GS, Chan RJ. Protein-tyrosine Phosphatase Shp2 Positively Regulates Macrophage Oxidative Burst. *J Biol Chem*. 2015; 290(7):3894-909.

2. Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP α signalling system: its physiological roles and therapeutic application.

J Biochem. 2014; 155(6):335-344.

3. Yamashita H, Kotani T, Park JH, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Ku Y, Matozaki T. Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PLoS One*. 2014; 9(3):e92904.

4. Stenberg Å, Karlsson A, Feuk-Lagerstedt E, Christenson K, Bylund J, Oldenberg A, Vesterlund L, Matozaki T, Sehlin J, Oldenberg PA. Signal regulatory protein alpha is present in several neutrophil granule populations and is rapidly mobilized to the cell surface to negatively fine-tune neutrophil accumulation in inflammation. *J Innate Immun*. 2014; 6(4):553-560.

5. Koshimizu H, Takao K, Matozaki T, Ohnishi H, Miyakawa T. Comprehensive behavioral analysis of cluster of differentiation 47 knockout mice, *PLoS One*. 2014; 9(2):e89584.

6. Abe T, Onoe T, Tahara H, Tashiro H, Ishiyama K, Ide K, Ohira M, Ohdan H. Risk factors for development of new-onset diabetes mellitus and progressive impairment of glucose metabolism after living-donor liver transplantation. *Transplant Proc*, 2014; 46(3): 865-869.

2. 学会発表

1. Hashimoto S, Banshodani M, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H
“Adoptive transfer of allogeneic liver sinusoidal endothelial cells specifically inhibits T cell responses to cognate stimuli and prolonged allo-graft survival of heterotopic heart transplantation in mice.”
ISEM 2014, Kyoto, Japan

2. Hashimoto S, Onoe T, Tanaka Y, Ohdan H
“Post operative portal hypertension accelerates allo-immune responses in recipients after living donor liver transplantation by impairing antigen presenting capacity of liver sinusoidal endothelial cells.”
World Transplant Congress (WTC) 2014, San Francisco, USA

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

NK 細胞による HCV 蛋白質発現ヒト不死化肝細胞の 認識機構の解析

研究分担者 加藤 宣之 岡山大学 教授
研究協力者 團迫 浩方 岡山大学 助教

研究要旨 ウイルス感染により誘導される生体内の自然免疫応答は、ナチュラルキラー（NK）細胞などのリンパ球が関与している。NK 細胞はウイルス感染細胞表面上の種々の表面抗原を認識することにより、ウイルス感染を認識し、自然免疫応答を誘導する。本研究は、ヒト不死化肝細胞において、C 型肝炎ウイルス（HCV）により発現誘導する自然免疫応答関連遺伝子を探索することを目的としている。今年度は、この目的を達成するために、HCV タンパク質を発現するヒト不死化肝細胞株 PH5CH8 細胞と NK 細胞株 NK-92 細胞との共培養系を構築し、以下に示すような成果を得た。（1）NK 細胞の活性化には、III 型ではなく I 型インターフェロンが重要であることが分かった。（2）NK-92 細胞は DNA 損傷を受けた PH5CH8 細胞に細胞障害性を示した。（3）NK-92 細胞は NS5B タンパク質を発現する PH5CH8 細胞に細胞障害性を示した。

A. 研究目的

我が国の肝がんによる犠牲者は毎年 3 万人を超えており、その 8 割以上が C 型肝炎ウイルス（HCV）に感染している。長期にわたる HCV の持続感染により引き起こされた慢性肝炎から、肝硬変や肝がんを発症する可能性が高く、社会的な問題となっている。我が国では、HCV 感染患者に対して、体内の HCV 量を減らすため、ペグ-インターフェロン（IFN）とリバビリンの併用療法といった内科的療法が行われていたが、その著効率は 50% 程度であった。2011 年に、HCV の NS3 プロテアーゼに対する阻害剤であるテラプレビルを加えた三剤併用療法が開始され、著効率は 70% 程度に改善された。最近、テラプレビルと同じプロテアーゼ阻害剤であるシメプレビルが認可され、著効率はさらに改善されたが、薬剤耐性変異を持つ HCV の出現等の問題点が指摘されている。

一方、肝がんの治療において、腫瘍の切除等の外科的療法が確実な治療法であるが、再発が多いことが知られている。その原因の一つとして、体内に残る HCV により慢性肝炎が継続していることが考えられている。これら

のことから、HCV を体内から完全に排除し、持続感染さらには慢性肝炎を阻止することが肝がんの発症や再発を予防する意味で最も重要である。そのためには、HCV の持続感染により誘導される自然免疫応答機構を解明することが重要である。

ナチュラルキラー（NK）細胞は生体の自然免疫応答を司る細胞障害性リンパ球の一つである。NK 細胞はウイルス感染細胞やがん細胞を認識し、これらの異常細胞を攻撃する能力を持っている。最近、肝がんに対する肝移植後において、肝がんの再発予防のために、ウイルス感染に対する抵抗力を保持したまま、抗腫瘍効果が得られる細胞免疫療法として、NK 細胞療法が行われている。NK 細胞は標的細胞であるウイルス感染細胞表面上に表出している表面抗原の違いを認識することで、正常細胞と異常細胞を区別していることが知られているが、HCV 存在下での表面抗原の表出についてはあまり情報がない。

現在までに、HCV の生活環を完全に再現できる細胞株として、二種類の肝がん細胞株（HuH-7 と Li23）が報告されている。国内外のグループにより、HuH-7 細胞を用いて、NK 細胞

により認識される表面抗原やリガンドのHCV感染による影響が解析されている。しかしながら、NK細胞はウイルス感染細胞だけでなく、がん細胞も認識することが報告されている。また、正常細胞とがん細胞を比較した場合、表面抗原に違いがあることも報告されている。そのため、これらの研究に肝がん細胞株を用いた場合、HCVによる影響のみを解析することが難しい可能性がある。

前年度、我々は非腫瘍性の表現型を持つヒト不死化肝PH5CH8細胞に、前半領域（Coreタンパク質からNS2タンパク質）あるいは後半領域（NS3タンパク質からNS5Bタンパク質）のHCVタンパク質を恒常的に発現させ、NK細胞により認識される種々の表面抗原の発現変動をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、PH5CH8細胞でのHCVタンパク質の発現は、NK細胞表面のNKGD2レセプターにより認識されるリガンドの一つであるULBP1やULBP2の遺伝子発現量を有為に低下することを明らかにした。本年度は、PH5CH8細胞をNK細胞の標的細胞として用い、PH5CH8細胞でのHCVタンパク質の発現がNK細胞による細胞障害性に与える影響について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 定量的RT-PCR法によるNK細胞でのIFN- γ 産生能の測定。

本研究で使用するNK細胞株NK-92は1994年に樹立されたものであり（Gong et al, Leukemia, 1994）、ATCC（American Type Culture Collection）から購入した。NK-92細胞はインフルエンザウイルスあるいはセンダイウイルスに感染したマクロファージを認識し、IFN- γ を産生することが報告されている（Siren et al., J Gen Virol, 2004）。購入したNK-92細胞がウイルス感染細胞認識の指標となるIFN- γ 産生能を保持しているかどうかを検討した。NK細胞の活性化に重要なIFN- α （100 IU/mL）を添加し、添加3、6および9時間後のNK-92細胞からそれぞれTotal RNAを調製した。得られたTotal RNAを定量的RT-PCR法に供することにより、細胞内IFN- γ mRNA量を測定した。同様に、添加するIFN- α の濃度依存性についても検討した。また、IFN- α と同じI型IFNに属するIFN-

β もNK細胞を活性化することが知られており、IFN- β やIII型IFNに属するIFN- λ によるIFN- γ 産生誘導についても検討した。

(2) NK細胞による標的細胞への細胞障害性を評価する系の構築。

NK細胞による標的細胞への細胞障害性を評価する系の構築を試みた。NK細胞はウイルス感染細胞だけでなく、がん細胞も標的とし、細胞障害性を示すことが知られている。がん細胞と正常細胞とでは表面抗原に違いがあり、DNA損傷により、ULBP1やULBP2の細胞表面発現が亢進することが報告されている。そこで、DNA double-strand breaksを誘発するadriamycinにより、DNA損傷が誘発されたPH5CH8細胞とNK-92細胞を共培養した。共培養開始6時間後に培地交換し、NK-92細胞を取り除いた。NK-92細胞の非存在下で、PH5CH8細胞の培養を継続した。培養5日後に、Coomassie Brilliant Blue (CBB)染色により、生細胞のみを染色し、NK細胞による標的細胞への細胞障害性を定性的に評価した。

(3) HCVタンパク質発現細胞に対するNK細胞による細胞障害性。

(2) で構築した評価系を用いて、標的細胞であるPH5CH8細胞でのHCVタンパク質の発現がNK細胞による細胞障害性に与える影響を定性的に評価した。前年度に作成した前半あるいは後半領域のHCVタンパク質を恒常的に発現するPH5CH8細胞（PH5CH8/C-NS2細胞あるいはPH5CH8/NS3-5B細胞）とNK-92細胞を共培養し、共培養開始6時間後に培地交換し、NK-92細胞を取り除いた。培養5日後に、CBB染色により、生細胞のみを染色し、NK細胞による細胞障害性を定性的に評価した。また、NS5Bタンパク質を恒常的に発現するPH5CH8細胞（PH5CH8/NS5B細胞）とNK-92細胞を共培養し、同様にNK細胞による細胞障害性を定性的に評価した。さらに、transwell systemを用いて、NK細胞による細胞障害性が細胞間接触によるものかどうかを明らかにすることを試みた。

（倫理面への配慮）

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されたものである。

また、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため、倫理面への特段の配慮はしていない。但し、実験に使用した細胞及び核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

(1) 定量的RT-PCR法によるNK-92細胞でのIFN- γ 産生能の測定。

最初に、NK-92細胞がウイルス感染細胞を認識した指標となるIFN- γ 産生能を保持しているかどうか検討した。定量的RT-PCR法により、IFN- α 添加後（最終濃度100 IU/mL）の細胞内IFN- γ mRNA量の経時変化（3、6および9時間後）を調べたところ、6時間後において最も高い値を示し、9時間後では定常状態に近い値まで減少した。そのため、以後の実験では、NK-92細胞にIFN- α を処理する時間は6時間とした。次に、細胞内IFN- γ mRNAの産生誘導に対するIFN- α の濃度依存性について検討した。NK-92細胞にIFN- α （最終濃度はそれぞれ1、10、あるいは100 IU/mL）を添加し、細胞内IFN- γ mRNA量を調べたところ、最終濃度100 IU/mLのIFN- α 添加時に最も高い値を示した。そのため、以後の実験では、NK-92細胞に添加するIFN- α は最終濃度100 IU/mLあるいはそれに相当する量とした。また、NK細胞の活性化には、IFN- α だけでなく同じI型IFNに属するIFN- β も重要であることが報告されている。そこで、IFN- β 、さらにはIII型IFNに属するIFN- λ による細胞内IFN- γ mRNAの産生誘導についても同様に検討した。NK-92細胞にIFN- β （最終濃度100 IU/mL）、IFN- λ 1、IFN- λ 2あるいはIFN- λ 3（いずれも最終濃度100 ng/mL）を添加し、細胞内IFN- γ mRNA量を調べたところ、IFN- β の添加はIFN- γ を産生誘導したが、IFN- λ 1、IFN- λ 2あるいはIFN- λ 3の添加によるIFN- γ の産生誘導を確認することはできなかった。これらの結果により、NK細胞の活性化には、I型IFNであるIFN- α やIFN- β が重要であり、III型IFNは重要ではない可能性が示唆された。

(2) NK細胞による標的細胞への細胞障害性を評価する系の構築。

NK-92細胞によるPH5CH8細胞への細胞障害性を評価する系を構築するために、次の3点を検討した。

一つ目として、NK-92細胞とPH5CH8細胞の共培養が可能かどうか検討した。これら両細胞の培養用培地の組成は大きく異なっているため、共培養時には両培地を等量混合して使用した。混合培地による両細胞の細胞増殖への影響を小さくするために、共培養時間は最小限度にする必要があるが、一方ではNK細胞の最大の活性化が得られる時間を確保する必要もある。そこで、(1)で得られたNK-92細胞の活性化が最大となる6時間を共培養時間とし、NK-92細胞との共培養によるPH5CH8細胞の細胞増殖に対する影響をCBB染色により調べた。その結果、NK-92細胞との共培養はその後のPH5CH8細胞の細胞増殖には、ほとんど影響を示さなかった。この結果からNK-92細胞とPH5CH8細胞の共培養が可能であることが分かった。

二つ目に、活性化されたNK-92細胞がナイーブのPH5CH8細胞に細胞障害性を示さないかどうか検討した。IFN- β を添加したNK-92細胞とPH5CH8細胞を共培養したところ、活性化されたNK-92細胞はPH5CH8細胞に対して細胞障害性をほとんど示さないことが分かった。

三つ目として、活性化されたNK-92細胞がDNA損傷を誘発したPH5CH8細胞に細胞障害性を示すかどうか検討した。IFN- β 処理したNK-92細胞と、adriamycin処理したPH5CH8細胞を共培養したところ、活性化されたNK-92細胞はDNA損傷を受けたPH5CH8細胞に細胞障害性を示すことが分かった。また、adriamycin処理したPH5CH8細胞のULBP1やULBP2遺伝子の発現量は有為に上昇していることが分かった。これらの結果は、NK-92細胞は標的細胞であるPH5CH8細胞でのULBP1やULBP2の発現上昇を認識することにより、細胞障害性を示している可能性があることを示唆している。

これら一連の実験により、NK細胞による標的細胞への細胞障害性を評価する系が構築できたと考えられる。

(3) HCVタンパク質発現細胞に対するNK細胞による細胞障害性。

(2)で構築した評価系を用いて、標的細胞であるPH5CH8細胞でのHCVタンパク質の発現がNK細胞による細胞障害性に与える影響を定性的に評価した。NK-92細胞とPH5CH8/C-NS2細胞を共培養したところ、NK細胞によ

る細胞障害性はわずかに軽減された。一方、PH5CH8/NS3-5B細胞との共培養では、NK-92細胞による細胞障害性はほとんど変化がなかった。しかしながら、PH5CH8/NS5B細胞との共培養では、NK細胞による細胞障害性は顕著に示された。また、transwell systemを用いて、NK-92細胞とPH5CH8/NS5B細胞を共培養したところ、NK-92細胞はNS5Bタンパク質を発現するPH5CH8細胞に細胞障害性を示さなかった。これらの結果は、NK細胞による細胞障害性はNS5Bタンパク質の発現が影響しており、その細胞障害性はNK細胞との細胞間接触によるものであることを示唆している。

D. 考察

(1) 定量的RT-PCR法によるNK-92細胞でのIFN- γ 産生能の測定。

今年度は、NK-92細胞がウイルス感染細胞認識の指標となるIFN- γ 産生能を保持していることを確認することができた。次年度以降、健常人から分離したNK細胞も利用する予定であり、NK細胞の活性化を簡便に測定する系をさらに充実できるものと思われる。

(2) NK細胞による標的細胞への細胞障害性を評価する系の構築。

今年度、NK細胞による標的細胞への細胞障害性を評価する系が構築することができた。次年度以降、この評価系を用いて、健常人から分離したNK細胞による標的細胞への細胞障害性を評価することを予定している。また、HCVを感染させた正常ヒト初代肝細胞やヒトiPS細胞由来肝細胞への細胞障害性の評価も可能であると思われる。

(3) HCVタンパク質発現細胞に対するNK細胞による細胞障害性。

前年度に作成したPH5CH8/C-NS2細胞あるいはPH5CH8/NS3-5B細胞を用いて、標的細胞でのHCVタンパク質の発現がNK細胞による細胞障害性に与える影響を定性的に評価した。

最初に、NK-92細胞とPH5CH8/C-NS2細胞を共培養したところ、NK細胞による細胞障害性は減弱した。前年度の定量的PCRの結果では、PH5CH8/C-NS2細胞におけるULBP1やULBP2の遺伝子発現量は有意に低下しており、NK細胞による認識を回避している可能性が示唆さ

れる。

次に、PH5CH8/NS3-5B細胞と共培養したところ、NK-92細胞による細胞障害性はほとんど変化がなかった。しかしながら、PH5CH8/NS5B細胞との共培養では、NK細胞による細胞障害性は顕著に亢進した。我々は以前、PH5CH8/NS5B細胞において、IFN- β が発現誘導されていることや、DNA損傷に対する感受性を亢進することを見出しており、これらの現象がNK細胞による細胞障害性の亢進に関与しているものと思われる。一方、我々は、NS3-4Aタンパク質がNS5Bタンパク質によるIFN- β の発現誘導を抑制することや、DNA損傷チェックポイント機構に関わる宿主因子ATMと相互作用し、その機能を阻害することも見出している。これらのことより、NS3-4Aタンパク質がNK細胞の活性化に対する抑制やDNA損傷に対する抑制する機能を持っている可能性が示唆される。

次年度以降、NS3-4Aタンパク質やNS5Bタンパク質によるDNA損傷機構への影響がNK細胞による認識に関与しているかどうかを検討する予定である。

E. 結論

今年度は、NK細胞株NK-92とヒト不死化肝細胞株PH5CH8の共培養系を構築し、以下のような成果を得た。

(1) NK細胞の活性化には、III型ではなくI型インターフェロンが重要であることが分かった。

(2) NK-92細胞はDNA損傷を受けたPH5CH8細胞に細胞障害性を示した。

(3) NK-92細胞はNS5Bタンパク質を発現するPH5CH8細胞に細胞障害性を示した。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive 1 entry of hepatitis

- C virus. *J Gen Virol*, 95(12):2658-2667 (2014).
- 2) Shimada H, Haraguchi K, Hotta K, Miyaike T, Kitagawa Y, Tanaka H, Kaneda R, Abe H, Shuto S, Mori K, Ueda Y, Kato N, Snoeck R, Andrei G, Balzarini J. Synthesis of 3',4'-difluoro-3'-deoxyribonucleosides and its evaluation of the biological activities: Discovery of a novel type of anti-HCV agent 3',4'-difluorocordycepin. *Bioorg Med Chem*, 22(21):6174-6182 (2014).
 - 3) Hara Y, Yanatori I, Ikeda M, Kiyokage E, Nishina S, Tomiyama Y, Toida K, Kishi F, Kato N, Imamura M, Chayama K, Hino K. Hepatitis C virus core protein suppresses mitophagy by interacting with Parkin in the context of mitochondrial depolarization. *Amer J Pathol*, 184(11):3026-3039 (2014).
 - 4) Matsuno K, Ueda Y, Fukuda M, Onoda K, Waki M, Ikeda M, Kato N, Miyachi H. Synthesis and inhibitory activity on hepatitis C virus RNA replication of 4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy-2-propyl)aniline analogs. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(17): 4276-4280 (2014).
 - 5) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for viral assembly of hepatitis C virus through trafficking of the core protein to lipid droplets. *Virology*, 462-463:166-174 (2014).
 - 6) Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of the Chinese medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 447(2):341-345 (2014).
 - 7) Kato N, Sejima H, Ueda Y, Mori K, Satoh S, Dansako H, Ikeda M. Genetic characterization of hepatitis C virus in long-term RNA replication using Li23 cell culture systems. *PLoS ONE*, 9(3): e91156 (2014).
 - 8) Okamoto M, Oshiumi H, Azuma M, Kato N, Matsumoto M, Seya T. IPS-1 is essential for type III interferon production by hepatocytes and dendritic cells in response to hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 192(6): 2770-2777 (2014).
2. 学会発表
- 1) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. C型肝炎ウイルスのライフサイクルにおけるRab13の重要性. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014年11月.
 - 2) 上田 優輝、金 惠淑、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、土居 弘幸、綿矢 有佑、加藤 宣之. 抗マラリア薬候補で強い抗HCV活性を示すN-251の臨床応用に向けた研究とDAAとの併用効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月.
 - 3) 松野 研司、上田 優輝、福田 美和、斧田 賢嗣、脇 稔、池田 正徳、加藤 宣之、宮地 弘幸. ヘキサフルオロイソプロピルベンズアミド誘導体による抗C型肝炎ウイルス (HCV) 活性. 第32回メディシナルケミストリーシンポジウム、神戸、2014年11月.
 - 4) 山本 樹、大橋 雅生、上田 優輝、松野 研司、加藤 宣之、宮地 弘幸. C型肝炎治療薬を指向した PPAR α / δ デュアルアンタゴニストの創製. 第32回メディシナルケミストリーシンポジウム、神戸、2014年11月.
 - 5) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. HCVライフサイクルにおける小胞輸送蛋白質Rab13の役割. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月.
 - 6) 上田 優輝、團迫 浩方、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之. 臨床応用に向けた抗マラリア薬候補N-251の抗HCV活性作用機序の解析. 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW)、神戸、2014年10月.
 - 7) 武田 緑、池田 正徳、佐藤 伸哉、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之. 小胞輸送蛋白質Rab13はHCV感染に必要な因子である. 第18回日本肝臓学会大会 (JDDW)、神戸、2014年10月.
 - 8) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Human hepatoma HuH-7 cell line-derived RSc cells show higher viral productivity in response to infection with HCV-JFH-1 than Huh7.5 cells. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014年9月.
 - 9) Ueda Y, Kim HS, Dansako H, Satoh S, Ikeda M, Doi H, Wataya Y, Kato N. Characterization of anti-HCV activity of N-251, a preclinical antimalarial drug, and its combination effect with DAA. 21th

International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014年9月.

- 10) Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates HCV RNA replication. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014年9月.
- 11) Ariumi Y, Kuroki M, Siddiqui R, Hijikata M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX21 RNA helicase restricts HCV infection. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014年9月.
- 12) Takeda M, Ikeda M, Satoh S, Dansako H, Wakita T, Kato N. Rab13 is an essential host factor for HCV entry. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff Canada, 2014年9月.
- 13) 桑代 卓也、岩崎 岩太、岩根 紳治、井手 康史、大塚 大河、江口 有一郎、水田 敏彦、池田 正徳、加藤 宣之、安西 慶三。細胞外マトリックスはインターフェロニンシグナルを抑制する。第50回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月。

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

多機能幹細胞を用いた自然免疫再構築による肝炎治療法の開発と臨床応用

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 教授

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 NK 細胞を大量に分化誘導可能な iPS 細胞株の樹立の検討を行った。ドキシサイクリンによって発現誘導可能なレンチウイルスベクターを用いて山中 4 因子と SV40 large-T 抗原をヒト正常線維芽細胞に導入した。ドキシサイクリン添加で iPS 細胞様コロニーの出現を認め、7 クロンの樹立に成功した。今後、これらクロンの未分化性及び分化多能性を調べるとともに、分化誘導した NK 細胞にドキシサイクリンを添加して山中 4 因子と SV40 large-T 抗原を発現させることにより、増殖能と NK 細胞の性質を兼ね備えた細胞が得られるかどうかを検討する。

A. 研究目的

ヒト iPS 細胞から NK 細胞を得るためには、iPS 細胞から CD34⁺細胞を、そして CD34⁺細胞から CD56⁺細胞を効率よく分化誘導する必要がある。これまでの検討から、iPS 細胞から CD34⁺細胞、及び CD34⁺細胞から NK 細胞への分化誘導効率はそれぞれ 3～10% と 10～20% と非常に低く、分化にともなう細胞分裂能の低下が原因であると考えられる。

本研究は、NK 細胞を大量に分化誘導可能な iPS 細胞株の樹立の検討を目的とし、多能性遺伝子と分裂能低下を抑制する遺伝子の発現誘導が NK 細胞の分化誘導に与える影響を検討する。

B. 研究方法

ドキシサイクリンによって発現の誘導が可能な山中 4 因子（多能性遺伝子）と、分裂能低下に働くがん抑制遺伝子の阻害する SV40 large-T 抗原をそれぞれ組み込んだレンチウイルスをヒト正常線維芽細胞に感染させ、ドキシサイクリン存在下で iPS 細胞の誘導を行った。

（倫理面への配慮）
該当なし

C. 研究結果

用いたレンチウイルスの感染効率が低いことから、濃縮したウイルス液を用いて 4 因子同時感染させたが、iPS 細胞のコロニーを得ることができなかった。次に、1 日おきに 1 因子ずつ 4 因子を感染させた場合、リプログラミングの初期に認められる細胞死が誘導されたが、iPS 細胞のコロニーを得るには至らなかった。そこで、4 因子に加えてリプログラミングを抑制する p53 の阻害因子である SV40 large-T 抗原を、1 因子ずつ感染させたところ、複数の iPS 細胞様のコロニーが出現した。ピックアップ法によりこれらのコロニーを個別に培養し、7 クロンを樹立することに成功した。

D. 考察

レンチウイルスを用いた iPS 細胞の誘導実験ではウイルスの感染効率を上げるために、ウイルス液の濃縮が必要であり、それでも iPS 細胞が得られない場合には、リプログラミング

グの阻害に働く p53 の抑制が効果的であった。

E. 結論

SV40 large-T 抗原の導入はリプログラミング効率を著しく上昇させ、ドキシサイクリン存在下でこの遺伝子が機能していることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, Mioka T, Kimura N, Okada M, Tahara H, Furukawa J, Fujitani N, Shinohara Y, Igarashi Y. A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid-beta peptide. *FEBS letters* 589, 84-88 (2015).
2. Shimamoto A, Yokote K, Tahara H. Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming. *Frontiers in genetics* 6, 10 (2015).
3. Yuyama K, Sun H, Sakai S, Mitsutake S, Okada M, Tahara H, Furukawa J, Fujitani N, Shinohara Y, Igarashi Y. Decreased amyloid-beta pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice. *J Biol Chem* 289, 24488-24498 (2014).
4. Yamasaki S, Taguchi Y, Shimamoto A, Mukasa H, Tahara H, Okamoto T. Generation of human induced pluripotent stem (Ips) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF- β 1 regulation of pluripotency. *PLoS One* 9, e87151 (2014).
5. Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, Yuasa S, Fukuda K, Hirashima K, Seimiya H, Koyama H, Shimizu T, Takemoto M, Yokote K, Goto M, Tahara H. Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. *PLoS One* 9, e112900 (2014).
6. Miyagi T, Shiotani B, Miyoshi R, Yamamoto T, Oka T, Umezawa K, Ochiya T, Takano M, Tahara H. DSE-FRET: A new anticancer drug screening assay for DNA binding proteins. *Cancer Sci* 105, 870-874 (2014).
7. Lötval J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of extracellular vesicles* 3, 26913 (2014).
8. Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, Go G, Nhung D, Hong K, Jang SC, Kim SH, Park KS, Kim OY, Park HT, Seo JH, Aikawa E, Baj-Krzyworzeka M, van Balkom BW, Belting M, Blanc L, Bond V, Bongiovanni A, Borràs FE, Buée L, Buzás EI, Cheng L, Clayton A, Cocucci E, Dela Cruz CS, Desiderio DM, Di Vizio D, Ekström K, Falcon-Perez JM, Gardiner C, Giebel B, Greening DW, Gross JC, Gupta D, Hendrix A, Hill AF, Hill MM, Nolte-t Hoen E, Hwang DW, Inal J, Jagannadham MV, Jayachandran M, Jee YK, Jørgensen M, Kim KP, Kim YK, Kislinger T, Lässer C, Lee DS, Lee H, van Leeuwen J, Lener T, Liu ML, Lötval J, Marcilla A, Mathivanan S, Möller A, Morhayim J, Mullier F, Nazarenko I, Nieuwland R, Nunes DN, Pang K, Park J, Patel T, Pocsfalvi G, Del Portillo H, Putz U, Ramirez MI, Rodrigues ML, Roh TY, Royo F, Sahoo S, Schifflers R, Sharma S, Siljander P, Simpson RJ, Soekmadji C, Stahl P, Stensballe A, Stepień E, Tahara H, Trummer A, Valadi H, Vella LJ, Wai SN, Witwer K, Yáñez-Mó M, Youn H, Zeidler R, Gho YS. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics* (2014).
9. Hosoi T, Inoue Y, Nakatsu K, Matsushima N, Kiyose N, Shimamoto A, Tahara H, Ozawa K. TERT attenuated ER stress-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 447, 378-382 (2014).
10. Hirokawa T, Shiotani B, Shimada M, Murata K, Johmura Y, Haruta M, Tahara H, Takeyama H, Nakanishi M. CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance of the DNA double-strand break-specific G2 checkpoint. *Cancer Res* 74, 3880-3889 (2014).
11. Hirashio S, Nakashima A, Doi S, Anno K, Aoki E, Shimamoto A, Yorioka N, Kohno N, Masaki T, Tahara H. Telomeric g-tail length and hospitalization for cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 9, 2117-2122 (2014).
12. Ao M, Miyauchi M, Inubushi T, Kitagawa M, Furusho H, Ando T, Ayuningtyas N, Nagasaki A, Ishihara K, Tahara H, Kozai K, Takata T. Infection with *Porphyromonas gingivalis* exacerbates endothelial injury in obese mice. *PLoS One* 9, e110519 (2014).

2. 学会発表
なし

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

『ミラノ基準外肝癌に対する肝移植の肝由来活性化NK細胞移入療法』 における抗肝癌・HCV効果のメカニズムの解明

研究分担者 渡辺信和 東京大学医科学研究所 臨床 FACS コアラボラトリー
特任准教授

研究要旨 生体肝移植患者では、ドナー肝臓に由来する免疫細胞が末梢血に検出される。比較的長期にわたり、有意な頻度のドナー由来細胞が検出される場合、拒絶反応は起こりにくいという報告がある。我々は、ミスマッチ HLA に対する抗 HLA 抗体とフローサイトメーターを使ったキメリズム解析／HLA-Flow 法で、生体肝移植後のキメリズムの遷延と拒絶反応の関係を検証した。その結果、Rejection が起こらなかった 5 症例（Day 20、Day 13、Day 20、Day 13、および Day 16）では、Rejection が起こった 3 症例（Day 3、Day 10、および Day 6）と比べて、比較的長い期間キメリズムが検出された。少数例の解析ではあるが、今回の解析でも Rejection が起こらない症例でキメリズムが長期間検出される傾向が見られた。その原因は未だ不明であるが、移植免疫寛容の視点から、そのメカニズムの解明が期待される。

A. 研究目的

生体肝移植患者では、ドナー肝臓に由来する免疫細胞が末梢血に検出される。比較的長期にわたり、有意な頻度のドナー由来細胞が検出される場合、拒絶反応は起こりにくいという報告がある。我々は、ミスマッチ HLA に対する抗 HLA 抗体とフローサイトメーターを使ったキメリズム解析／HLA-Flow 法で、生体肝移植後のキメリズムの遷延と拒絶反応の関係を検証した。

B. 研究方法

平成25年度にフローサイトメーターで測定した生体肝移植後の末梢血キメリズムのデータを、再度FlowJoソフトウェアで解析してドナー由来細胞の頻度を求めた。

（倫理面への配慮）

広島大学医学部消化器・移植外科学で研究計画書を作成し、同大学の倫理審査委員会に提出し、承認された。患者への研究計画の説明および同意の取得は広島大学で行なわれており、医科研では行なわなかった。検体の取り違いを避ける目的で、患者検体には患者名が記入されており、医科研でもそれらの情報

を報告書等で使用した。個人情報に記載されたデータは、研究室内のパスワードを設定したコンピュータと施錠したロッカーで厳密に保管し、個人情報の保護に留意した。

C. 研究結果

生体肝移植患者10名の末梢血をHLA-Flow法で解析し、Case 7とCase 10を除く8名でキメリズム解析が可能であった（Table 1）。Case 7では凍結検体を融解後の細胞数が少なく、解析できなかった。Case 10では抗HLA-A1抗体（One Lambda社、クローン：H0331）がレシピエント特異的なHLA-A*01:02を染色できなかったため、キメリズム解析ができなかった。

解析可能な8名の症例では、NK療法の有無に関わらず、全例で有意な頻度（全単核細胞中0.1%以上）のドナー由来細胞（マイクロキメリズム）が検出された（Table 1）。検出されたドナー由来細胞のフェノタイプは様々で、NK細胞がとくに高頻度検出されることはなかった。また、NK細胞療法を行なわなかった群と比較して、NK細胞療法を行った群でドナー由来NK細胞の頻度が高いことはなかつ

Table 1

Patient profile

Peripheral blood (frozen sample)

UPN	Sampling	Donor		Recipient	
		HLA-A	HLA-B	HLA-A	HLA-B
NK therapy (+)					
Case 1	Day 20	24:03/33:03	03:02/07:02	02:07/33:03	46:01/58:01
Case 2	Day 3, 16	24:02/24:02	15:07/40:02	24:02/02:01	15:07/35:01
Case 3	Day 6, 13, 20, 24; Donor	11:01/31:01	40:01/48:01	31:01/33:03	40:01/44:03
Case 4	Day 6, 13, 20; Donor	31:01/31:01	07:02/35:01	24:02/31:01	07:02/54:01
Case 5	Day 1, 13, 20, 27; Donor	02:07/24:02	46:01/54:01	24:02/33:03	44:03/54:01
Case 6	Day 10, 13, 20, 27; Donor	11:01/31:01	15:01/55:02	24:02/26:03	15:01/46:01
Case 7	Day 3, 6, 27; Donor	02:01/26:01	15:11/56:01	02:01/26:01	15:11/52:01
NK therapy (-)/Negative controls					
Case 8	Day 3, 6, 13, 21, 27; Donor	02:06/02:01	13:01/48:01	02:06/24:02	40:06/48:01
Case 9	Day 3, 6, 13, 16, 27; Donor	31:01/33:03	44:03/51:01	24:02/31:01	51:01/52:01
Case 10	Day 3, 6, 13, 20, 27; Donor Anti- HLA-A1 antibody (clone: H0331) does not stain HLA-A*01:02-positive cells.	11:01/24:02	07:02/40:01	11:01/01:02	07:02/40:01

Table 2

Relationship between chimerism duration and incidence of rejection

Peripheral blood (frozen sample)

UPN	Sampling	MLR		Steroid Pulse
		Day 7	Day 14	
NK therapy (+)				
Case 1	Day 20			
Case 2	Day 3, 16	Rejection		+
Case 3	Day 6, 13, 20, 24; Donor			
Case 4	Day 6, 13, 20; Donor			
Case 5	Day 1, 13, 20, 27; Donor			
Case 6	Day 10, 13, 20, 27; Donor	Rejection		+
Case 7	Day 3, 6, 27; Donor			
NK therapy (-)/Negative controls				
Case 8	Day 3, 6, 13, 21, 27; Donor	Rejection	Rejection	-
Case 9	Day 3, 6, 13, 16, 27; Donor			
Case 10	Day 3, 6, 13, 20, 27; Donor Anti- HLA-A1 antibody (clone: H0331) does not stain HLA-A*01:02-positive cells.			

た。さらに、ドナー由来のNK細胞が検出された症例では細胞表面のTRAIL分子の発現レベルを解析したが、アイソタイプコントロールと比べてTRAILは発現していなかった (Table 1)。

Day7かDay 14のいずれかでRejectionと判断されたCase 2、Case6、およびCase 8では、キメリズムが検出された最終日がそれぞれDay3、Day 10、およびDay 6であった。Rejectionが起こらなかったCase 1、Case3、Case4、Case 5、およびCase 9では、キメリズムが検出された最終日がそれぞれDay 20、Day 13、Day 20、Day 13、およびDay 16であった (Table 2)。

D. 考察

Rejectionが起こらなかった5症例 (Day 20、Day 13、Day 20、Day 13、およびDay 16) では、Rejectionが起こった3症例 (Day3、Day 10、およびDay 6) と比べて、比較的長い期間キメリズムが検出された。

E. 結論

少数例の解析ではあるが、今回の解析でもRejectionが起こらない症例でキメリズムが長期間検出される傾向が見られた。その原因は未だ不明であるが、移植免疫寛容の視点から、そのメカニズムの解明が期待される。

F. 健康危険情報

なし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

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。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fudaba Y, Oshita A, Tashiro H, <u>Ohdan H.</u>	Intrahepatic triglyceride measurement and estimation of viability in rat fatty livers by near-infrared spectroscopy.	Hepatol Res.	45(4)	470-479	2015
Kuroda S, Tashiro H, Kimura Y, Hirata K, Tsutada M, Mikuriya Y, Kobayashi T, Amano H, <u>Tanaka Y, Ohdan H.</u>	Rho-kinase inhibitor targeting liver prevents ischemic reperfusion injury in steatotic liver without major systemic adverse in rat.	Liver Transpl.	21(1)	123-131	2015
Mikuriya Y, Tashiro H, Kuroda S, Nambu J, Kobayashi T, Amano H, <u>Tanaka Y, Ohdan H.</u>	Fatty liver creates a pro-metastatic microenvironment for hepatocellular carcinoma through activation of hepatic stellate cells.	Int J Cancer.	136(4)	E3-13	2015
Tanimine N, <u>Ohdan H.</u>	Impact of multiplicity of functional KIR-HLA compound genotypes on hepatocellular carcinoma.	Oncoimmunology.	4(1)	e983765.	2015
Abe T, <u>Onoe T</u> , Tahara H, Tashiro H, Ishiyama K, Ide K, Ohira M, <u>Ohdan H.</u>	Risk factors for development of new-onset diabetes mellitus and progressive impairment of glucose metabolism after living-donor liver transplantation.	Transplant Proc.	46(3)	865-869	2014
Dang VT, Tanabe K, <u>Tanaka Y</u> , Tokumoto N, Misumi T, Saeki Y, Fujikuni N, <u>Ohdan H.</u>	Fasting enhances TRAIL-mediated liver natural killer cell activity via HSP70 upregulation.	PLoS One.	9(10)	e110748	2014
Morimoto H, Ide K, <u>Tanaka Y</u> , Ishiyama K, Ohira M, Tahara H, Teraoka Y, Yamashita M, Abe T, Hashimoto S, Hirata F, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Sakai H, Yano T, Tashiro H, <u>Ohdan H.</u>	Bile CXC motif chemokine 10 levels correlate with anti-donor cytotoxic T cell responses after liver transplantation.	Transplant Proc.	46(3)	790-793	2014
Morimoto H, Ishiyama K, Ishifuro M, Ohira M, Ide K, <u>Tanaka Y</u> , Tahara H, Teraoka Y, Yamashita M, Abe T, Hashimoto S, Hirata F, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Sakai H, Yano T, Tashiro H, <u>Ohdan H.</u>	Clinical efficacy of simultaneous splenectomy in liver transplant recipients with hepatitis C virus.	Transplant Proc.	46(3)	770-773	2014

Sakai H, Ishiyama K, <u>Tanaka Y</u> , Ide K, Ohira M, Tahara H, Abe T, Hirata F, Morimoto H, Hashimoto S, Tanimine N, Saeki Y, Shimizu S, Yano T, Kobayashi T, Tashiro H, <u>Ohdan H</u> .	Potential benefit of mixed lymphocyte reaction assay-based immune monitoring after living donor liver transplantation for recipients with autoimmune hepatitis.	Transplant Proc.	46(3)	785-789	2014
Shimizu S, Onoe T, Ishiyama K, Ide K, Ohira M, Tahara H, Saeki Y, Kobayashi T, Kuroda S, Tashiro H, <u>Ohdan H</u> .	Multiple hepatic vein reconstruction using an all-in-one sleeve patch graft technique in living donor liver transplantation: a case report.	Transplant Proc.	46(3)	982-985.	2014
Tanimine N, <u>Tanaka Y</u> , Kobayashi T, Tashiro H, Miki D, Imamura M, Aikata H, Tanaka J, Chayama K, <u>Ohdan H</u> .	Quantitative effect of natural killer cell licensing on hepatocellular carcinoma recurrence after curative hepatectomy.	Cancer Immunol Res.	2(12)	1142-1147	2014
Shimamoto A, Yokote K, <u>Tahara H</u> .	Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming.	Front Genet	6		2015
Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, Mioka T, Kimura N, Okada M, <u>Tahara H</u> , Furukawa J, Fujitani N, Shinohara Y, Igarashi Y.	A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid- β peptide.	FEBS Lett.	589	84-88	2015
Ao M, Miyauchi M, Inubushi T, Kitagawa M, Furusho H, Ando T, Ayuningtyas N,F, Nagasaki A, Ishihara K, <u>Tahara H</u> , Kozai K, Takata T.	Infection with Porphyromonas gingivalis exacerbates endothelial injury in obese mice.	PLoS One	9	e110519	2014
Hirashio S, Nakashima A, Doi S, Anno K, Aoki E, Shimamoto A, Yorioka N, Kohno N, Masaki T, <u>Tahara H</u> .	Telomeric g-tail length and hospitalization for cardiovascular events in hemodialysis patients.	Clin J Am Soc Nephrol.	9	2117-2122	2014
Hirokawa T, Shiotani B, Shimada M, Murata K, Johmura Y, Haruta M, <u>Tahara H</u> , Takeyama H, Nakanishi M.	CBP-93872 inhibits NBS1-mediated ATR activation, abrogating maintenance of the DNA double-strand break-specific G2 checkpoint.	Cancer Res	74	3880-3889	2014

Hosoi T, Inoue Y, Nakatsu K, Matsushima N, Kiyose N, Shimamoto A, <u>Tahara H</u> , Ozawa K.	TERT attenuated ER stress-induced cell death.	Biochem Biophys Res Commun.	447	378-382	2014
Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, Go G, Nhung D, Hong K, Jang SC, Kim SH, Park KS, Kim OY, Park HT, Seo JH, Aikawa E, Baj-Krzyworzeka M, van Balkom BW, Belting M, Blanc L, Bond V, Bongiovanni A, Borràs FE, Buée L, Buzás EI, Cheng L, Clayton A, Cocucci E, Dela Cruz CS, Desiderio DM, Di Vizio D, Ekström K, Falcon-Perez JM, Gardiner C, Giebel B, Greening DW, Gross JC, Gupta D, Hendrix A, Hill AF, Hill MM, Nolte-t Hoen E, Hwang DW, Inal J, Jagannadham MV, Jayachandran M, Jee YK, Jørgensen M, Kim KP, Kim YK, Kislinger T, Lässer C, Lee DS, Lee H, van Leeuwen J, Lener T, Liu ML, Lötvall J, Marcilla A, Mathivanan S, Möller A, Morhayim J, Mullier F, Nazarenko I, Nieuwland R, Nunes DN, Pang K, Park J, Patel T, Pocsfalvi G, Del Portillo H, Putz U, Ramirez MI, Rodrigues ML, Roh TY, Royo F, Sahoo S, Schiffelers R, Sharma S, Siljander P, Simpson RJ, Soekmadji C, Stahl P, Stensballe A, Stepień E, <u>Tahara H</u> , Trummer A, Valadi H, Vella LJ, Wai SN, Witwer K, Yáñez-Mó M, Youn H, Zeidler R, Gho YS.	EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research.	Bioinformatics			2014
Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, <u>Tahara H</u> , Wauben MH, Witwer KW, Théry C.	Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles.	J Extracell Vesicles.	3	26913.	2014