

ツパイ高感染性HBVの馴化・選択

研究分担者 村上周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任助教

研究要旨：ツパイによる新規 B 型肝炎ウイルス（HBV）感染モデル動物の確立を目的として、HBV 高感染株および感染評価系の検討を行っている。超高感度 HBs 抗原測定系を用いてツパイのHBV感染評価系を検討した。また、ヒト HBV の遺伝子型 A、B、C、D について、1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株に対する薬剤耐性変異株を作製し、HuH7 細胞へのトランスフェクションにより感染ウイルス粒子を得た。さらに、ウイルス粒子を含む培養上清をヒト肝細胞キメラマウスに接種し、感染と変異部位が確認できたマウスより血清を回収し、ツパイへの感染源として準備した。

共同研究者

田中靖人

名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス（HBV）には、A-J までの遺伝子型が特定されており、それぞれの臨床病態は異なる。HBV の病態を解析し、新規治療薬を開発するためには、HBV 各遺伝子型を感染させた肝炎モデル動物による長期的かつ詳細な解析が必須である。

前年度までの研究により、ヒト HBV が感染したヒト肝細胞置換キメラマウスの血清を感染源として、ツパイへの HBV 感染に成功している。さらに持続感染する HBV 株やヒト HBV に感染しやすいツパイの系統が絞り込まれつつある。また、感染評価系として、最近開発された高感度および、超高感度 HBs 抗原測定系を用いてツパイ

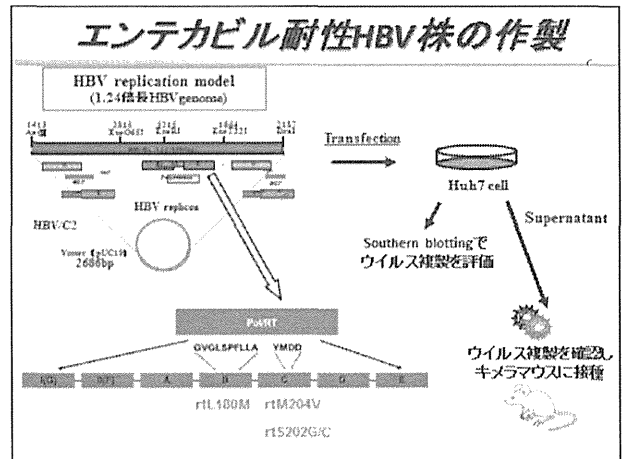
の微量検体から HBs 抗原を検出することを確認した。今年度は引き続き超高感度 HBs 抗原測定系を用いて感染評価系を検討した。

また、HBV 治療において薬剤耐性変異ウイルスを克服することは避けることのできない重要課題である。そこで、ツパイへの HBV 感染源として薬剤耐性変異 HBV 株の作製を行った。

B. 研究方法

- 1) ツパイに HBV を接種後、HBV-DNA を検出した血清サンプルについて、希釈により必要量の液量に調整し超高感度 HBs 抗原測定系（ICT-CLEIA（シスメックス）；Takeda et al, J Clin Microbiol. 2013）を用いて HBs 抗原を測定した。
- 2) 1.24 倍長 HBV 複製モデルの野生株 genotype Ae、Bj、Ce、D について、薬剤

耐性変異株（エンテカビル耐性、ラミブジン耐性、アデホビル耐性、ラミブジン+アデホビル耐性）を作製し、Huh7 細胞へトランスフェクトしてウイルス粒子を含む培養上清を得るとともに、細胞内のウイルス複製を Southern blotting で確認した。また、培養上清中のウイルス粒子を限外ろ過により濃縮し、ヒト肝細胞キメラマウスに接種し、約 8 週後に感染を確認した。



（倫理面への配慮）

遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

- 1) HBV-DNA を確認したツパイ血清を超高感度 HBs 抗原測定系を用いて検討した結果、5 倍希釈で液量を調整することにより HBs 抗原を検出することができた。
- 2) 作製した HBV 薬剤耐性変異株について、細胞内のウイルス複製を確認した。また、genotype Ae、Bj、Ce のエンテカビル耐性変異ウイルスをキメラマウスに接種後、約 8 週よりウイルスタイトーの上昇を確認した。さらに血清中のウイルス DNA をシーケンス解析することにより薬剤耐性変異を確認し、感染源として血清を回収した。

D. 考察

超高感度 HBs 抗原測定系を用いたツパイ血清の測定は、前年度までの検討では 2-3 倍希釈での検出であったが、今年度の検討では 5 倍希釈で検出することに成功した。測定系の改良だけではなく、ツパイ自体の HBV 感染感受性も上がっていることが考えられる。

ツパイのように正常な免疫機能が備わった肝炎ウイルスが感染できるモデル動物は、これまで望まれていた試験モデルである。一方、獲得免疫系を持たない uPA/SCID マウスをベースとするヒト肝細胞キメラマウスに HBV を感染させ作製した感染源は、HBV に対する抗体を持たないため感染性が高く有用である。各 genotype で作製している核酸アナログ耐性 HBV クローンは、培養上清から動物へ直接接種して感染を成立させることが難しく、特に薬剤耐性ウイルスは、野生株が存在しないクローン化された変異ウイルスのみでは感染性が低い。そのため、まず易感染性が高いキメラマウスに接種して感染源を作製することは、ウイルスを増殖することに加えて感染性を高めることにも有効である。これらの感染源

を感染感受性の高いツパイに接種し感染させることにより、生体内で実際に起こっている事象を免疫反応も含めて再現でき、病態解明に繋がるのが期待できる。

E. 結論

HBV 感染ツパイ血清の感染評価系として HBs 抗原の超高感度測定系は有効である。

HBV 薬剤耐性変異クローンを作製し、各種変異体ウイルスを得た。また、キメラマウスへの感染により、薬剤耐性変異株のみを血清に含む感染源を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 日下部篤宣, 田中靖人, 飯尾悦子, 村上周子, 松浦健太郎, 新海登, 宮木知克, 藤原圭, 野尻俊輔, 折戸悦朗, 城卓志. B 型・D 型肝炎ウイルス重複感染による肝障害に対してペグインターフェロンが有効であった1例. 肝臓. 2014; 55(11): 653-660.
- 2) Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S (equal contribution), Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, Tanaka Y. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. PLoS ONE. 2015; 10(2): e0118062.
- 3) Totani H, Kusumoto S, Ishida T, Masuda A, Yoshida T, Ito A, Ri M,

Komatsu H, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Niimi A, Inagaki H, Tanaka Y, Iida S. Reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in adult T-cell leukemia-lymphoma patients with resolved HBV infection following systemic chemotherapy. Int J Hematol. 2015 in press.

2. 学会発表

- 1) 堤進, 渡邊綱正, 村上周子, 飯島沙幸, 飯尾悦子, 松波加代子, 新海登, 松浦健太郎, 五十川正記, 田中靖人. 大量調整可能なヒト肝細胞を用いたHBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性. 第50回日本肝臓学会総会. 平成26年5月29日~30日. 東京.
- 2) Hayashi S, Khan A, Simons B, Jones C, Homan C, McMahon B, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Carcinogenic potential of hepatitis B virus genotype F is associated with accumulation of novel core mutations. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep. 3-6, 2014. Los Angeles.
- 3) 林佐奈衣, 五十川正記, 村上周子, 飯島沙幸, 堤進, 尾曲克己, 渡邊綱正, 田中靖人. B 型肝炎ウイルスGenotype F における肝細胞癌関連因子の検討. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10日~12日. 横浜.
- 4) Sayeh Ezzikouri, 池海英, 真田崇弘, 永野希織, 山口千穂, 神田雄大, 金沢伯

弘, 奥谷公亮, 上野晃聖, 中川寛子,
Chimene Nze NKOGUE, 三好宣彰, 小澤真,
Soumaya Benjelloum, 村上周子, 田中
靖人, 小原道法, 小原恭子.
Development of Tupaia belangeri for
HBV persistent infection. 第62回日本
ウイルス学会学術集会. 平成26年11月10
日~12日. 横浜.

なし

5) Inoue T, Ohne K, Ochi N, Shinkai N,
Murakami S, Iijima S, Ogawa S,
Watanabe T, Tanaka Y. A Newly
Developed High-Sensitive HBsAg
Chemiluminescent Enzyme Immunoassay
is a Precise Application as a pre-
Transfusion Screening Test to Detect
Occult HBV. The 65th Annual Meeting
of the American Association for the
Study of Liver Diseases. Nov. 7-11,
2014. Boston.

6) Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones
CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami
S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T,
Tanaka Y. Association between
hepatocellular carcinoma and
accumulation of novel core mutations
in hepatitis B virus genotype F. The
11th JSH Single Topic Conference.
Nov. 20-21, 2014. Hiroshima.

G. 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

肝細胞を標的とした薬物送達システムの開発

研究分担者 櫻井 遊 北海道大学 大学院薬学研究院 特任助教

研究協力者 佐藤 悠介 北海道大学 大学院薬学研究院 特任助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は、難治性の肝疾患を引き起こす病原体として世界中で問題となっているものの、有効な治療法は未だに開発されていない。Short interfering RNA (siRNA) は、HBV感染に関わる宿主遺伝子やHBV mRNAを直接的に阻害することが可能であるため、有用な新規HBV治療薬としても期待される。しかし、siRNAをHBVの感染細胞である肝実質細胞へ導入するためには、効率的な薬物送達システム（DDS）の開発が極めて重要である。筆者はpH応答性カチオン性を示す脂質ナノ粒子によってsiRNAを肝実質細胞へ効率的に送達することで、モデル動物におけるC型肝炎ウイルス治療に成功している。既存の技術よりもさらに優れたsiRNA導入活性および高い安全性を両立したsiRNA DDSが開発されれば、有用な新規HBV治療薬としての貢献が期待される。本事業では、HBV感染実験モデルとして高い可能性を有するツパイにおいても高いsiRNA導入活性および安全性を両立する高性能DDSの開発と、その前臨床試験への応用を最終目的としている。

平成26年度には、新規pH応答性カチオン性脂質の開発および脂質ナノ粒子の組成最適化を行い、脂質ナノ粒子の肝実質細胞へのsiRNA導入活性の更なる向上を図った。その結果、以前に開発した脂質ナノ粒子と比較して活性を約10倍向上させることに成功した。また、今回新たに開発した脂質ナノ粒子は肝実質細胞に高い選択性を有することが明らかとなった。さらに、肝実質細胞への効率的なsiRNA導入に重要な脂質ナノ粒子の物性（粒子径、脂質膜の酸乖離定数 (pKa) およびlipid / siRNA電荷比）の最適範囲の同定を行った。

A. 研究目的

HBV持続感染者は世界で約4億人存在すると推定されており、本邦におけるHBV感染率は1%に上る。感染後にウイルスの活動性が持続すると慢性肝炎から肝硬変、肝細胞がん、肝不全へと進展する。現在、B型肝炎治療にはペグ（PEG）化インターフェロン（IFN）および核酸アナロ

グ型ウイルス逆転写酵素阻害剤が用いられている。PEG化IFNは免疫賦活作用や高ウイルス作用を有し、セロコンバージョン例では高効率で効果が持続するものの、高頻度かつ重篤な副作用によるQOLの低下ややむを得ない治療の中断が深刻な問題となっている。また、エンテカビルや昨年本国でも承認されたテノホビル

に代表される核酸アナログはウイルスの複製阻害によりHBV DNA量を効率的に減少させるものの、HBV抗原の産生は抑制することができない。また、その薬効は投与の中断によって速やかに消失し、高頻度で肝炎が再燃してしまう。このような問題点から、従来とは異なるメカニズムの新規治療法の開発が強く望まれている。

siRNAはRNA干渉により標的遺伝子がコードするタンパク質の合成を塩基配列特異的かつ強力に抑制する機能性核酸である。迅速かつフレキシブルに分子設計することが可能であることから、変異によるウイルスの薬剤耐性化を比較的容易に克服可能であることが期待されており、新規B型肝炎治療薬としての可能性も大いに期待されている。しかしながら、siRNAは親水性高分子化合物であるため、それ単独では細胞膜を透過することができない。また、循環血中に入ったsiRNAはヌクレアーゼによる分解や、腎排泄によるクリアランスを受ける。そのため、siRNAによる新規B型肝炎治療薬を実現する上で、siRNAをHBV感染細胞である肝実質細胞の細胞質へ効率的に送達可能なキャリア開発は極めて重要な要素である。

これまでに、siRNA ベクターとして short hairpin RNA を発現するウイルスベクターの開発が試みられているが、これらは安全面に大きな問題がある。また、実用化の際の大量製造が困難であるという問題もある。そのため、我々は、siRNA を肝実質細胞へ効率的に送達可能

な脂質ナノ粒子の開発を行っている。また、siRNA の細胞質送達効率に優れる pH 応答性カチオン性脂質 YSK05 を開発することで、HCV 持続感染マウスモデルにおける高い HCV 抑制効果を得ることに成功している (Sato Y *et al.*, *J Control Release*, 2012、Watanabe T *et al.*, *Sci Rep*, 2014、特開 2013-245190)。本システムを臨床に応用することが可能となれば、その応用性は HBV 治療に限定されず、既知の遺伝子変異に起因する多様な遺伝性疾患に適用可能であり、従来 of 低分子薬物では対応することが困難であった多くのアンメットメディカルニーズに対する革新的治療薬に繋がり得ると考えられる。

以上より、本研究事業の平成 26 年度には、新規 pH 応答性カチオン性脂質の開発および脂質ナノ粒子の構成因子の組成最適化を行うことで、脂質ナノ粒子の肝実質細胞への siRNA 導入活性の更なる向上を図った。また、粒子サイズや pKa、および siRNA/脂質比等、本システムの物理化学的・製剤的特性が肝実質細胞への siRNA 送達効率に与える影響を検討した。

B. 研究方法

① 新規 pH 応答性カチオン性脂質の開発と物理化学的性質の評価

脂質ナノ粒子はエンドサイトーシス経路によって標的細胞へ侵入するため、siRNA を細胞質に送達するためにはエンドソームから脱出することが必須であり、本過程が人工ベクターにとって最大の障壁の一つとなっている。本過程は脂質ナノ粒

子とエンドソーム膜との膜融合を介して達成されるため、膜融合性に優れた脂質の開発は、siRNA 導入活性を向上する上で有用な戦略であると考えられる。そこで、嵩高い疎水性部位と小さな親水性部位により全体として円錐型をとり、脂質二重膜構造を不安定化して膜融合を促進することが期待される新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK13 (Fig. 1) をデザインした。YSK13 の親水部の炭化水素鎖長は炭素数 2 から 4 ($n = 2 - 4$) であり、例として $n = 3$ の場合、YSK13-C3 と呼称した。

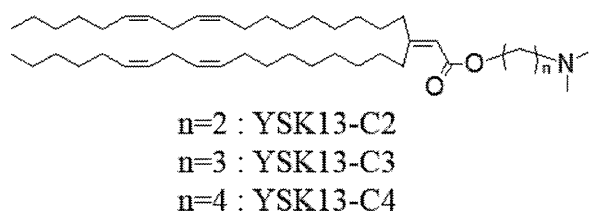


Fig. 1 新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK13 の化学構造。

YSK13 はリノール酸を出発原料とし、以下の計 8 段階の反応を経て合成した (Fig. 2)。すなわち、①カルボニル炭素の水素化リチウムアルミニウム還元による水酸基への変換、②水酸基のメシル化による活性化、③求核置換反応による臭素化、④ギ酸エチルを基質とした Grignard 反応による 2 本の炭化水素鎖の連結、⑤クロロクロム酸ピリジニウムによる第 2 級水酸基の酸化、⑥Horner-Emmons 反応による α,β 不飽和エステルの形成、⑦トリフルオロ酢酸加水分解、⑧エステル形成である。各反応の進行は薄層クロマトグラフィー (TLC) により行い、254 nm における吸光、

ヨウ素蒸気、リンモリブデン酸あるいはアニスアルデヒドにより検出した。各反応の後には分液操作により反応剤の除去を行い、⑦以外の反応後はさらに中圧分取液体クロマトグラフ (TELEDYNE ISCO 社) および順相カラム (TELEDYNE ISCO 社) を用いて目的物の精製を行った。精製後にプロトン核磁気共鳴 (^1H NMR) 法によって目的物の同定を行った。最終的に得られた YSK13 に関しては、さらにエレクトロスプレーイオン化質量分析法によって分子量情報からも目的物の同定を行った。

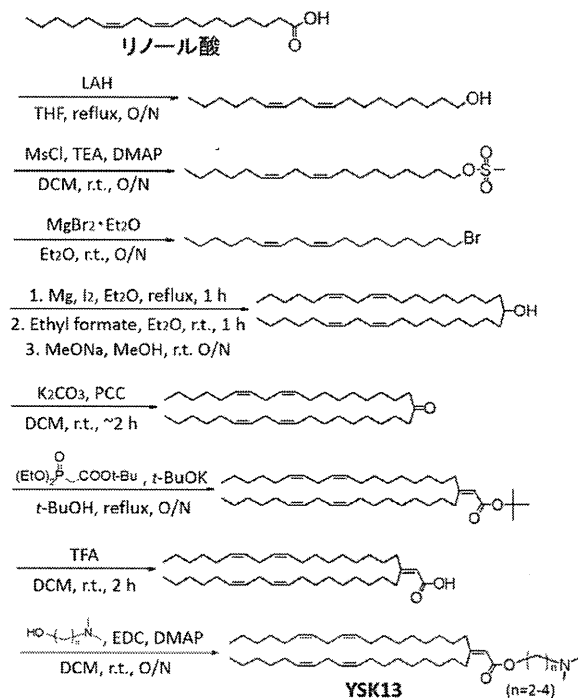


Fig. 2 YSK13 の合成反応経路。

得られた YSK13 の膜融合活性は、 ^{31}P NMR 法により評価した。その際、比較対象として膜融合活性の低い市販の pH 応答性カチオン性脂質 2,3-dioleoyl-N,N-dimethylaminopropane (DODAP) と、以前に筆者の研究室にて開発された pH 応答

性カチオン性脂質 1-methyl-4,4-bis(((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dien-1-yl)oxy)piperidine (YSK05) を用いた。各 pH 応答性カチオン性脂質、中性リン脂質である 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC)、負電荷リン脂質である 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylserine (DSPS) をガラス試験管内で 8 μmol ずつ等量混合し、クロロホルム 400 μL に溶解した後、減圧下で有機溶媒を留去することで、脂質薄膜を得た。10 mM クエン酸緩衝液 (pH4.0) 500 μL を加え、60°C で水和させた後、バス型ソニケーターを用いて超音波処理することで脂質を分散させた。得られた脂質懸濁液を NMR 管へ移し、核磁気共鳴装置 (ECX 400P または ECA 500、日本電子株式会社) により、各設定温度 (21 - 45°C) におけるプロトンデカップリング ^{31}P NMR スペクトルを得た。得られたデータは Delta NMR software v5.0.2 (日本電子株式会社) を用いて解析した。懸濁液中のリン脂質が脂質二重膜構造 (ラメラ相) をとる場合には右肩上がりのブロードなピークを、脂質の親水部位を内側に向けた構造 (逆ヘキサゴナル相) をとる場合には左肩上がりのブロードなピークをそれぞれ示す。本評価系では、逆ヘキサゴナル相由来のピークを示す温度が低い程、膜融合活性に優れる pH 応答性カチオン性脂質であると判断した。

YSK13 を含む脂質ナノ粒子は *tert*-ブタノール (*t*-BuOH) インジェクション法により調製した。90%*t*-BuOH に溶解した pH 応答性カチオン性脂質 (YSK05、YSK13)、コレステロール (chol)、PEG-

脂質誘導体 (PEG-lipid) を 50 - 70 : 30 - 50 : 0.5 - 3 のモル比となるように混合し、全量を 400 μL とした後、任意の量の siRNA を含む水 200 μL を混合した。続いて、その脂質溶液を、20 mM クエン酸緩衝液 (pH4.0) 2 mL を攪拌しているところに注入することで *t*-BuOH 濃度を急激に低下させ、ナノ粒子を形成させた。最後に、遠心式限外濾過フィルターユニット (Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit、ミリポア社) を用いて 2 回精製することで *t*-BuOH の除去、リン酸緩衝液への置換、脂質ナノ粒子の濃縮を行った。得られた脂質ナノ粒子の粒子径およびゼータ電位は Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Marvern 社) を用いて測定した。

YSK05 あるいは各 YSK13 を含む脂質ナノ粒子の脂質膜 pKa は、正に荷電した脂質膜と相互作用することで強い蛍光を発する性質を有する蛍光物質である 6-(*p*-toluidino)-2-naphthalenesulfonic acid (TNS) を用いて測定した。20 mM クエン酸緩衝液、20 mM リン酸緩衝液、20 mM Tris-HCl 緩衝液に、終濃度で 130 mM となるように NaCl を添加した水溶液 (pH3.5 - 9.5) に、脂質ナノ粒子、TNS をそれぞれ終濃度 30 μM 、6 μM となるように 96-well fluoronunc plate (Nunc) 上で混合した。マルチウェルプレートリーダー (Varioskan Flash、Thermo scientific 社) を用いて蛍光強度を測定した。

② 脂質ナノ粒子の物理化学的性質・製剤的性質が肝実質細胞への siRNA 導入効率に与える影響の検討

YSK05 あるいは YSK13 を含む脂質ナノ粒子の各組織（肝臓、肺、脾臓）への移行量の測定は下記の手順で行った。DiD あるいは Cy5 で脂質膜、siRNA をそれぞれ蛍光標識された脂質ナノ粒子を ICR マウス（4 週齢）に 0.5 mg siRNA/kg weight で静脈内投与した。その 30 分後に各組織を回収してホモジネート溶液を調製し、溶液中の DiD あるいは Cy5 由来の蛍光強度を蛍光プレートリーダー（Varioskan Flash、Thermo scientific 社）を用いて測定した。

siRNA の肝臓内局在観察は下記の手順で行った。Cy5 標識 siRNA を搭載した脂質ナノ粒子を ICR マウス（4 週齢）に 1.0 mg siRNA/kg weight で静脈内投与した。30 分後に肝臓を回収し、Hoechst33342 で核を染色した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡（Nikon A1R）を用いて観察した。また、血管の造影にはフルオレセインで蛍光標識化された *Griffonia simplicifolia* 由来の isolectin B4 40 μ g を肝臓回収の 5 分前に静脈内より投与することで行った。

肝実質細胞における遺伝子ノックダウン効率の測定は下記の手順で行った。血液凝固第 VII 因子（FVII）を標的とした siRNA（siFVII）を搭載した脂質ナノ粒子を ICR マウス（4 週齢）に 0.003 - 0.3 mg siRNA/kg weight で静脈内投与し、24 あるいは 48 時間後に血液を採取し、ヘパリン処理後に血漿を得た。血漿中の FVII 酵素活性は Biophen FVII kit（Hypen BioMed 社）を用いて呈色反応した後、吸光度計（DU-630、Beckmann Coulter 社）あるいはマルチウェルプレートリーダー

（Varioskan Flash、Beckmann Coulter 社）を用いて吸光度を測定した。

血管内皮細胞における遺伝子ノックダウン効率の測定は下記の手順で行った。血管内皮細胞マーカーである CD31 を標的とした siRNA（siCD31）を搭載した脂質ナノ粒子を ICR マウス（4 週齢）に 0.3 - 1 mg siRNA/kg weight で静脈内投与し、24 時間後に肝臓を回収した。Trizol（Life Technologies 社）を用いて total RNA を抽出した後、High Capacity RNA-to-cDNA Kit（Applied Biosystems 社）を用いて cDNA を調製した。Fast SYBR Green Master Mix（Applied Biosystems 社）および Lightcycler 480 II（Roche 社）を用いて定量的 PCR を行い、CD31 の GAPDH に対する相対定量を行った。内皮リパーゼ（EL）およびリポプロテインリパーゼ（LPL）の阻害剤である GSK264220A（Tocris Bioscience 社）および LPL 阻害剤である orlistat（Cayman Chemical 社）はそれぞれ 30 mg/kg weight で脂質ナノ粒子の投与直前に腹腔内より投与した。

なお、本研究事業は動物実験を実施するため、北海道大学が定める「動物実験に関する規定」に基づく承認を取得済みであり、必要最低限の個体数の設定など、動物愛護上の配慮をした上で遂行した。

C. 研究結果

① 新規 pH 応答性カチオン性脂質の開発と物理化学的性質の評価

pH 応答性カチオン性脂質 YSK13 は全て室温で薄黄色オイル状物質として得られ、

出発物質であるリノール酸からの収率はおよそ 15%であった。

各 pH 応答性カチオン性脂質 (DODAP、YSK05、YSK13) と、POPC、DSPS を等量混合することで調製した脂質懸濁液の各温度における ^{31}P NMR スペクトルを測定した。その結果、既存の pH 応答性カチオン性脂質である DODAP は 35°C から 40°C にかけて、矢印で示した逆ヘキサゴナル由来のピークを示した (Fig. 3)。すなわち、本実験系における DODAP の相転移温度は 35 から 40°C であった。同様に、以前に開発した YSK05 は 21 から 25°C の相転移温度を示した。さらに、3 種の YSK13 はいずれも 21°C で明瞭な逆ヘキサゴナル用を示した。以上より、膜融合活性の序列は YSK13 > YSK05 > DODAP であり、YSK13 は優れた膜融合活性を有することが示された。

各 YSK13 を含む脂質ナノ粒子の平均粒子径は 50 - 80 nm、ゼータ電位は -5 - 5 mV の中性付近の値を示した。

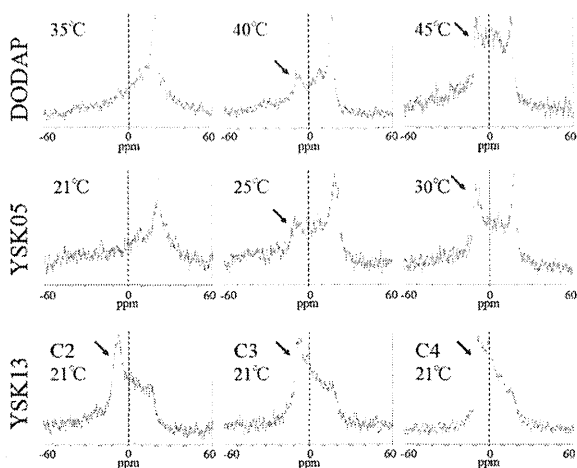


Fig. 3 各 pH 応答性カチオン性脂質を含む脂質懸濁液の各温度における ^{31}P NMR スペクトル。

YSK05 あるいは各 YSK13 を含む脂質ナノ粒子の各 pH における脂質荷電率を、TNS を用いて測定した。その結果、YSK05、YSK13-C2、YSK13-C3、YSK13-C4 はそれぞれ pKa 6.40、5.70、6.45、6.80 を示した (Fig. 4)。

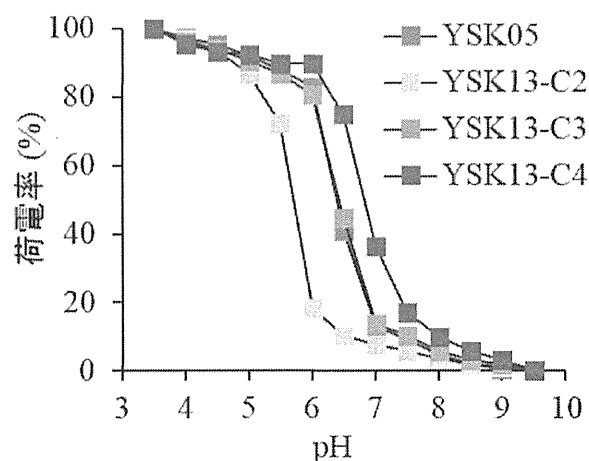


Fig. 4 各 pH 応答性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子の pH 変化による脂質荷電率推移。

② 脂質ナノ粒子の物理化学的性質・製剤的性質が肝実質細胞への siRNA 導入効率に与える影響の検討

蛍光標識した各脂質ナノ粒子の各組織への移行量を測定した。その結果、いずれの脂質ナノ粒子も投与した大部分は肝臓へ移行し、顕著な差は認められなかった (Fig. 5)。また、脾臓は肝臓に次いで移行量が多く、その量は脂質膜 pKa の上昇に伴って増加した。肺への移行はほとんど認められなかった。

各脂質ナノ粒子の肝臓内局在を観察した。その結果、pKa の低い YSK13-C2 は肝実質細胞が存在する血管外に局在した (Fig.

6)。また、互いに同等の pKa を示す YSK05 と YSK13-C3 は血管外および血管上の両方に分布した。さらに、最も pKa の高い YSK13-C4 はほとんどが血管上に局在し、血管外への分布は僅かであった。

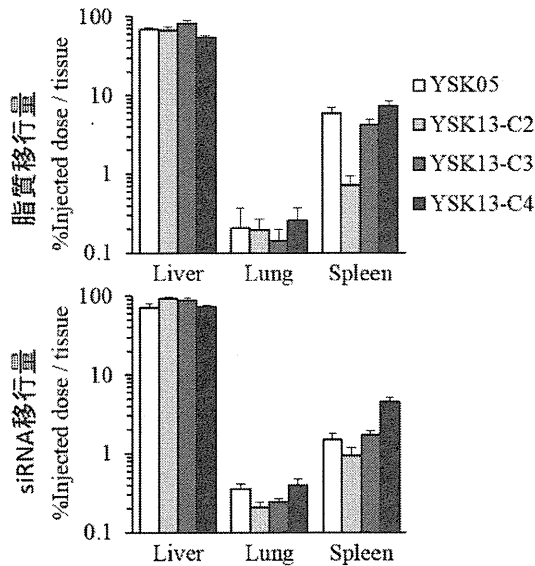


Fig. 5 各 pH 応答性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子の静脈内投与後の組織移行量。

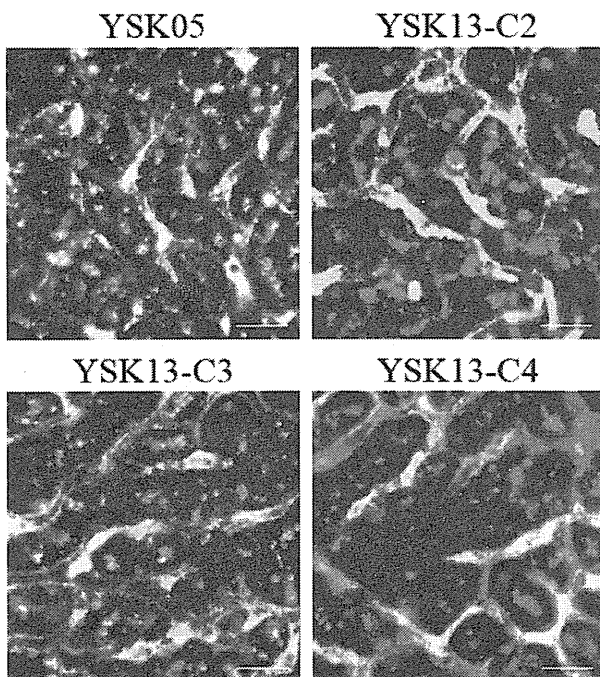


Fig. 6 各 pH 応答性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子の肝臓内分布。赤は siRNA

を、緑は血管をそれぞれ表す。

各脂質ナノ粒子の肝実質細胞における FVII ノックダウン効率を測定した。脂質組成は pH 応答性脂質 : chol : PEG-lipid = 70 : 30 : 3 mol% とした。まず脂質膜 pKa の影響を見たところ、最適な脂質膜 pKa は 6.4 付近であり、YSK13-C3 が最も高い活性を示した (Fig. 7)。

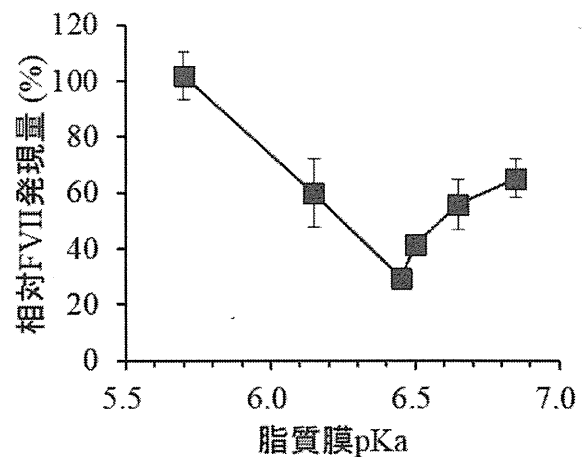


Fig. 7 脂質膜 pKa が肝実質細胞における遺伝子ノックダウン活性に与える影響。

また、その範囲から外れると活性が著しく低下した。同等の脂質膜 pKa を示す YSK05 または YSK13-C3 をそれぞれ含む脂質ナノ粒子の FVII ノックダウン活性を詳細に調べた結果、それぞれ ED₅₀ で 0.06 mg/kg、0.015 mg/kg を示した (Fig. 8)。YSK13-C3 を含む脂質ナノ粒子に関して脂質組成を最適化した結果、YSK13-C3 : chol : PEG-lipid = 50 : 50 : 1.5 mol% で ED₅₀ 0.0065 mg/kg を示し、YSK05 を含む脂質ナノ粒子と比べておよそ 10 倍高い活性を示すことが明らかとなった。続いて、YSK13-C3 と chol のモル比を 50 : 50 に

固定し、PEG-lipid 量を変化させることで様々な粒子径を示す脂質ナノ粒子を作製し、それらの FVII ノックダウン効率を評価した。その結果、平均粒子径 70 - 90 nm の範囲で優れた活性を示すことが明らかとなった (Fig. 9)。

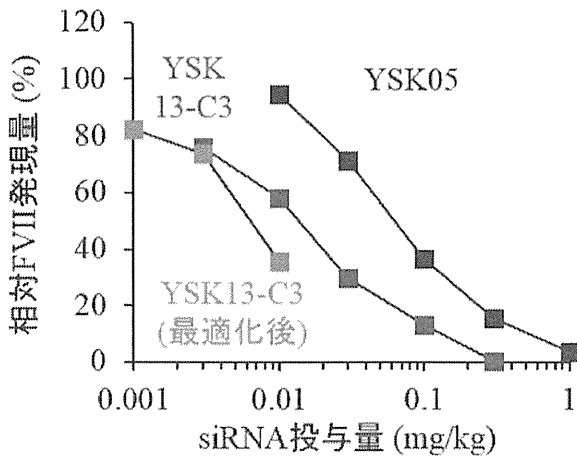


Fig. 8 pH 応答性カチオン性脂質の開発および脂質組成の最適化による肝実質細胞における遺伝子ノックダウン活性の向上。

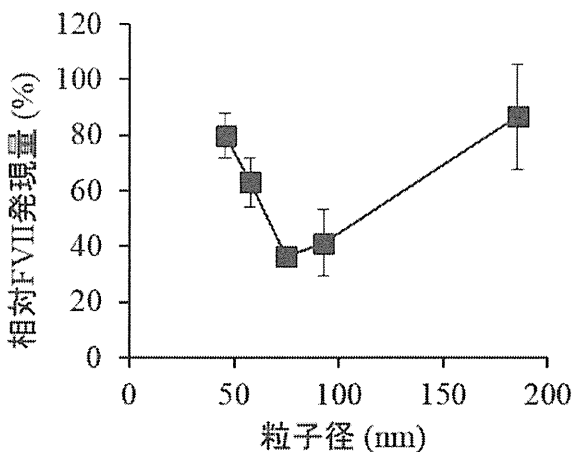


Fig. 9 脂質ナノ粒子の粒子径が肝実質細胞における遺伝子ノックダウン活性に与える影響。

さらに、脂質に対する siRNA 搭載量のノックダウン活性への影響を調べた。

siRNA 量は siRNA が持つ負電荷に対する YSK13-C3 の正電荷のモル比 (lipid / siRNA 電荷比) として表した。実験の結果、lipid / siRNA 電荷比が減少するに伴って活性が徐々に低下し、電荷比 8.0 と 1.5 の活性はおよそ 6 倍であった (Fig. 10)。

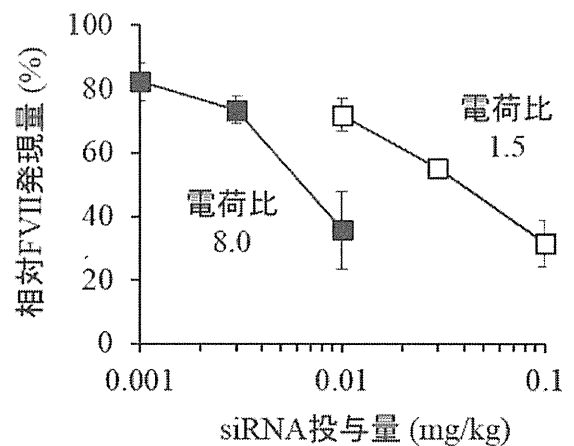
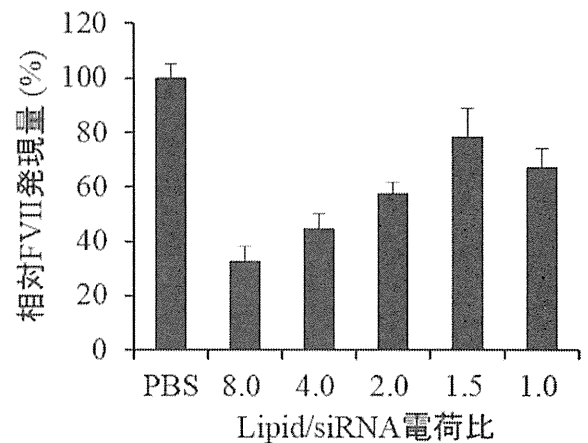


Fig. 10 Lipid / siRNA 電荷比が肝実質細胞における遺伝子ノックダウン活性に与える影響。

各脂質ナノ粒子の肝血管内皮細胞における CD31 ノックダウン効率を、定量的逆転写 PCR 法により測定した。その結果、脂質膜 pKa の上昇に伴って活性が向上した (Fig. 11)。また、互いに同等の脂質膜

pKa を有する YSK05 と YSK13 を比較した場合、肝実質細胞におけるノックダウン活性の序列とは異なり、YSK05 の方がおよそ 4 倍高い活性を示した。

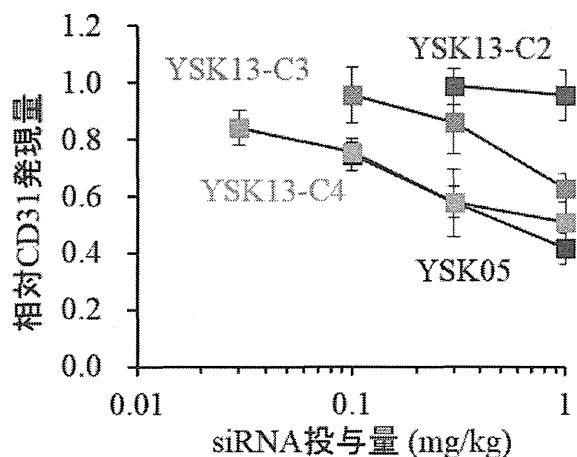


Fig. 11 各 pH 応答性カチオン性脂質を含む脂質ナノ粒子の肝血管内皮細胞における遺伝子ノックダウン活性。

GSK264220A および orlistat を処理した際の各脂質ナノ粒子のノックダウン活性を測定した結果、YSK13-C3 を含む脂質ナノ粒子の活性の GSK264220A 処理による向上が認められた (Fig. 12)。

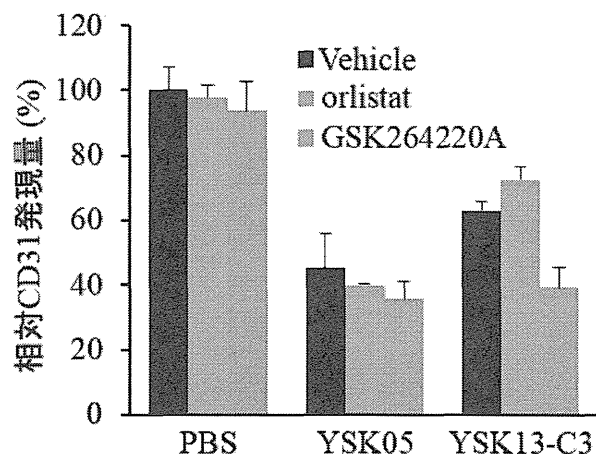


Fig. 12 肝血管内皮細胞における遺伝子ノックダウン活性に与える各細胞外リパーゼ

阻害剤の影響。

D. 考察

YSK13-C3 を含む脂質ナノ粒子の肝実質細胞におけるノックダウン活性は、YSK05 よりも優れていた。両脂質ナノ粒子の肝臓への移行量や肝臓内分布に顕著な差は無かった。一方で、 ^{31}P NMR 法により、YSK13 が最も優れた膜融合活性を有していることが明らかとなったことから、YSK13-C3 を含む脂質ナノ粒子の高いノックダウン活性はエンドソーム膜との膜融合を介した siRNA の細胞質への送達過程の効率の上昇に起因していると考えられる。また、全ての YSK13 が膜融合活性に優れるにも関わらず、脂質膜 pKa によって肝実質細胞におけるノックダウン活性は顕著に異なった。YSK13-C4 は比較的脂質膜 pKa が高く、肝実質細胞への移行量の低下が観察されたことから、この移行量の低下が活性の低下を招く主要な要因であると推察できる。一方で、脂質膜 pKa の低い YSK13-C2 は肝実質細胞への siRNA 送達には最も優れていた。しかし、脂質膜 pKa が低いために、エンドソームの酸性に応答したカチオン性への変化が非効率であり、エンドソーム膜と相互作用できずにリソソーム等の分解系へと移行してしまったものと考えられる。従って、肝実質細胞への移行とエンドソーム膜との膜融合の両効率のバランスが最もとれた脂質膜 pKa 6.4 付近の YSK13-C3 が最大活性を示したと考えられる。

静脈内から肝実質細胞へアクセスするためには、肝類洞血管内皮に存在するフェネ

ストラと呼ばれる直径 100 nm 程度の小孔を通過しなければならない。肝実質細胞におけるノックダウン活性の粒子径の影響を検討した結果、180 nm 程度では活性をほとんど示さなかった。これはフェネストラの通過が制約され、肝実質細胞への移行量が減少したためと考えられる。一方で、70 nm 未満の比較的小さな粒子の活性の低下も認められた。この原因についてはまだ明らかになっていないが、肝実質細胞への siRNA 送達量が劣っていないことは確認済みである（データ未提示）。また、*in vitro* 培養細胞系では血清の存在によって遺伝子ノックダウン活性が著しく低下することが確認されている（データ未提示）。以上より、メカニズムは不明ではあるものの、エンドソームからの脱出過程がなんらかの血清成分によって阻害されていることが示唆されている。

脂質ナノ粒子への siRNA 搭載量が肝実質細胞における遺伝子ノックダウン活性に与える影響を検討した結果、siRNA 搭載量の上昇に伴って活性の著しい低下が認められた。安全性の観点からは、脂質の投与量を下げることが好ましいが、今回の検討から、脂質量の減少によってその減少分あるいはそれ以上の活性の低下が認められた。従って、lipid / siRNA 電荷比は 8.0 程度が適切な値であると示唆された。

YSK13-C3 を含む脂質ナノ粒子は、同等の脂質膜 pKa を有する YSK05 を含む粒子と同等の肝臓移行量および肝臓内分布を示したにも関わらず、肝血管内皮細胞において低い遺伝子ノックダウン活性を示した。EL および LPL を阻害する

GSK264220A 処理によって活性が向上した一方で、LPL のみを阻害する orlistat 処理では活性が変化しなかったことから、EL が YSK13-C3 の不活性化に関与していることが示唆された。YSK13 はリンカーとしてエステル結合を有し、これが EL のホスホリパーゼ活性によって分解を受けたものと推察される。肝実質細胞にも細胞外リパーゼとして肝性リパーゼ (HL) の存在が知られているが、これは LPL と同様にホスホリパーゼ活性が低いことが知られている。従って、YSK13-C3 を含む脂質ナノ粒子は肝実質細胞上では不活性化をほとんど受けずに高い遺伝子ノックダウン活性を示し、肝血管内皮細胞上で EL のホスホリパーゼ活性によって特異的に不活性化された結果、YSK05 を含む粒子と比較して高い肝実質細胞特異性を示したものと推察された。

E. 結論

膜融合活性に優れた新規 pH 応答性カチオン性脂質 YSK13 の開発に成功した。肝実質細胞における高い遺伝子ノックダウン活性を示すために必要な脂質膜 pKa、粒子径および lipid / siRNA 電荷比の適切な範囲を明らかにした。また、脂質組成の最適化を通して、以前に開発した YSK05 を含む脂質ナノ粒子と比較してさらに 10 倍も高い活性を有する脂質ナノ粒子の開発に成功した。さらに、YSK13-C3 を含む脂質ナノ粒子は高い肝実質細胞選択的遺伝子ノックダウンを示し、それは細胞外リパーゼの働きによることが示唆された。

今後は、脂質ナノ粒子の物理化学的・製

剤的特性が毒性に与える影響について検討し、安全面からも最適な粒子設計を行うことで安全治療域の拡大を図る。また、実用化を目指した脂質ナノ粒子製造のスケールアップについての検討も行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. "The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus." *Immunity*, 42(1): 123-132 (2015)
- 2) Ara MN, Matsuda T, Hyodo M, Sakurai Y, Ohga N, Hida K, Harashima H. "Construction of an aptamer modified liposomal system targeted to tumor endothelial cells." *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(11): 1742-1749 (2014)
- 3) Akhter A, Hayashi Y, Sakurai Y, Ohga N, Hida K, Harashima H. "Ligand density at the surface of a nanoparticle and different uptake mechanism: two important factors for successful siRNA delivery to liver endothelial cells." *International Journal*

of Pharmaceutics, 475(1-2): 227-237 (2014)

- 4) Ara MN, Matsuda T, Hyodo M, Sakurai Y, Hatakeyama H, Ohga N, Hida K, Harashima H., "" *Biomaterials*, 35(25): 7110-7120 (2014)
- 5) Sakurai Y, Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. "Improvement of doxorubicin efficacy using liposomal anti-polo-like kinase 1 siRNA in human renal cell carcinomas." *Molecular Pharmaceutics*, 11(8): 1713-1719 (2014)

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

- 1) 特願 2014-217011, 発明者 ; 原島秀吉、佐藤悠介、兵藤守、畠山浩人、小原道法、山本直樹, 名称 ; 脂質構造体, 出願人 ; 国立大学法人北海道大学, 出願日 ; 2014年10月24日

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

ツパイを用いたB型肝炎治療ワクチンによる免疫治療法の確立

研究分担者 日浅陽一、愛媛大学大学院 消化器・内分泌・代謝内科学講座、教授

研究要旨： B型肝炎ウイルス(HBV)の治療は、核酸アナログ製剤によりウイルス減少効果は期待できるものの、HBV排除は困難である。より治癒に近い状態をめざして、バングラデシュとの共同研究による臨床的検討とともに、HBV感染感受性のあるツパイを用いて、HBV治療ワクチンによる免疫作用機序を明らかにすることにより免疫治療法の確立を研究の目的としている。B型肝炎患者を対象として、B型慢性肝炎患者75名にHBs抗原+HBc抗原治療ワクチンを投与し、その治療効果を76名のペグインターフェロン投与患者と比較したところ、治療終了後48週で治療ワクチン群はペグインターフェロン治療群よりHBV-DNA量、HBs抗原量が低値で、HBe抗原消失率が高く、線維化進展症例が少ない結果であった。また、両群ともにALTの正常化が得られた。現在、百日咳全菌体ワクチン併用して投与し、そのアジュバント効果と副作用について検討している。また、HBs抗原およびHBc抗原を投与したツパイにおいて、HBV特異的な免疫応答の誘導を確認しており、現在、HBV感染ツパイを用いた免疫治療効果について検討している。

共同研究者

吉田理（愛媛大学、特任講師）

今井祐輔（愛媛大学、研究員）

Mamun Al-Mahtab (Bangababandhu Sheikh Mujib 医科大学、教授)

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は持続感染し、慢性肝炎を発症し、炎症の持続と肝線維化の進展により肝硬変になり、肝細胞癌の発生にいたる。核酸アナログ製剤の登場、インターフェロン治療によりHBVの複製阻害、ウイルス量の減少が得られるようになったが、HBVの排除は临床上困難である。より治癒に近い状態をめざして、HBVに対する免疫治療法に

注目し、その治療法の確立および免疫作用機序をHBV感染感受性のあるツパイを用いて解析することを研究の目的とする。

B型肝炎患者では、HBVに対する抗原特異的な免疫応答が低下しており、HBVを肝臓から排除できない。現在、B型肝炎に対する治療としてペグインターフェロン(peg-IFN)による免疫賦活療法では、十分な免疫誘導は得られず、HBV-DNAの減量、HBs抗原の低下作用も限定的とされる。また、peg-IFNには副作用が多くコストも高いことから、長期連用は難しい。

これらの状況を解決しうる方法として、著者らはB型肝炎患者に対してHBV特異的な免疫反応を誘導する目的で、HBs抗原ワクチン

や、同抗原ワクチンでパルスした樹状細胞を用いた治療を行ってきた。しかし、いずれも十分な治療効果が得られていない。過去の報告から HBs 抗原に特異的な免疫応答だけでなく、HBc 抗原特異的な免疫応答が HBV-DNA を低下させる可能性があるとの知見がある¹⁾。また、著者らの検討でも HBc 抗原パルス樹状細胞において HBs 抗原の消失と HBs 抗体の出現が得られており²⁾、HBc 抗原に対する特異的な免疫応答の誘導が HBs 抗原消失、HBV-DNA の低下につながる可能性が示唆される。そこで、①HBs 抗原特異的な免疫応答による HBV の中和作用、②HBc 抗原特異的な免疫応答による HBV の排除を目的とした、HBs 抗原+HBc 抗原の混合ワクチンを HBV に対する免疫治療として用いることとした(図1)。また、治療ワクチンの効果を増強するため、細胞性免疫誘導能を有する百日咳全菌体ワクチンをアジュバントとして使用する、ワクチン治療のプロトコールを作成した。

想定されるHBsAg/HBcAg治療ワクチンの作用機序

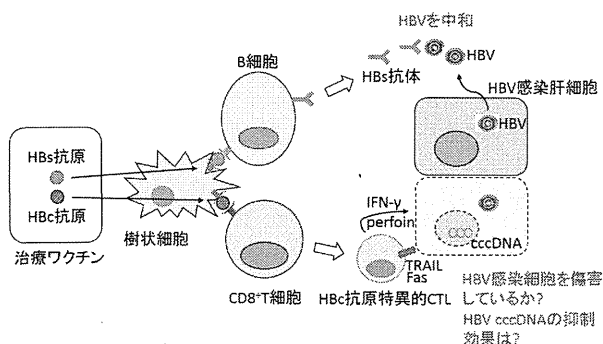


図1 想定されるワクチンの作用機序

治療ワクチン投与による免疫作用機序を解明するため、HBV に感染感受性のあるツパイを用いて、治療ワクチン投与後の免疫状態の変化を観察するとともに、適切な投与量、投

与回数、投与経路を同定し、より治療効果の高い HBs 抗原と HBc 抗原混合ワクチン治療法のプロトコール作成をめざす。

B. 研究方法

対象は B 型慢性肝炎患者 151 名。ランダムに患者を 2 群に分けて、そのうちの 75 名に対して、HBs 抗原+HBc 抗原ワクチンを 2 週 1 回、計 5 回、経鼻投与し、その後、HBs 抗原(100 μg)+HBc 抗原(100 μg) ワクチンを 5 回皮下投与した(ワクチン治療群)。対照群として、76 名に peg-IFN-α (180mg) 週 1 回、計 48 回投与して比較検討した(peg-IFN 群)。治療開始から治療終了後 48 週における ALT 値、HBe 抗原陽性率、HBs 抗原量、HBV-DNA 量、fibroscan による肝線維化の程度(肝硬度値)を測定し、治療効果および副作用について評価した。

また、百日咳全菌体ワクチンのアジュバント効果、副作用を検討するため、別の B 型肝炎患者 6 名に HBs 抗原+HBc 抗原+百日咳全菌体ワクチンを投与し、アジュバントを用いなかった 6 名の患者群と治療効果、副作用について比較検討した。

HBV 治療ワクチンの作用機序の解析がツパイで可能かを検証するため、ツパイに HBs 抗原+HBc 抗原治療ワクチンを 30 μg 投与し、2 週後に血中 HBs 抗体、HBc 抗体の誘導を検討した。また現在、HBV 持続感染が確認されたツパイに同治療ワクチンを投与している。

(倫理面への配慮)

倫理委員会の承認のもとバングラデシュ Bangababandhu Sheikh Mujib 医科大学の Dr. Mamun Al-Mahtab との共同研究で行われた。

解析は愛媛大学との共同研究で行った。

C. 研究結果

ワクチン治療群と peg-IFN 群の両群とも治療期間中に一過性の ALT 値の上昇がみられた。特にワクチン治療群において、ALT 上昇は顕著 (<225 U/L) であったが、治療終了時には両群ともに ALT 値はほぼ正常化し、この ALT 正常化は治療終了後 48 週時まで持続している。

両群とも治療開始後に HBV-DNA 量は低下し、治療終了時にはほぼ同等の減少効果がみられた。しかし、治療終了後 peg-IFN 群ではすぐに再上昇する傾向がみられたが、ワクチン治療群では低値が持続し、治療後 48 週の時点でも peg-IFN 群に比べて HBV-DNA は低値であった (図 2)。

治療中、治療後のHBV-DNAの変化

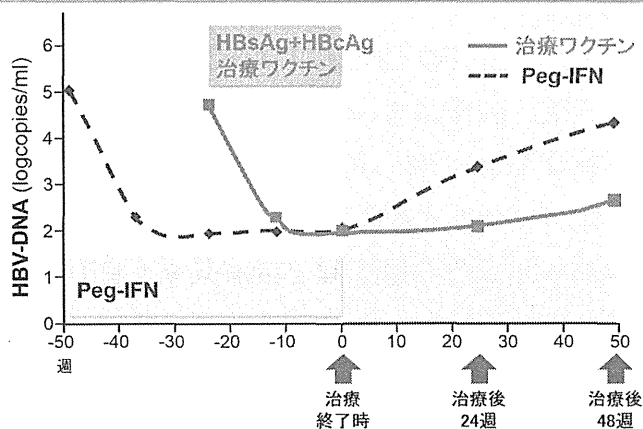


図2 HBs抗原+HBc抗原ワクチン治療群と peg-IFN治療群のHBV-DNAの推移

HBe 抗原の陰性化率については治療終了時には両群間に差がみられなかったが、治療終了後 48 週の時点ではワクチン治療群において有意な陰性化率がみられた。

また、HBs 抗原量は、治療開始時には両群間に差がみられなかったが、peg-IFN 群では、

治療開始とともに HBs 抗原量が低下し、治療終了後に再上昇した。一方、ワクチン治療群では、治療中および治療終了後 36 週までは HBs 抗原量の低下がみられなかったが、治療終了後 48 週において低下している (図 3)。

HBs 抗原に対する治療効果については今後さらに経過観察して評価する必要があると考えられる。

治療開始後のHBs抗原の推移

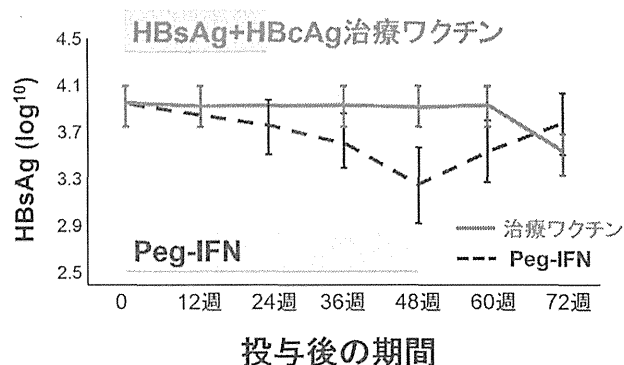


図3 HBs抗原+HBc抗原ワクチン治療群と peg-IFN治療群のHBs抗原量の推移

肝線維化の程度 (肝硬度値) については、治療前は両群に差がみられなかったが、治療終了時に peg-IFN 群では 11.0 kPa 以上 (F3 以上の肝線維化進行例に相当) が 19.7%であったのに対し、ワクチン治療群では 8.2%と低値であった。また、18.3 kPa 以上の F4 相当例は、peg-IFN 群が 9.2%であったのに対して、ワクチン治療群では 0%であり、肝線維化の進行が抑制されていた。

百日咳全菌体ワクチンをアジュバントとして用いる検討では、使用群では非使用群に比べて、全身倦怠感、痛み、発熱などの副作用がより多くみられた。しかし、治療継続は可能であり、安全性に問題はみられなかった。

治療期間中、5回投与後の時点(治療開始後10週)において、アジュバント非使用群で全例においてALTの一過性上昇(<180 U/L)がみられたが、アジュバント使用群では6例中1例しか見られなかった。10回投与終了時のHBV-DNAの低下に関しては両群間に差はみられていないが、治療効果の持続に差がえられる可能性があり、今後長期の経過観察が必要である。

ツパイの検討では、HBs抗原+HBc抗原を投与した群において、いずれのツパイでも末梢血中に抗原特異的抗体がELISA法にて同定され、HBVに対する特異的免疫反応が惹起されることを確認している。HBs抗体とHBc抗体別々の測定系を作成しており、この系を用いて、HBV感染持続ツパイにHBs抗原+HBc抗原治療ワクチンを投与し、特異抗体の産生について評価していく。

D. 考察

HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンの治療効果について、peg-IFN治療群との比較を治療終了後48週まで検討した。その結果、HBV-DNAの低下、HBe抗原の陰性化率に関して、ワクチン投与群においてIFN投与群と比し、良好な結果が得られた。また、HBs抗原の推移について、ワクチン治療終了後48週において、HBs抗原量の低下がみられている。これらの結果より、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンはpeg-IFN治療群と比較して、1)免疫治療効果が長期間持続すること、2)HBs抗原に対する免疫誘導を惹起する可能性があることを示唆している。また、ワクチン治療はpeg-IFN治療と比較して肝線維化の進行を抑制する効果が示唆された。今後はさらに長期

間経過を観察することで、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンの効果を評価していく必要がある。また、ウイルスマーカーの変化、肝炎の進行のみならず、肝発癌に対する影響についても検討していきたい。

また、より強い免疫治療効果を期待して、百日咳全菌体ワクチンをアジュバントとして使用した結果、副作用の頻度は増加したものの、治療中止に至る重篤な副作用はみられなかった。アジュバント使用群と非使用群ではALTの反応が異なっており、何らかの免疫修飾効果が示唆される。今後、経過を観察してその治療効果について評価していく必要がある。

また、ツパイを用いた検討は緒に着いたばかりであるが、治療ワクチン投与によるHBV抗原特異的免疫反応が確認されたことから、ツパイを用いて治療ワクチンの免疫機序について解析する基盤が確立された。今後、HBV感染持続ツパイを用いて、HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンを皮下、あるいは経鼻投与し、そのすることで、肝内のHBV特異的細胞障害性T細胞の誘導とその機能を検討するとともに、最適な治療ワクチン投与量、投与方法について検討していきたい。

E. 結論

HBs抗原+HBc抗原治療ワクチンによる免疫治療は、ヒト臨床試験においてpeg-IFN治療に比べて、HBV-DNAの持続低値、HBe抗原消失率の向上、肝線維化進展抑制効果が得られ、その有効性が示された。今後、HBV感染感受性を持つツパイを用いた検討により、その免疫作用機序を解析するとともに、アジュバントの使用を含めた、より治療効果の高い

投与方法、投与量を設定して、最適なHBVに対する免疫治療プロトコルの確立をめざす必要がある。

参考文献

- 1) Maini MK, et al. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000 191:1269-80.
- 2) Akbar SMF, Chen S, Hiasa Y, et al. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2012 96:59-64.
- 3) Yamazaki T, Hiasa Y, et al. Circulating AIM as an indicator of liver damage and hepatocellular carcinoma in humans. *PLoS One* 2014 9:e109123.
- 4) Hirooka M, Hiasa Y, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Portal Hypertension Due to Outflow Block in Patients without Cirrhosis. *Radiology* 2015 274:597-604.
- 5) Nishida N, Hiasa Y, et al. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One* 2014 9:e86449.
- 6) Iio E, Hiasa Y, et al. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet.* 2015 134:279-89.
- 7) Kuroda T, Hiasa Y, et al. Pancreatic congestion in liver cirrhosis correlates with impaired insulin secretion. *J Gastroenterol.* 2014 Oct 5 Epub ahead of print.
- 8) Hiraoka A, Hiasa Y, et al. Prognosis and therapy for ruptured hepatocellular carcinoma: Problems with staging and treatment strategy. *Eur J Radiol.* 2015 84:366-71.
- 9) Yoshida O, Thomson AW, et al. Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN- α promotes murine liver ischemia/reperfusion injury via induction of hepatocyte IRF-1. *Hepatology* 2014 60:267-77.
- 10) Yoshida O, Thomson AW, et al. DAP12 deficiency in liver allografts results in enhanced donor DC migration,