

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

**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**

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大段 秀樹

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

． 総括研究報告	
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 大段 秀樹.....	7
． 分担研究報告	
1. Licensed /Unlicensed NK 細胞の肝細胞癌切除後再発予後に対する影響 田中 純子・谷峰 直樹・大段 秀樹.....	17
2. 生体肝移植後の C 型肝炎ウイルス再感染に対する IFN 治療効果の検討 および予防法の開発 今村 道雄.....	22
3. 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 的崎 尚・尾上 隆司.....	24
4. ヒト不死化肝細胞において HCV タンパク質により発現変動する自然免疫応答 関連遺伝子の探索 加藤 宣之・團迫 浩方.....	30
5. 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 田原 栄俊.....	35
6. 『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 渡辺 信和.....	37
7. iPS 細胞および CD34 ⁺ 細胞からの NK 細胞誘導と効率化の検討 大段 秀樹・田中 友加.....	41
． 研究成果の刊行に関する一覧表.....	49
． 研究成果の刊行物・別刷.....	55

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

研究代表者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨 肝癌再発予防を目的に臨床応用された肝 NK 細胞療法後の末梢血 NK 細胞のキメリズム解析を行った。CD34⁺造血幹細胞から NK 細胞をリモデリングし、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用い、抗 HCV 効果を確認した。iPS 細胞や CD34⁺細胞から NK 細胞を分化誘導する効率の改善を目指した研究を行った。誘導 NK 細胞の License 効果を予測する目的で、HCV 感染患者の肝細胞癌の再発と KIR-HLA ペアの累積との関連を解明した。また、誘導 NK 細胞の抗体 HCV 機構を解明する目的で、HCV タンパク質を恒常的に発現し非腫瘍性の表現型を持つヒト不死化肝 PH5CH8 細胞を作成し、表面抗原の発現がどのように変動するかをマイクロアレイ法により網羅的に解析し、NK 細胞に対する感受性を確認した。

研究分担者

今村 道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 助教
田原 栄俊 広島大学大学院 細胞分子生物学講座 教授
田中 純子 広島大学大学院 疫学・疾病制御学講座 教授
田中 友加 広島大学大学院 消化器・移植外科学講座 助教
的崎 尚 神戸大学大学院 生化学・分子生物学講座・シグナル統合学分野 教授
加藤 宣之 岡山大学大学院 腫瘍ウイルス学分野 教授
渡辺 信和 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 特任准教授
尾上 隆司 国立病院機構呉医療センター 臨床研究部分子腫瘍研究室 室長

A. 研究目的

一般に、ウイルスが感染すると natural killer (NK)細胞の非特異的応答によりウイルスは排除される。しかし、C型ウイルス(HCV)感染ではHCVのE2蛋白とNK細胞上のCD81分子の結合によってNK細胞機能が抑制され、持続感染に移行する。我々は、肝未成熟NK細胞をIL-2存在下で賦活化した場合、CD81を介した抑制機構に抵抗性を示し、強いHCV複製抑制効果を誘導し得た。さらに、多機能造血幹細胞やiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞を誘導することに成功した。本研究では、これらの自然免疫リモデリング技術を応用して、HCVが免疫応答を回避し持続感染に

移行する機構を断ち切る根治療法を確立するため、新たな自然免疫抗HCV制御機構の解明とそれを基盤とした臨床試験を準備する予定である。

CD34⁺造血幹細胞からNK細胞をリモデリングし強力なtypeI IFN産生を誘導する技術は確立した。本研究では、臨床応用規模での効率化を目指す。誘導NK細胞は Killer Immunoglobulin-like receptor (KIR)2DLを欠落しておりunlicensed NK細胞様のフェノタイプを示す。本年度は、KIR遺伝子多型とHLAの解析からlicensingと制癌機構の関連を解析した。NPC1L1拮抗薬は、HCVの細胞間播種を抑制することが確認されたため、細

胞内増殖を抑制するNK細胞移入療法との相乗効果を検討する予定である。

iPS細胞からNK細胞への誘導は可能となったが、効率は臨床に応用できるレベルではない。本研究では誘導効率の改善を図った。また、自然免疫系のTLR3経路/RIG-I経路を再現し得るPH5CH8細胞を用いた解析系を確立し、NK細胞や星細胞のHCV増幅制御の新機構を解明する。さらに類洞内皮細胞およびマクロファージによるHCV抗原提示機能の免疫回避機構を解明し、その克服法を探索する。

B. 研究方法

1. Killer Immunoglobulin-like receptor(KIR)遺伝子多型と制癌機構の関連解析(担当 大段・田中_研)

Natural killer (NK) 細胞は自己のHLAを認識する抑制性Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs)を表出することで潜在的活性強化がおこることが近年報告されており、この機構は「License」と呼ばれている。Licenseに関わる抑制性KIRは5種類(KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1, 3DL2)存在し、それぞれ特定のHLA配列を認識すること、抑制性KIRの保有、HLA遺伝子型は個体において遺伝的多様性を認めるため、潜在的な機能性KIR-HLAペアには個体差が存在することが知られている。しかしIn vitroで報告されているLicensed NK細胞の抗腫瘍活性強化が、生体内で固形がんの長期成績に与える影響について十分な知見はない。今年度は遺伝子解析により機能性KIR-HLAペア(個人の潜在的License経路)の肝細胞癌(HCC)術後再発予後に対する影響を検討した。

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

これまで広島大学でのHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討では、HCV RNA検出前にCD34⁺幹細胞由来NK細胞を移入す

ると感染を予防可能であった。しかし、一旦感染が成立した後には、NK細胞移入のみではHCV RNA量抑制効果は限られており、ウイルス侵入阻止や増殖抑制効果をもつ薬剤の併用が望ましい。我々はこれまで細胞のコレステロール取り込み受容体であるNiemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1)が治療的介入に使いやすいHCV侵入因子であることを示した。本年度はJFH1感染性粒子産生系においてHCV感染性粒子産生阻害効果を示したトロンボキサンA2(TXA2)合成酵素(TXAS)阻害剤であるオザグレレルおよびプロスタグランジンIの受容体(IP)アゴニストのin vivoにおける抗HCV効果をヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討した。また、NK細胞レシピエントのIL28B遺伝子多型と生体肝移植後のHCV再感染に対するPEGIFN/ribavirin併用療法の治療効果を解析した。

3. マクロファージおよび類洞内皮細胞の抗原提示機能関連分子の解析(担当 的崎、尾上)

C型肝炎ウイルス(HCV)持続感染には、HCV感染に伴う肝臓内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、肝組織の主要な抗原提示細胞であるマクロファージ(クッパー細胞)および類洞内皮細胞でのSIRPおよび肝組織でのCD47の発現について検討した。さらに、CD47とSIRPの結合阻害抗体による、オプソニン化CD47発現細胞のマクロファージによる貪食について解析を進め、抗SIRP抗体が外来抗原を表出するHCV感染細胞の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におけるin vivoでの免疫抑制能に関して検討し、類洞内皮細胞がHCV由来ペプチド抗原提示により応答したT細胞を抑制し免疫回避される可能性を検討した。

4. ヒト不死化肝細胞を用いたHCVタンパク質により発現変動する自然免疫応答関連遺伝子の探索(担当 加藤)

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)により発現変動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、前半領域(coreタンパク質からNS2タンパク質)、あるいは後半領域のHCVタンパク質(NS3タンパク質からNS5Bタンパク質)を発現するためのベクターを作成し、これらのHCVタンパク質を恒常的に発現し非腫瘍性の表現型を持つヒト不死化肝PH5CH8細胞を作成した。さらに、HCVタンパク質を発現させたときに表面抗原の発現等がどのように変動するかをマイクロアレイ法により網羅的に解析した。

5. 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(担当 田原)

ヒトiPS細胞からCD45⁺CD56⁺細胞(NK細胞)を得るためには、iPS細胞からCD34⁺細胞を、さらにCD34⁺細胞からCD56⁺細胞を効率よく分化誘導する必要がある。すでに報告されているヒトES細胞からのNK細胞の分化誘導法を参考に、iPS細胞からCD34⁺細胞、及びCD34⁺細胞からNK細胞への分化誘導を行ったところ、その効率はそれぞれ3~10%と10

~20%であった。一方、ヒト末梢血由来CD34⁺細胞は90%以上の高効率でNK細胞に分化する能力を有している。本研究は、iPS細胞からNK細胞への分化誘導効率が低い原因を明らかにし、効率改善を行うことを目的としている。今年度は分化段階における寿命・老化関連遺伝子の発現解析を行った。

6. 『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』における末梢血NK細胞キメラ解析(担当 渡辺)

NK細胞移入療法の抗肝癌・HCV効果のメカニズムとして、移入したNK細胞が患者の体内で抗腫瘍・HCV効果を発揮することが予想される。しかしながら、そのことをヒトの体内で直接証明するのは極めて困難である。本研究では、現在広島大学と米国マイアミ大学で施行中の『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』において、肝移植後の肝由来活性化NK細胞移入療法における抗肝癌・HCV効果のメカニズムを解明することを目的とした。本年度は、移入したドナー由来肝由来活性化NK細胞がNK療法後の患者末梢血で実際に検出されるのかを肝移植後に投与されたNK細胞の生体内動態を末梢血のキメラ解析/HLA-Flow法で検討した。

7. iPS細胞およびCD34⁺細胞からのNK細胞誘導と効率化の検討(担当 大段、田中_友)

本研究では、我々がこれまでに成功した自然免疫リモデリング技術を応用して、HCVが免疫応答を回避し持続感染に移行する機構を断ち切る根治療法を確立するため、iPS細胞およびCD34⁺細胞から抗HCV効果を有する活性化Natural killer(NK)細胞の分化誘導法の改良を実施した。誘導NK細胞が抗HCV効果を最大限発揮するために必要なNK細胞機能分子の探索と、感染抑制にかかわるサイトカインの検索をin vitro assayで、HCV持続感染

ヒト肝細胞キメラマウスモデルを用い、in vivo感染実験による感染抑制能の評価と感染防御あるいは感染助長に關与する分子の探索を行った。

C. 研究結果

1. Killer Immunoglobulin-like receptor(KIR)遺伝子多型と制癌機構の関連解析(担当 大段・田中_前)

HCCに対する初回肝切除症例の内、術前肝予備能不良症例(Child-Pugh grade BまたはC)および非治癒切除症例を除外した170例を対象とした。遺伝的に有効なKIR-HLAペアが多い患者群(3個: Highly licensed NK群)とペアが少ない群(2個: Poorly licensed NK群)を解析すると、Highly licensed NK群の術後再発予後はPoorly licensed NK群に比べ有意に良好であった($P = 0.0183$)。この再発に対する有意性はHCV感染の有無によるサブ解析では、非HCV感染患者群の解析では統計学的有意差を示したが、HCV感染患者群の解析において統計学的有意差に至らなかった。本研究により遺伝子レベルのKIR-HLAペアの累積により、HCC術後再発予後が良好な患者群が存在し、NK細胞のLicense効果がHCC術後予後に強く関わることを示唆された。また、今回の研究結果におけるHCV感染患者でのLicense効果の減弱は、報告されているHCVウイルス表面分子を介したNK細胞活性抑制と矛盾しない結果であったと考える。

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

トロンボキサンA2(TXA2)合成酵素(TXAS)阻害剤であるオザグレレルおよびプロスタグランジンIの受容体(IP)に対するアゴニスト投与では、いずれの薬剤もヒト肝細胞キメラマウスにおけるHCVの増殖抑制効果を認め、これらの薬剤が生体肝移植後のHCV再感染の予防に有効である可能性が示唆された。

生体肝移植後HCV再感染に対するPEG-IFN/ribavirin(RBV)療法の治療効果の検討では、genotype 1型のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV療法のSVR率は全体で59%(16/27例)であった。SVR率をレシピエントのIL28B遺伝子型(rs8099917 SNP)別に検討すると、TTで68%(13/19例)とTG/GGの37%(3/8例)に比べ高値であり、ドナーのIL28B遺伝子多型別に検討するとTTで68%(15/22例)とTG/GGの20%(1/5例)に比べ有意に高値であった($p=0.048$)。肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBV療法においてドナーおよびレシピエントのIL28B遺伝子型がその治療効果に關与していることを表すものであった。

3. マクロファージおよび類洞内皮細胞の抗原提示機能関連分子の解析(担当 的崎、尾上)

マウス肝ではF4/80、CD11b陽性のクッパー細胞においてSIRPが高度に発現していること、CD47が肝細胞に発現していることを確認した。この結果よりHCV感染肝細胞は、クッパー細胞により貪食される際には、CD47-SIRP系がその貪食制御に關与している可能性が示唆される。一方、CD47-SIRPの相互作用を阻害する抗SIRP抗体が抗体によりオプソニン化されたCD47発現細胞の貪食を促進する活性を有することが確認された。今後、肝細胞のHCV感染によるCD47発現変動の有無やマクロファージによるウイルス感染肝細胞の貪食がCD47-SIRP系を阻害する抗体により促進されるかについて検討を進めて行く必要がある。類洞内皮細胞に関しては高純度で単離する方法を確立できた。単離した類洞内皮細胞でフェノタイピングを行い、抑制性抗原提示細胞であることを確認した。さらにin vitroおよびin vivoでの同種抗原に対するT細胞応答抑制効果が明らかとなった。類洞内皮細胞にもSIRP- の表出を認め

たが、その発現はマクロファージと比べて低く、免疫抑制能への関与は今後検討する必要がある。

4. ヒト不死化肝細胞を用いたHCVタンパク質により発現変動する自然免疫応答関連遺伝子の探索（担当 加藤）

前半あるいは後半領域のHCVタンパク質をコードしている遺伝子を含むレトロウイルスをPH5CH8細胞に感染させ、プラストサイジンを含む培地中で約2週間培養した。この選択培養により、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ヒト不死化肝PH5CH8細胞（PH5CH8/C-NS2細胞とPH5CH8/NS3-5B細胞）を作成することができた。また、コントロール細胞（PH5CH8/Control細胞）も同様に作成した。作成したPH5CH8細胞において、45,000プローブからなるAffymetrix GeneChipを用いるマイクロアレイ解析を行った。この膨大なデータの中から、細胞死受容体、主要組織適合抗原（MHC）の古典的クラス1分子に属するヒト白血球抗原や非古典的クラス1分子に属するMICA、MICBやULBPファミリーのシグナル強度を解析した。PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞において、シグナル強度の低下が確認されたULBP1は、定量的RT-PCR法においても同様に、その遺伝子発現量は有為に低下していた。

5. 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（担当 田原）

iPS細胞からCD34⁺細胞へ分化誘導開始14、21、28日後の誘導サンプル及び末梢血CD34⁺陽性細胞からRNAを抽出し、CD34、hTERT、Bmi-1、p21、p16の発現をqRT-PCRで測定し、両者を比較検討した。その結果、分化誘導28日のiPS細胞由来CD34⁺細胞におけるCD34 mRNAの発現レベルは、末梢血由来

CD34⁺細胞と同等であった。老化関連遺伝子p16の発現レベルは、末梢血由来CD34⁺細胞と比較してやや上昇している一方、もう一つの老化関連遺伝子のp21発現レベルは、1/10程度と低レベルであった。さらに、細胞の分裂寿命の延長に働くテロメラーゼ及びBmi-1の発現を調べたところ、分化誘導28日のiPS細胞由来CD34⁺細胞において、テロメラーゼ及びBmi-1の発現はどちらも1/5程度であった。これらの結果は、iPS細胞由来CD34⁺細胞からのNK細胞分化誘導効率を促進するためには、分裂能の低下を抑制するか、あるいは積極的に分裂能を高めることが必要であることを示唆する。

6. 『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』における末梢血NK細胞キメラ解析（担当 渡辺）

広島大学病院で生体肝移植を受け、ドナー肝由来活性化NK療法症例7例のうち、有意な頻度のドナー由来細胞を検出できたのは5例であったが、検出されたドナー由来細胞のフェノタイプは様々であった。一方、NK療法非施行の2例でも、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された。移植後のドナー肝臓からはドナー由来の血液細胞が末梢血に流入するので、輸注したNK由来細胞をこれらと区別して検出するためには、輸注する細胞を検出するマーカーとして何らかの標識を施すことが必要と思われる。

7. iPS細胞およびCD34⁺細胞からのNK細胞誘導と効率化の検討（担当 大段、田中_友）

ヒト肝細胞キメラマウスへのHCV感染成立に誘導NK細胞を移入することで、投与したNK細胞数に依存して1週目および2週目の感染抑制を認めたが、一旦感染が成立した場合は、感染を抑制することはできなかった。また、非NK細胞群を投与したマウスは全例感染を認め、これらの細胞群は感染を助長する可

能性が示唆された。In vitro replicon assay systemによるHCVウイルス増幅抑制能においても、誘導NK細胞は強いHCV増幅抑制能を呈したが、非NK細胞群は抑制能が弱いことが分かった。HCVの感染抑制および増幅抑制効果に關与するNK細胞機能分子は、NKp46、NKG2D、CD226であった。また、IFN- γ 産生はHCV増幅抑制において主要なサイトカインであった。さらに、NK細胞の純度はHCV感染抑制に重要であり、培養の課程でNK細胞に分化せず非NK細胞に誘導された細胞群はCD11b/CD11c陽性の骨髄系の樹状細胞やマクロファージであり、これらの細胞群は抗HCV効果が乏しく、むしろ感染を促進することが、マウスin vivo感染実験でわかった。また、末梢血のCD34 $^{+}$ 細胞は血中存在率が非常に乏しいが、今回のリモデリング誘導実験において、誘導NK細胞の機能分子の誘導効率が高いことが示唆された。今後は機能解析とより詳細なフェノタイプ解析を行い、アフエレーシス法による末梢血中CD34 $^{+}$ 細胞からのNK細胞リモデリングの臨床応用の可能性について検討する。

D. 考察

本邦の肝癌死亡数は年間3万人を超え、その殆どがウイルス性肝炎などの基礎疾患を有する。ウイルス性肝炎高罹患地域にある広島大学では、先端的研究活動の一環として「肝臓プロジェクト研究センター」を設置し、我々も肝炎/肝癌対策研究を展開してきた。その中で、肝由来の未成熟NK細胞を賦活化し、CD81を介した抑制機構に抵抗性を示す強いHCV複製抑制効果を誘導する方法を開発した。さらに、多機能造血幹細胞やiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞を誘導することに成功した（平成22-24年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 22101001: 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）。本研究では、これらの自然免疫再構築

技術を応用したHCV根治療法を確立することを目的とし、新たな抗HCV自然免疫制御機構の解明とそれを基盤とした臨床試験を開始する。

本研究の独創性は、関連研究のうち既に臨床導入した研究成果から検証できる。肝癌合併肝硬変は肝移植の最も頻度の高い適応疾患の一つであるが、移植後生体防御能の抑制により癌再発の危険性が助長される。肝臓移植では、肝グラフト内の血液を体外で灌流するが、その排液から大量の未成熟NK細胞が分離でき、TRAILを誘導することに成功した。そしてNK細胞を用いた制癌免疫療法を、ミラノ基準外肝癌に対する肝移植患者へ臨床導入し無再発生存率の改善を確認した。このNK細胞を用いた制癌免疫療法は、アメリカFDAの承認を得て、米国マイアミ大学と共同で脳死肝移植症例を対象に第I相臨床試験を現在施行中である。この研究を発展させ、IFN- γ 産生未成熟NK細胞の誘導法を開発し、HCV性肝硬変患者に対する肝移植後に移入したところ、術後のHCV RNA量は有意に減少し、HCVが完全に排除され完治したケースも経験した。最近、CD34 $^{+}$ 造血幹細胞やiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞を誘導することに成功し、臨床応用に向けた基礎研究を進行中である。

NK細胞受容体であるKIR2DL2/3はHLA-Cw3と結合してNK細胞の活性化を抑制している。KIR2DL1はHLA-Cw4と結合してNK細胞の活性化を抑制する。自己HLA-Cエピトープと結合しないKIR2DLを発現するNK細胞(unlicensed NK細胞)は抗HCVあるいは抗腫瘍機構の中心を担う可能性が報告された。我々が造血幹細胞から誘導したNK細胞は、KIR2DLを欠落しておりunlicensed NK細胞様のフェノタイプを示すが、治療目的で移入する場合に想定される抗HCV効果の有意性と安全性を解析する必要がある。

本年度は、HCCに対する初回肝切除症例を対象とし、遺伝的に有効なKIR-HLAペアが多い患者群(3個 : Highly licensed NK群)とペアが少ない群(2個 : Poorly licensed NK群)で再発率を解析した。Highly licensed NK群の術後再発予後はPoorly licensed NK群に比べ有意に良好であった。しかし、HCV感染患者群のサブ解析では、統計学的有意差に至らず、HCV感染患者での肝癌に対するLicense効果が減弱している可能性が示唆された。今後、in vitroでNK細胞のlicensing誘導技術を確立し、抗HCV療法におけるLicense効果を検討する予定である。

E. 結論

CD34+造血幹細胞あるいはiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞を誘導した。臨床応用に向けた課題に対して、計画に従って順調に研究を進めている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

分担研究報告書に記載したため、ここでは省略する。

H. 知的財産権の出願・登録状況

分担研究報告書に記載したため、ここでは省略する。

Licensed /Unlicensed NK 細胞の肝細胞癌切除後再発予後に対する影響

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 教授
研究協力者 谷峰 直樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 院生
研究代表者 大段 秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

研究要旨

Natural killer (NK) 細胞は自己のHLAを認識する抑制性Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs)を表出することで潜在的活性強化がおこることが近年報告されており、この機構は「License」と呼ばれている。In vitroで報告されているLicensed NK細胞の抗腫瘍活性強化が、生体内で固形がんの長期成績に与える影響について十分な知見はない。我々は遺伝子解析により個人の潜在的License経路の判定と肝細胞癌(HCC)術後再発予後に対する影響を検討した。

A. 研究目的

NK細胞活性は細胞表面に存在する抑制性受容体と活性化受容体により制御されていることが知られており、その中で自己のヒト白血球抗原(Human leukocyte antigen 以下HLA)を認識し、自己の細胞に対する寛容を誘導するKiller immunoglobulin-like receptor(以下KIR)は、遺伝的な多様性が報告されている。また、近年自己のHLAを認識する抑制性KIRを表出することで、NK細胞の潜在的な活性強化が生じることがIn vitroの研究で報告され「License」機構として知られるようになった。一方、KIRによって自己HLAを認識せずLicenseをうけないNK細胞も存在し、これらは「Unlicensed NK細胞」と呼ばれ、自己細胞からの抑制がかからないことからサイトカインによる活性環境下ではLicensed NK細胞と変わらないかもしくはそれを凌ぐ活性を有するという報告もなされている。Licenseに関わる抑制性KIRは5種類(KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1, 3DL2)存在

し、それぞれ特定のHLA配列を認識すること、抑制性KIRの保有、HLA遺伝子型は個体において遺伝的多様性を認めるため、潜在的に機能しうるKIR-HLAペアには個体差が存在することが知られている。

In vitroで報告されているLicensed/Unlicensed NK細胞の抗腫瘍活性が、生体内で固形がんの長期成績に与える影響について十分な知見はない。

我々は遺伝子解析により個人の潜在的License経路の判定と肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma 以下HCC)の術後再発予後に対する影響を検討した。

B. 研究方法

1997年～2010年に施行したHCCに対する初回肝切除症例170例を対象とした。術前肝予備能不良症例(Child-Pugh grade BまたはC)および非治癒切除症例は対象より除外した。患者血球より精製したDNAをrSSO-PCR法を用いてKIR, HLA 遺伝子タイピングを行った。

Propensity score matching法による調整後、再発予後解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて承認を得て実施している。

C. 研究結果

遺伝子タイピングの結果、個体内で機能する KIR-HLA ペアである KIR2DL1-C2, KIR2DL2-C1, KIR2DL3-C1, KIR3DL1-Bw4, KIR3DL2-A3/11 の保有はそれぞれ 14.1%, 10.0%, 98.2%, 80.0%, 15.9%であった。

これら遺伝子型は過去の健常日本人での報告と大きな差異は認めず、HCC患者に特徴的な遺伝子型の偏りは認めなかった。これらの遺伝的License経路の保有が単独でHCC術後再発予後に影響するかを検討するため、年齢、性別、背景肝、腫瘍個数、最大腫瘍径、組織学的分化度、脈管侵襲、肝内転移、切除断端陽性の有無、計9項目を用いてPropensity score matching法による調整後、再発予後解析を行った。Propensity matching解析の結果、単独のKIR-HLAペアの保有は再発予後に有意な影響を認めなかった(図1)。

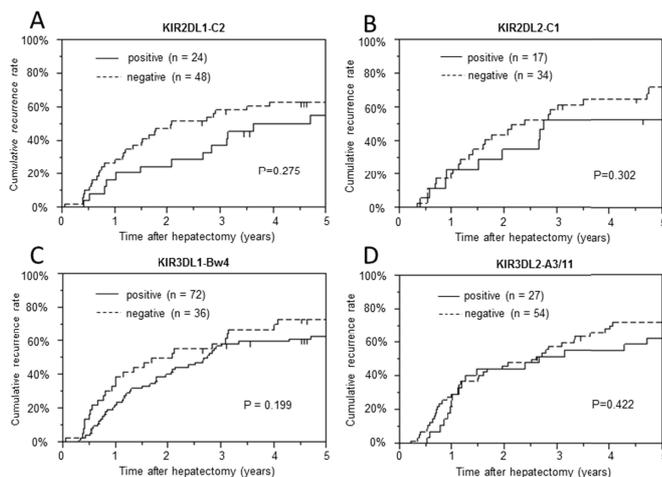


図1

しかし、個体における遺伝的なKIR-HLAペアの保有数により累積再発率曲線が階層化された(図2)。

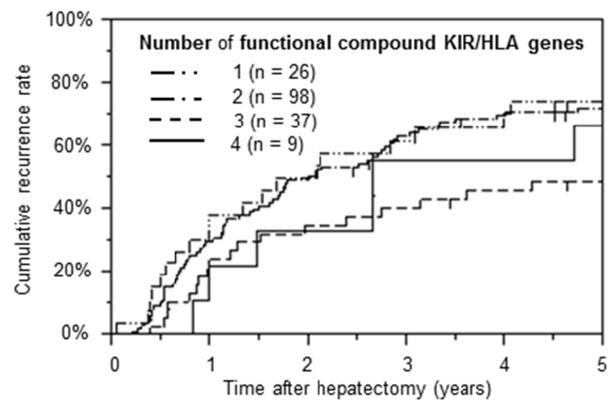


図2

そこで遺伝的に有効な KIR-HLA ペアが多い患者群(3個以下 Highly licensed NK 群)とペアが少ない群(2個以下 Poorly licensed NK 群)を同じく Propensity score matching法を用いて解析すると、Highly licensed NK 群の術後再発予後は Poorly licensed NK 群に比べ有意に良好であった(P = 0.0183, 調整 Hazard ratio 0.57, 95%信頼区間 0.35-0.90)(図3)。

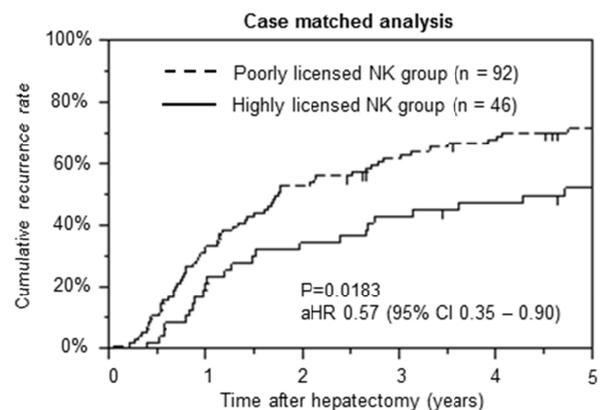


図3

この再発に対する有意性は HCV 感染の有無によるサブ解析では、非 HCV 感染患者群の解析では統計学的有意差を示したが、HCV 感染患者群の解析において統計学的有意差に至らなかった(図4)。

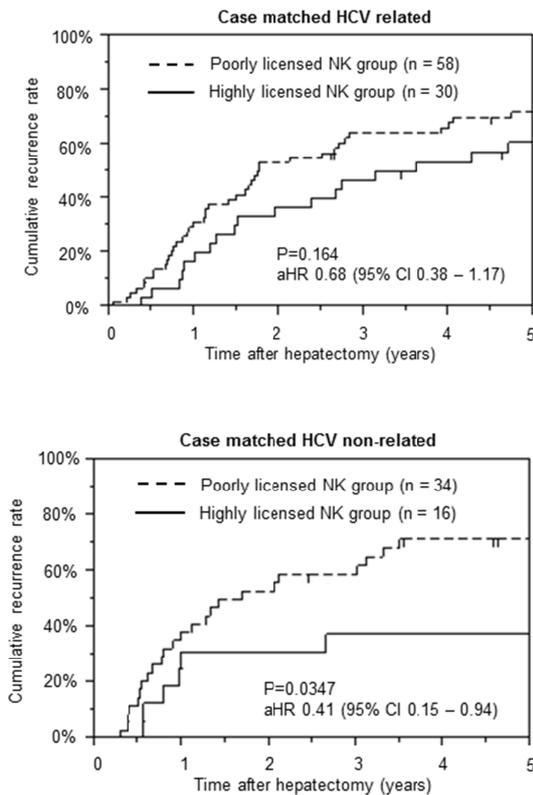


図4

D. 考察

治癒切除後のHCC再発は依然多く、残存腫瘍細胞からの再発、もしくは障害肝を背景としたDe novo発癌に分けられるが、いずれも宿主の抗腫瘍免疫による制御の影響を受けていると考えられる。NK細胞のLicense機構は、細胞レベルで複数のLicense経路の存在により、NK細胞の潜在活性強化がより増強されることが報告されている。

本研究により遺伝レベルのKIR-HLAペアの累積により、HCC術後再発予後が良好な患者群が存在し、NK細胞のLicense効果がHCC術後予後に強く関わることを示唆された。

また、HCVに関してはこれまでLicenseに関わるKIR-HLAペアのうちKIR2DL3-C1の保有による自然寛解率の増加が報告されているが、今回の研究結果におけるHCV感染患者でのLicense効果の減弱は、報告されているHCVウイルス表面分子を介したNK細胞活性抑制と矛盾しない結果であったと考える。

E. 結論

KIR-HLAによってもたらされるLicense効果を意図的に操作することができれば、HCCに対するNK細胞を用いた養子免疫療法を行う上で非常に強力なツールとなると考える。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

【総説】

1. 田中純子、片山恵子, HCV感染の疫学の変化, 肝胆臓, 2013;67(6):811-818.
2. 田中純子、片山恵子, B型肝炎の疫学 -キャリア率, キャリア数について-, 最新医学, 2013;68(3):14-21.
3. 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.

【原著】

1. Akita T, Ohisa M, Kimura Y, Fujimoto M, Miyakawa Y, Tanaka J, Validation and limitation of age-period-cohort model in simulating mortality due to hepatocellular carcinoma from 1940 to 2010 in Japan, Hepatology Research, 2013, in press.
2. Sato T, Do H S, Asao T, Akita T, Katayama K, Tatara K, Miyakawa Y, Tanaka J, Estimating numbers of persons with persistent hepatitis B virus infection transmitted vertically and horizontally in the birth cohort during 1950-1985 in Japan., Hepatology Research, 2013, in press.
3. Chen D-S, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN, Sung J, Tanaka J, Wakita T, Ward J, Wallace J, Report from a Viral

- Hepatitis Policy Forum on implementing the WHO framework for global action on viral hepatitis in North Asia, *Journal of Hepatology*, 2013;59(5):1073-1080.
4. Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tanaka J, Kagebayashi C, Satomura S, High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma, *Journal of Gastroenterology*, 2013, in press.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 松尾順子、片山恵子、中島歩、頼岡徳在、田中純子、広島透析患者肝炎 Study Group, 血液透析患者における肝炎ウイルス感染率と生命予後, *日本透析医会雑誌*, 2013;28(1):161-166.
 9. Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T, Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver disease with or without type 2 diabetes mellitus, *Journal of Gastroenterology*, 2013;48(4):515-525.
- 【著書】
1. 田中純子、片山恵子, 新しい診断と治療のABC 肝硬変, 最新医学, 最新医学社, 2013:20-30.
 2. 田中純子, B型肝炎に関する疫学調査の最新情報, B型肝炎 最新治療コンセンサス(別冊・医学のあゆみ), 医歯薬出版株式会社, 2013:5-12.
 3. 片山恵子、田中純子, ウイルス肝炎 最新の疫学, 診断と治療, 診断と治療社, 2013;101(9):1287-1292.
 4. 田中純子、片山恵子、松尾順子, わが国におけるHBV感染の疫学, de novo B型肝炎, 医薬ジャーナル社, 2013:14-29.
 5. 片山恵子、田中純子, 肝炎・肝癌の疫学, Annual Review 消化器, 中外医学社, 2013:88-93.
 6. 田中純子, HBV感染症のインパクト, HEPATOLOGY PRACTICE, 文光堂, 2013;1:27-35.
2. 学会発表
1. 田中純子, ウイルス肝炎・肝がんの疫学と対策, 第16回長崎肝癌研究会学術総会(長崎), 2014.02.19.
 2. 田中純子, 肝炎ウイルス健診、新しいHCV検査手順と今後の展望, 第46回日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会 ランチョンセミナー(広島), 2013.11.10.
 3. 田中純子, ウイルス肝炎の疫学と対策最前線, 第46回日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会(広島),

2013.11.09.

4. 田中純子, 肝癌死亡率の予測に関する APC モデルを用いた解析の試み, 第 72 回日本癌学会学術総会(横浜), 2013.10.05.
5. 田中純子, B 型・C 型肝炎の疫学, 第 7 回 SMART-C (Specific Molecule Antiviral tReatment Tokyo - Hepatitis C)(東京), 2013.06.22.

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）
（分担）研究報告書（平成 25 年度）

「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」
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

1. 研究要旨:これまで C 型慢性肝炎患者における肝移植後 HCV 再感染に対する PEG-IFN/ribavirin (RBV) 療法の治療効果に IL28B 遺伝子型が関与していることを報告したが本年度はさらに症例数を増やし検討した。生体肝移植後, genotype 1 型の HCV 再感染に対する PEG-IFN/RBV 療法の SVR 率は全体で 59% (16/27 例)であった。SVR 率をレシピエントの IL28B 遺伝子型 (rs8099917 SNP) 別に検討すると, TT で 68% (13/19 例)と TG/GG の 37% (3/8 例)に比べ高値であり, ドナーの IL28B 遺伝子多型別に検討すると TT で 68% (15/22 例)と TG/GG の 20% (1/5 例)に比べ有意に高値であった ($p=0.048$)。肝移植後の HCV 再感染に対する PEG-IFN/RBV 療法においてドナーおよびレシピエントの IL28B 遺伝子型がその治療効果に関与していることを表すものであった。またヒト肝細胞キメラマウスを用いてトロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤であるオザグレールおよびプロスタグランジン I の受容体 (IP) に対するアゴニストを投与し, その感染増殖に対する効果を検討したところいずれの薬剤も HCV の増殖を抑制した。

A. 研究目的

これまで C 型慢性肝炎患者における肝移植後の HCV 再感染に対する PEG-IFN/ribavirin (RBV) 併用療法の治療効果に IL28B 遺伝子(rs8099917) 多型が関与していることを報告した。本年度はさらに症例数を増やし検討した。また JFH1 感染性粒子産生系において HCV 感染性粒子産生阻害効果を示したトロンボキサン A₂ (TXA₂) 合成酵素 (TXAS) 阻害剤であるオザグレールおよびプロスタグランジン I の受容体 (IP) の in vivo における抗 HCV 効果をヒト肝細胞キメラマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

Genotype 1 型の C 型慢性肝炎患者に対する肝移植後に HCV 再感染を生じた 27 例において PEG-IFN/RBV のウイルス排除 (sustained virological response, SVR) 率と IL28B 遺伝子型 (rs8099917 SNP) の関連を検討した。またヒト肝細胞キメラマウスに genotype 1b 型患者血清を投与し, その 1 週後より 300 μ g/日のオザグレール(経口)あるいは 200 μ g/日の IP アゴニスト(皮下注)を 4 週間連日投与し, 1 週おき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

Genotype 1 の C 型慢性肝炎患者における肝移植後 HCV 再感染に対する PEG-IFN/RBV の

SVR率は全体で59%(16/27例)であった。SVR率をレシピエントのIL28B遺伝子型別に検討すると、TTで68%(13/19例)とTG/GGの37%(3/8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68%(15/22例)とTG/GGの20%(1/5例)に比べ有意に高値であった($p=0.048$)。これらの結果は、生体肝移植後のHCV再感染に対するPEG-IFN/RBVの治療効果においても、ドナーおよびレシピエントのいずれのIL28B遺伝子多型も関与していることを表すものであった。

ヒト肝細胞キメラマウスにおいて、オザグレールおよびIPアゴニスト投与群は非投与群に比べ血中HCV RNAが低値であり、これら薬剤のin vivoにおける抗HCV効果が示された。

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

1) Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice with Humanized Livers. Gastroenterology. 2013;145:658-667

2.学会発表

なし

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

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感染に伴う肝臓内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 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、肝組織の主要な抗原提示細胞であるマクロファージ（クッパー細胞）および類洞内皮細胞での SIRP および肝組織での CD47 の発現について検討した。さらに、CD47 と SIRP の結合阻害抗体による、オプソニン化 CD47 発現細胞のマクロファージによる貪食について解析を進め、抗 SIRP 抗体が外来抗原を表出する HCV 感染細胞の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における *in vivo* での免疫抑制能に関して検討し、類洞内皮細胞が HCV 由来ペプチド抗原提示により応答した T 細胞を抑制し免疫回避され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 を発見し、様々な細胞に発現する他の膜型分子である CD47 と細胞間で相互作用することで、細胞間シグナル CD47-SIRP 系を形成することを見出している。さらに、赤血球上に発現する CD47 とマクロファ-

ージ上に発現する SIRP との相互作用が、赤血球のマクロファージによる貪食を抑制的に制御することを明らかにしている。マクロファージなどの貪食細胞は、外来抗原を表出する細胞の貪食排除に重要な役割を果たしていることが知られているが、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。すなわち、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 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。しかしながら、HCV 感染細胞とマクロファージ間での CD47-SIRP 系の役割については、ほとんど明らかとはなっていない。

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。研究分担者は、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シスに陥り、抗原特異的に免疫寛容が誘導されることを見出してきている。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。しかしながら HCV 感染時の肝臓内での免疫反応抑制における類洞内皮細胞の役割は明らかになっていない。

そこで、本研究では、肝臓内の HCV に関する免疫機構、すなわちマクロファージの HCV 抗原提示機能および抗原提示を介した T 細胞機能制御における CD47-SIRP 系の役割、および肝類洞内皮細胞の 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、CD47-SIRP 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。

B. 研究方法

(1) SIRP の肝組織での主要なマクロファージであるクッパー細胞における発現を検討する目的で、マウス由来肝組

織を用い、組織免疫染色および FACS による解析を行った。また、マクロファージと同様に肝組織での感染免疫応答に関わると考えられる抗原提示細胞である肝類洞内皮細胞での SIRP の発現についても同様の解析を試みた。さらに、SIRP の生理的なりガンド分子である CD47 の発現を明らかにする目的で、マウス由来肝組織を用い免疫染色を行うことにより検討した。

(2) CD47-SIRP の相互作用の阻害が、HCV などのウイルス感染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、抗 SIRP 抗体によりオプソニン化された CD47 発現細胞の貪食について *in vitro*での貪食実験を行った。

(3) 類洞内皮細胞の分離法を検討し、単離した類洞内皮細胞の抗原提示能に関わる分子表出を FACS を用いて検討した。

(4) *in vivo* での類洞内皮細胞の抗原特異的な免疫抑制能を検証する予備的検討として、同種抗原を用いた T 細胞増殖抑制実験および同種心移植実験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物個体および動物培養細胞を用いた実験を行っており、ヒト検体を用いた実験を行ってはいない。また、動物実験においては、学内の動物実験委員会の承認を得た上で、諸規則に則り動物愛護の精神を持って行った。

C. 研究結果

(1) 抗 SIRP 抗体、およびマクロファージマーカーである F4/80 抗体、類洞内皮細胞のマーカーである CD107a 抗体による肝組織の免疫染色の結果、SIRP と F4/80 の免疫染色像に高い類似性を認めしたが、SIRP と CD107a との染色像では高い類似性は認められなかった。さらに、クッパー細胞および類洞内皮細胞における SIRP の発現の程度を FACS により評価したところ、F4/80、CD11b 陽性のクッパー細胞では SIRP の高発現を認めしたが、CD31、CD107a 陽性の類洞内皮細胞での SIRP の発現の程度は非常に低いものであった。また、抗 CD47 抗体を用いたマウス肝組織の免疫染色の解析から、肝組織全体において CD47 の発現が認められ、正常肝細胞に CD47 が発現していることが確認された。

(2) 予備的実験として、抗体によりオプソニン化された CD47 発現細胞に対するマクロファージの貪食能を CD47-SIRP 結合を解除する抗 SIRP 抗体が促進するかについて評価した。その結果、CD47-SIRP 結合を阻害する抗体では、マクロファージによる CD47 発現細胞の貪食の促進が認められたが、CD47-SIRP 結合を解除しない抗体では貪食の促進は認められなかった。また、抗体によりオプソニン化されていない CD47 発現細胞のマクロファージによる貪食については、両抗体ともに貪食の促進は認められなかった。

(3) マウス肝臓から類洞内皮細胞を単離する目的で、コラゲナーゼ digestion 法と内

皮細胞マーカーである CD105 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が可能であった。単離した類洞内皮細胞の FACS 解析では、CD105 陽性類洞内皮細胞では、抗原提示に必要なクラス II、CD40、CD86 を発現していた。さらにアポトーシス誘導分子である B7-H1 分子の表出も認めた。SIRP の発現検討では、発現は認めるものの CD31、CD107a 陽性細胞と同様、発現の程度は低いものであった。

(4) 予備的実験として単離した類洞内皮細胞を用いて、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った。類洞内皮細胞と共培養した T 細胞は、同じ MHC をもつ同種マウス脾細胞による 2 次刺激に対して明らかな増殖抑制が認められた。さらに経門脈的に同種類洞内皮細胞を投与し肝臓内に生着させた免疫不全マウスを免疫再構築したマウスでは、*in vitro* 抗原特異的免疫抑制を認め、さらに類洞内皮と同ドナーからの心移植では生着延長が得られた。

D. 考察

肝組織における SIRP の発現様式や肝臓の主要なマクロファージであるクッパー細胞での発現について、これまで詳細な解析は十分になされていなかった。今回、マウス個体を用い、肝組織の免疫染色および FACS による解析から、F4/80、CD11b 陽性のクッパー細胞において SIRP が高度に発現していることが明らかと

なった。また、CD47 は一般的に様々な細胞に発現すると考えられているが、本研究において CD47 が肝細胞に発現していることが免疫組織により確認された。すなわち、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は、CD47-SIRP 系がその貪食制御に関与している可能性があると考えられた。また、興味深いことに、最近、がん細胞上に発現する CD47 がマクロファージ上の SIRP と会合することでがん細胞の貪食を抑制すること、さらに、がん細胞では正常細胞に比べて CD47 を高発現しており、この高発現がマクロファージからの貪食回避に重要であることが報告されている。このことから、今後、HCV 感染により、肝細胞において CD47 の発現量に変動するかについて詳細に解析することも重要であると考えられる。一方、CD47-SIRP 系の相互作用の阻害がマクロファージによるウイルス感染細胞の貪食の促進につながるかについて予備的検討を試みたところ、CD47-SIRP の相互作用を阻害する抗 SIRP 抗体が抗体によりオプソニン化された CD47 発現細胞の貪食を促進する活性を有することが確認された。このことから、今後、マクロファージによるウイルス感染前もしくは後の肝細胞の貪食が CD47-SIRP 系を阻害する抗体により促進されるかについて検討を進めて行く必要がある。類洞内皮細胞に関しては本研究によって高純度で単離する方法を確立できた。単

離した類洞内皮細胞の細胞表面プロファイルを検討した結果、クラス II、CD40、CD86 の表出を認め、抗原提示細胞としての機能を備えていると考えられた。同時に B7-H1 表出も認め、抑制性細胞であることが示唆された。このことは、続いて行った *in vitro* および *in vivo* での実験にて確認され、同種抗原に対する T 細胞応答抑制効果が明らかとなった。類洞内皮細胞にも SIRP- の表出を認めたが、その発現はマクロファージと比べて低く、免疫抑制能への関与は今後の検討する必要がある。

E. 結論

本研究により、膜型分子である SIRP が肝組織の主要なマクロファージであるクッパー細胞に高度に発現すること、また、CD47 が肝細胞に発現することから、CD47-SIRP 系がクッパー細胞による肝細胞の貪食制御に関与する可能性が示された。また、CD47 と SIRP の結合を阻害する抗 SIRP 抗体が、マクロファージの貪食能を促進する活性を持つことから、今後、HCV 感染細胞のマクロファージによる貪食排除の促進への抗 SIRP 抗体の応用の可能性が期待された。また類洞内皮細胞に関しては高純度な類洞内皮細胞の分離方法を確立した。分離した類洞内皮を用いた解析より、抗原提示に必要な分子を発現し抗原提示細胞であることが示されると同時に、抗原特異的に免疫抑制能を持つことが確認された。さらに貪食機能を制御する膜型分子である

SIRP を発現しており、CD47-SIRP 系を介した HCV 感染細胞の貪食機構への関与を今後検討していく予定である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRP α signaling system: its physiological roles and therapeutic application. J Biochem, 2014; in press.
2. Murata Y, Saito Y, Kaneko T, Kotani T, Kaneko Y, Ohnishi H, Matozaki T. Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRP α signaling pathway. Methods, 2014; 65(2):254-9.
3. Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K. The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. Exp Hematol, 2014; 42: 163-171
4. Koskinen C, Persson E, Baldock P, Stenberg A, Bostrom I, Matozaki T, Oldenborg PA, Lundberg P. Lack of CD47 impairs bone cell differentiation and results in an osteopenic phenotype in vivo due to impaired signal regulatory protein alpha (SIRP α) signaling. J Biol Chem, 2013; 288(41):29333-44.
5. Zen K, Guo Y, Bian Z, Lv Z, Zhu D, Matozaki T, Liu Y. Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP α cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state. Nat Commun, 2013; 4:2436.
6. Takahashi S, Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Hamatani H, Watanabe M, Ikeuchi H, Kaneko Y, Maeshima A, Aoki T, Ohnishi H, Matozaki T, Nojima Y. SIRP α signaling regulates podocyte structure and function. Am J Physiol Renal Physiol, 2013; 305(6):F861-70.
7. Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic *Sirpa* is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. Blood, 2013; 121(8):1316-25.
8. Banshodani M, Onoe T, Shishida M, Tahara H, Hashimoto S, Igarashi Y, Tanaka Y, Ohdan H. Adoptive transfer of

allogeneic liver sinusoidal endothelial cells specifically inhibits T-cell responses to cognate stimuli.

Cell Transplant. 2013;22(9):1695-708.

9. Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Attenuation of portal hypertension by continuous portal infusion of PGE1 and immunologic impact in adult-to-adult living-donor liver transplantation. Transplantation. 2013 Jun 27;95(12):1521-7.

10. Yanai H, Matsuda A, An J, Koshihara R, Nishio J, Negishi H, Ikushima H, Onoe T, Ohdan H, Yoshida N, Taniguchi T. Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Dec 17;110(51):20699-704.

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

ヒト不死化肝細胞において HCV タンパク質により発現変動する自然免疫応答関連遺伝子の探索

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）により発現変動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を作成し、以下に示すような成果を得た。（1）マイクロアレイによる網羅的解析により、HCV タンパク質の発現がNK細胞により認識されるリガンドのシグナル強度の低下に関与していることが分かった。（2）定量的RT-PCR法により、（1）のリガンドの遺伝子発現量の低下が確認された。

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感染は慢性肝炎を引き起こし、この慢性肝炎が将来的に肝硬変や肝がんに行進する可能性が高く、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。最近、プロテアーゼ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%程度に改善されたが、貧血や皮膚症状などの副作用や、耐性株の出現等の問題点も指摘されている。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必要とされる。

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殺傷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が報告されている。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。そこで、本研究では、非腫瘍性の表現型を持つヒト不死化肝PH5CH8細胞において、HCVタンパク質を発現させたときに表面抗原の発現等がどのように変動するかをマイクロアレイ法により網羅的に解析して明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞の作成。

約9600塩基からなるHCVのゲノムRNA上には、3000アミノ酸で構成された1つの前駆体ポリペプチドがコードされている。翻訳されたポリペプチドは宿主あるいはウイルス由来のプロテアーゼにより切断され、ウイルス粒子を構成する構造領域であるコア (core)、エンベロープ (E) 1、E2及びp7と、非構造領域 (NS: non-structural) であるNS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A及びNS5Bの全10種類のウイルスタンパク質が産生される。今年度は前半領域 (coreタンパク質からNS2タンパク質)、あるいは後半領域のHCVタンパク質 (NS3タンパク質からNS5Bタンパク質) を発現するためのベクターを作成し、これらのHCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝PH5CH8細胞を作成した。

最初に、O株 (遺伝子型1b) 由来のHCVの全遺伝子構造物を含むベクターを鋳型として、

前半領域、あるいは後半領域のHCVタンパク質をコードしている遺伝子領域をPCR法にて増幅した。増幅したPCR断片はレトロウイルスベクター (pCX4bsr) に導入した。このレトロウイルスベクターはプラスサイズ耐性遺伝子をコードしており、HCVタンパク質を発現する細胞のみを選択することが可能である。

次に、作成した発現ベクターをパッケージング細胞 (BOSC23細胞) にトランスフェクション後、前半あるいは後半領域のHCVタンパク質をコードしている遺伝子を含むレトロウイルスを回収した。また、ベクターのみも同様の処理を行い、コントロールとした。回収したレトロウイルスはヒト不死化肝PH5CH8細胞に感染後、プラスサイズにより選択培養し、コントロール細胞 (PH5CH8/Control細胞)、前半領域のHCVタンパク質を発現する細胞 (PH5CH8/C-NS2細胞)、及び後半領域のHCVタンパク質を発現する細胞 (PH5CH8/NS3-5B細胞) を作成した。

(2) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞でのマイクロアレイ解析。

(1) で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ヒト不死化肝PH5CH8細胞 (PH5CH8/C-NS2細胞とPH5CH8/NS3-5B細胞) とコントロール細胞 (PH5CH8/Control細胞) から、全RNAを抽出した。抽出した全RNAを用いたマイクロアレイ解析はタカラバイオ社の受託サービス (45,000プローブからなるAffymetrix GeneChipを使用) を利用した。得られたデータから、自然免疫応答に関わる宿主因子のシグナル強度を抽出した。

(3) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞での表面抗原の遺伝子発現量の定量。

(2) で得られたマイクロアレイのデータが実際の遺伝子発現量を反映しているかどうか

かを確認するために、定量的RT-PCR法により、自然免疫応答に関わる宿主因子の遺伝子発現量を定量した。

(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ているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。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) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞の作成。

前半あるいは後半領域のHCVタンパク質をコードしている遺伝子を含むレトロウイルスをPH5CH8細胞に感染させ、プラストサイジンを含む培地中で約2週間培養した。この選択培養により、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ヒト不死化肝PH5CH8細胞 (PH5CH8/C-NS2細胞とPH5CH8/NS3-5B細胞) を作成することができた。また、コントロール細胞 (PH5CH8/Control細胞) も同様に作成した。これらの細胞内のcore、NS3あるいはNS5Bタンパク質の発現はWestern blot法により確認することができた。

(2) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞でのマイクロアレイ解析。

(1) で作成したPH5CH8/C-NS2細胞、PH5CH8/NS3-5B細胞とPH5CH8/Control細胞のマイクロアレイ解析はタカラバイオ社の受託サービスを利用した。マイクロアレイ解析により得られたデータを用いて、自然免疫応答に関わる宿主因子のシグナル強度をこれらの細胞間で比較した。その結果、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞では、細胞死受容体 (DR4、DR5、DcR1及びDcR2) のシグナル強度には変化がないことがわかった。一方、

NK細胞により認識される主要組織適合抗原 (MHC) の古典的クラス1分子に属するヒト白血球抗原 (HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F及びHLA-G) や非古典的クラス1分子に属するMICAやMICBのシグナル強度にも同様に変化がなかった。しかしながら、同じく非古典的クラス1分子に属するULBP1はPH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞において、そのシグナル強度は顕著に低下していた。ULBP2とULBP4はPH5CH8/C-NS2細胞において、そのシグナル強度は低下していたが、PH5CH8/NS3-5B細胞においては変化がなかった。また、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞では、ULBP3のシグナル強度には変化がなかった。

(3) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞での表面抗原の遺伝子発現量の定量。

(2) でシグナル強度の低下が確認されたリガンドの遺伝子発現量を、定量的RT-PCR法により定量した。その結果、マイクロアレイ解析の結果と同様に、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞において、ULBP1の遺伝子発現量は有為に低下していた。また、PH5CH8/C-NS2細胞において、ULBP2の遺伝子発現量は有為に低下していたが、PH5CH8/NS3-5B細胞においては変化がなかった。これらの結果は、HCVタンパク質の発現がULBP1などのリガンドの遺伝子発現量に影響を与えていることを示唆している。HCVはこれらのリガンド量に影響を与えることにより、NK細胞による認識から逸脱している可能性が考えられる。

D. 考察

(1) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞の作成。

今年度、前半領域のHCVタンパク質を発現する細胞 (PH5CH8/C-NS2細胞) 及び後半領域のHCVタンパク質を発現する細胞 (PH5CH8/NS3-5B細胞) を作成することができた。次年

度以降、HCVの全タンパク質を発現する細胞の作成を試みる。また、本研究で見出した現象に關与するHCVタンパク質を特定するために、個々のHCVタンパク質を発現する細胞の作成も同様に試みる。

(2) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞でのマイクロアレイ解析。

今年度、前半領域あるいは後半領域のHCVタンパク質を発現するPH5CH8細胞において、45,000プローブからなるAffymetrix GeneChipを用いるマイクロアレイ解析を行った。この膨大なデータの中から、細胞死受容体、主要組織適合抗原(MHC)の古典的クラス1分子に属するヒト白血球抗原や非古典的クラス1分子に属するMICA、MICBやULBPファミリーのシグナル強度を解析した。次年度以降、その他の自然免疫応答関連遺伝子のシグナル強度の解析やパスウェイ解析を行い、遺伝子変動の起こったパスウェイの推定も試みる。

(3) HCVタンパク質を恒常的に発現するヒト不死化肝細胞での表面抗原の遺伝子発現量の定量。

マイクロアレイによる網羅的解析により、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞において、シグナル強度の低下が確認されたULBP1は、定量的RT-PCR法においても同様に、その遺伝子発現量は有為に低下していた。次年度以降、PH5CH8/C-NS2細胞及びPH5CH8/NS3-5B細胞におけるULBP1のタンパク質レベルをWestern blot法により検討する。また、フローサイトメーターにより、これらの細胞の細胞表面に表出しているULBP1量を測定する予定である。NK細胞は細胞表面に表出しているULBP1を認識することにより、インターフェロン- (抗ウイルス効果に關与)、アラキドン酸(炎症効果に關与)や細胞障害効果を示すことが報告されている。そこで、HCVタンパク質を恒常的に発現するPH5CH8細胞とNK細胞との共培養下で、これらの効果が確認

されるかどうかも次年度以降の検討課題である。また、今年度、見出した現象に關与するHCVタンパク質を特定することも今後、必要であると考えられる。

E. 結論

今年度の成果は以下のとおりである。

- (1) 前半あるいは後半領域のHCVタンパク質を発現するヒト不死化肝細胞を作成した
- (2) マイクロアレイによる網羅的解析により、前半あるいは後半領域のHCVタンパク質を発現するヒト不死化肝細胞において、NK細胞により認識されるリガンド(ULBP1等)のシグナル強度が低下していることを見出した
- (3) これらのリガンドの遺伝子発現量の低下を定量的RT-PCR法により確認した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, Kato N, Lemon SM. Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells. *PLoS Pathogens*, 9: e1003345 (2013).
- 2) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Adenosin kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin. *Hepatology*, 58: 1236-1244 (2013).
- 3) Ueda Y, Takeda M, Mori K, Dansako H, Wakita T, Kim HS, Sato A, Wataya Y, Ikeda M, Kato N. New preclinical antimalarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLoS ONE*, 8: e72519 (2013).
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) Dansako H, Hiramoto H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Rab18 is required for hepatitis C virus through the association with core protein around lipid droplet. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October, 2013.
- 2) Ueda Y, Mori K, Sato S, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Anti-HCV activity of *Cordyceps militaris* used as a Chinese herbal medicine. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October, 2013.
- 3) 團迫 浩方、平本 洸貴、池田 正徳、脇田 隆字、加藤 宣之. Rab18 は C 型肝炎ウイルスの感染性粒子形成に重要な宿主因子である. 第 61 回 日本ウイルス学会学術集会、神戸、2013 年 11 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iPS細胞からNK細胞の分化誘導を試みた。iPS細胞からCD34⁺細胞の分化誘導効率は3~10%と低く、CD34⁺細胞からCD45⁺CD56⁺細胞（NK細胞）への分化誘導効率は10~20%であった。分化誘導効率が低い原因を明らかにするため、得られたCD34⁺細胞における寿命・老化関連遺伝子の発現を解析したところ、iPS細胞から分化誘導したCD34⁺細胞では老化遺伝子p21及びp16の発現の顕著な上昇は認められなかったが、寿命の延長に関連するテロメラーゼ及びBmi-1の発現が強く抑制されていた。

A. 研究目的

ヒトiPS細胞からCD45⁺CD56⁺細胞(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。KaufmanらのヒトES細胞からのNK細胞の分化誘導法にしたがい、iPS細胞からCD34⁺細胞、及びCD34⁺細胞からNK細胞への分化誘導を行ったところ、その効率はそれぞれ3~10%と10~20%であった。一方、ヒト末梢血由来CD34⁺細胞は90%以上の高効率でNK細胞に分化する能力を有している。

本研究は、iPS細胞からNK細胞への分化誘導効率が低い原因を明らかにする目的で、寿命・老化関連遺伝子の発現解析を行った。

B. 研究方法

iPS細胞からCD34⁺細胞へ分化誘導開始14, 21, 28日後のサンプル及び末梢血CD34陽性細胞からRNAを抽出し、CD34, hTERT, Bmi-1, p21, p16の発現をqRT-PCRで比較検討した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

iPS細胞から分化誘導したCD34⁺細胞におけるCD34 mRNAの発現を、末梢血由来CD34⁺細胞と比較したところ、分化誘導28日のiPS細胞由来CD34⁺細胞におけるCD34 mRNAの発現レベルは、末梢血由来CD34⁺細胞と同等であった。この結果から、CD34 mRNAの発現レベルからみた分化の程度は、iPS細胞由来CD34⁺細胞と末梢血由来CD34⁺細胞は同等であることが示唆された。

次に、老化関連遺伝子p16遺伝子の発現レベルを比較したところ、末梢血由来CD34⁺細胞と比較して、分化誘導28日のiPS細胞由来CD34⁺細胞においてp16 mRNAの発現はやや上昇していた。一方、もう一つの老化関連遺伝子p21の発現レベルは、末梢血由来CD34⁺細胞と比較して、iPS細胞由来CD34⁺細胞にでは1/10程度と低レベルであった。

さらに、細胞の分裂寿命の延長に働くテロ

メラゼ及びBmi-1の発現を調べたところ、分化誘導28日のiPS細胞由来CD34+細胞において、テロメラゼ及びBmi-1の発現はどちらも1/5程度であった。

D. 考察

以上の結果から、末梢血由来CD34+細胞からNK細胞への分化誘導効率と比較して、iPS細胞由来CD34+細胞からのNK細胞への分化誘導効率が非常に低い原因として、細胞の分裂寿命の延長に働くテロメラゼ及びBmi-1の発現の低下が強く示唆された。

E. 結論

iPS細胞由来CD34+細胞からのNK細胞への分化誘導をより効率的に行うためには、分裂能の低下を抑制する分化誘導法や、積極的に分裂能を高めるような遺伝子操作を行った細胞株の樹立が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Shiotani, B., Nguyen, H.D., Håkansson, P., Maréchal, A., Tse, A., Tahara, H., Zou, L.
Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1
Cell Rep. 3. 1651–1662. 2013

Tahara, H., Kay, M.A., Yasui, W., Tahara,

E.

MicroRNAs in Cancer: the 22nd Hiroshima Cancer Seminar/the 4th Japanese Association for RNA Interference Joint International Symposium, 30 August 2012, Grand Prince Hotel Hiroshima.

Jpn J Clin Oncol. 46. 579-582. 2013

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。

『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 幹細胞治療研究センター
病態解析領域 特任准教授

研究要旨

我々は『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効果のメカニズムを解明する目的で、肝移植後に投与されたNK細胞の生体内動態を末梢血のキメリズム解析/HLA-Flow法で検討した。NK療法症例7例のうち、有意な頻度のドナー由来細胞を検出できたのは5例であったが、検出されたドナー由来細胞のフェノタイプは様々であった。一方、NK療法非施行の2例でも、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された。移植後のドナー肝臓からはドナー由来の血液細胞が末梢血流入するので、輸注したNK由来細胞をこれらと区別して検出するためには、輸注する細胞を検出するために何らかの標識を施すことが必要と思われる。

A. 研究目的

我々の研究目的は、現在広島大学と米国マイアミ大学で施行中の『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』において、抗肝癌・HCV効果のメカニズムを解明することである。そのため平成25年度は、肝移植後に投与されたNK細胞の生体内動態を知る目的で、NK細胞移入療法後に経時的に採取された末梢血検体をキメリズム解析/HLA-Flow法で解析した。

B. 研究方法

【患者と検体】

解析対象患者は、広島大学医学部消化器・移植外科学で生体肝移植を受けたミラノ基準外肝癌の患者である。NK細胞移入療法は、生体肝移植後3日目に行なわれた。患者の末梢血の採取は、通常は移植後1、3、6、13、20、27日目に行った。移植後1および3日目の検体は、NK細胞移入療法が行なわれる前に採血された。採血後、末梢血からファイコール比重遠心法で単核細胞を分離し、凍害保護液を添加して凍結保存した。

【染色とフローサイトメトリー解析】

東大医科研で解凍後に蛍光標識抗体で染色し、BD FACS Aria II SORP (Becton Dickinson社)で測定した。得られたFCSデータをFlowJoソフトウェアで解析し、白血球サブセットごとのキメリズム、およびNK細胞分画におけるTRAIL分子の発現レベルを解析した。典型例として、症例1のキメリズム解析に用いた蛍光標識抗体の組合せを表1に示す。

広島大学から提供された凍結保存検体は、NK療法症例が9例、NK療法非施行症例が3例であった。NK療法を行なった9症例中の2例では、ドナーとレシピエントのHLAの組合せからHLA-Flow法によるキメリズム解析が困難と判断され、残り7例を解析した。NK療法を行なわなかった3症例のうち、1例では抗HLA-A1抗体がレシピエントHLA-A*01:02を染色できず、キメリズムを解析できなかった（表2）。

（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

表1 症例1のキメリズム解析に使用した染色組合せ

CDナンバーの下に会社名とクローン名を記す。

Stain 1: Lineage-specific chimerism						φSA-APC				
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	Pacific Blue	Pacific Orange
A2(R)	CD253	CD235a/ PI	CD8	CD56	CD3	Biotin-A9(D)	CD16	CD19	CD4	CD14
AbD	BL	BL /-	BL	BDP	inv	OL	BL	BL	BL	CAL
BB7.2	RIK-2	HIR2	RPA-T8	B159	S4.1	IH0964	3G8	HIB19	RPA-T4	Tuk4

Stain 2: Isotype control for Stain 1						φSA-APC				
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	Pacific Blue	Pacific Orange
A2(R)	IgG1	CD235a/ PI	CD8	CD56	CD3	Biotin-A9(D)	CD16	CD19	CD4	CD14
AbD	BL	BL /-	BL	BDP	inv	OL	BL	BL	BL	CAL
BB7.2	MOPC-21	HIR2	RPA-T8	B159	S4.1	IH0964	3G8	HIB19	RPA-T4	Tuk4

AbD, AbD-serotec; BL, BioLegend; BDP, BD Pharmingen; inv, invitrogen; OL, One Lambda; CAL, CALTAG invitrogen

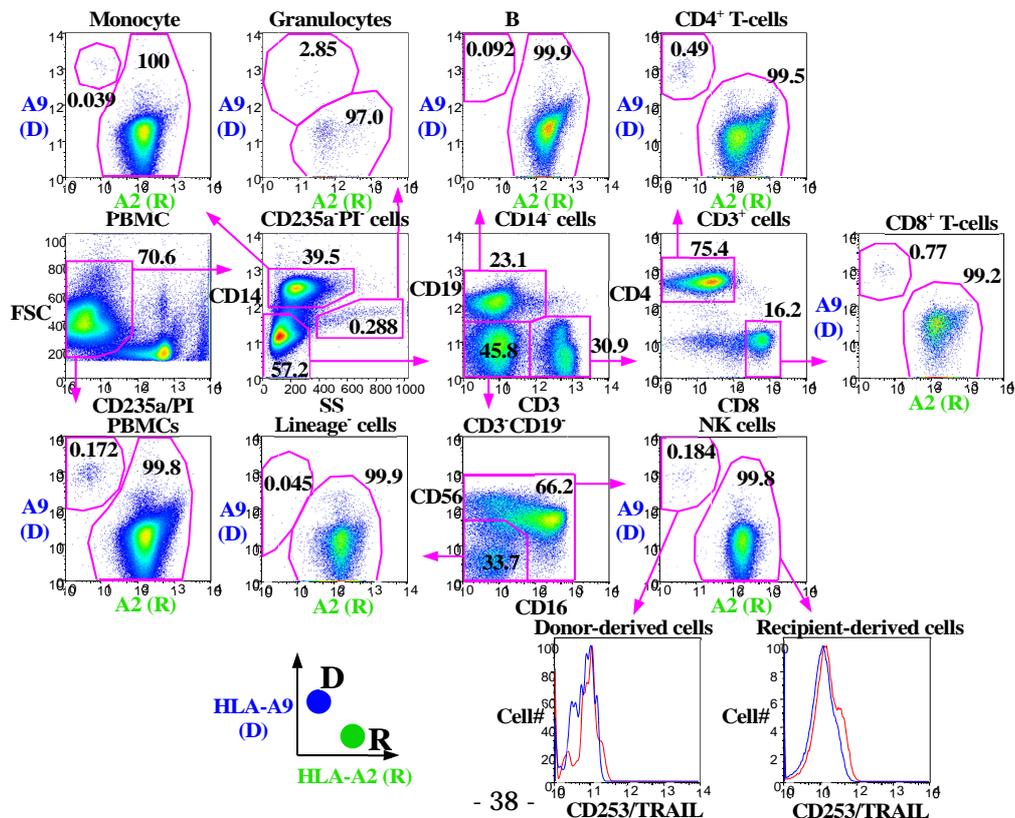
表2 症例解析の結果

赤文字の採血日は、有意な頻度（全単核細胞中0.1%以上）のドナー由来細胞が検出された日を表す。紫文字の採血日は、解析細胞数が少なかったり、抗体の染色性が不良であったりしたため解析ができなかった日を表す。

Date of Analysis	UPN	Sampling Date	Donor		Recipient	
			HLA-A	HLA-B	HLA-A	HLA-B
NK therapy (+)						
120412	Case 1	Day 20	24:03/33:03	03:02/07:02	02:07/33:03	46:01/58:01
120511	Case 2	Day 3, 16	24:02/24:02	15:07/40:02	24:02/02:01	15:07/35:01
120522	Case 3	Day 6, 13, 20, 24; Donor	11:01/31:01	40:01/48:01	31:01/33:03	40:01/44:03
120522	Case 4	Day 6, 13, 20; Donor	31:01/31:01	07:02/35:01	24:02/31:01	07:02/54:01
120525	Case 5	Day 1, 13, 20, 27; Donor	02:07/24:02	46:01/54:01	24:02/33:03	44:03/54:01
120525	Case 6	Day 10, 13, 20, 27; Donor	11:01/31:01	15:01/55:02	24:02/26:03	15:01/46:01
120525	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						
120525	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
131113	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
131114	Case 10	Day 3, 6, 13, 20, 27; Donor	11:01/24:02	07:02/40:01	11:01/01:02	07:02/40:01

Anti-HLA-A1 antibody (clone: H0331) does not stain HLA-A*01:02-positive cells

図1 症例1のフローサイトメトリーによるキメリズム解析



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

解析を行なったNK療法症例7例のうち、有意な頻度（全単核細胞中で0.1%以上）のドナー由来細胞を検出できたのは5例であった（表2）。ドナー由来細胞の頻度は、最も高いものでも全単核細胞中で0.67%であった。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。図1に典型的な解析結果（症例1、移植後20日目）を示す。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発現レベルが高い症例は無かった（図1）。

一方、解析を行なったNK療法非施行の2例でも、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された（表2）。

D. 考察

広島大学では肝臓移植に際し、肝グラフト内の血液を体外で灌流し、その排液から大量の未成熟NK細胞が分離して、抗癌分子（TRAIL）を誘導することに成功している。さらに、これらの活性化NK細胞を用いた制癌免疫療法をミラノ基準外肝癌に対する肝移植患者へ臨床導入し、無再発生存率の改善を確認した。したがって、NK細胞移入療法が抗肝癌作用を発揮していることは間違いない。

NK細胞移入療法の抗肝癌作用のメカニズムとして、移入された肝由来活性化NK細胞が

患者の体内で抗腫瘍効果を発揮していることが予想される。しかしながら、そのことをヒトの体内で直接証明するのは極めて困難である。そこで本年度の研究では、移入した肝由来活性化NK細胞がNK療法後の患者末梢血で実際に検出されるのか検討した。

本細胞療法では、 $2 - 5 \times 10^8$ 個の肝臓由来細胞（NK細胞の頻度は平均46.4%）を3日間の活性化培養後に輸注している（Ohira M, et al. J. Clin. Invest. 119: 3226-3235, 2009）。したがって、NK細胞数が培養中に変化しなかったと仮定すると、輸注されるNK細胞は 2×10^8 個程度と推定される。それらがレシピエントに輸注され、全血液中に均等に分散したとすれば、 $2 \times 10^8 \text{ cells} / 5,000 \text{ ml} = 40 \text{ cells} / \mu\text{l}$ の頻度となる。末梢血におけるNK細胞の頻度は個人差が大きいが、 $300 \text{ cells} / \mu\text{l}$ とすると、約10%がドナー由来のNK細胞で占められる。NK細胞の一部は培養中や輸注後に破壊されたり、血管外の臓器・組織に分布すると考えられるが、末梢血のキメリズム解析 / HLA-Flow法の検出感度は0.1%以下であるから、輸注されたNK細胞を検出することは理論上不可能ではない。

解析の結果、NK療法を施行した7症例において、有意な頻度のドナー由来細胞が検出されたのは5例のみであった。また、それら5例においても、ドナー由来細胞のうちNK細胞がとくに高頻度である症例はなかった。また、ドナー由来NK細胞表面には、TRAIL分子の発現は認められなかった。一方、NK療法非施行症例の2例においても、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された。これは、移植されたドナー肝臓の血管系に付着していた血液細胞が遊離して、レシピエントの流血中に流れ込んだものと思われる。

E. 結論

NK細胞移入療法を受けた症例において、移植肝臓から流血中に流入したと思われるNK細胞を明らかに上回る頻度のドナー由来のTRAIL陽性NK細胞は、いずれの症例でも検出されなかった。また、NK細胞移入療法前（移

植後1日目と3日目)の末梢血や、NK細胞移入療法自体を受けていない患者においても、肝移植後にドナー由来細胞が検出された。それらは移植されたドナー肝臓の血管から遊離したドナー由来の血液細胞と思われた。

したがって、輸注したNK細胞を末梢血で検出しようと試みる場合、移植されたドナー肝臓から遊離した細胞と区別する必要があり、我々が使用した方法論で証明することは困難と思われた。

NK細胞移入療法で輸注された細胞を特異的に検出するためには、細胞療法に使用する培養細胞に何らかの標識を施す必要がある。今後、移入した細胞の末梢血での動態を把握するための標識方法を考えたい。また、移植後にドナー肝臓から遊離して末梢血に存在するドナー由来細胞については、移植された臓器に対する免疫寛容の誘導など、その生理的な意義が注目される。今後の検討課題として注目したい。

F. 健康危険情報

特になし。

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。

iPS 細胞および CD34⁺ 細胞からの NK 細胞誘導と効率化の検討

研究代表者 大段秀樹 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授
研究分担者 田中友加 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 助教

研究要旨 本研究では、iPS 細胞および CD34⁺細胞から抗 HCV 効果を有する活性化 Natural killer(NK)細胞の分化誘導法の改良を実施した。誘導 NK 細胞が抗 HCV 効果を発揮するために必要な NK 細胞機能分子の探索と、感染抑制にかかわるサイトカインの検索を *in vitro* assay で評価した。さらに、HCV 持続感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルを用い、*in vivo* 感染実験による感染抑制能の評価と感染防御あるいは感染助長に關与する分子の探索を行った。その結果、抗 HCV 効果には誘導 NK 細胞の NKG2D、CD226 発現、IFN- γ 産生能が重要であることがわかった。その一方で、CD11b/CD11c 陽性の骨髓系細胞の混入は感染を助長する可能性が高いことが示唆された。

A . 研究目的

一般に、ウイルスが感染すると natural killer (NK)細胞の非特異的応答によりウイルスは排除される。しかし、C型ウイルス(HCV)感染ではHCVのE2蛋白とNK細胞上のCD81分子の結合によってNK細胞機能が抑制され、持続感染に移行する。我々は、肝未成熟NK細胞をIL-2存在下で賦活化した場合、CD81を介した抑制機構に抵抗性を示し、強いHCV複製抑制効果を誘導し得た(特開2007-332103)。さらに、多機能造血幹細胞やiPS細胞から抗HCV効果を有するNK細胞の誘導に成功した。本研究では、これらの自然免疫リモデリング技術を応用して、HCVが免疫応答を回避し持続感染に移行する機構を断ち切る根治療法を確立するため、NK細胞への分化誘導効率とウイルス抑制にかかわる機能分子の探索を実施した。

B . 研究方法

1 . CD34⁺血液幹細胞由来リモデリングNK細胞のHCV感染抑制能の*in vivo*評価

CD34⁺血液幹細胞をRONZA社のX-VIVO mediumにStem Cell Factor(SCF)、Flt-3、Interleukin(IL)-15、IL-7、Human AB血清を加え28日間培養後、NK細胞活性化を目的としてIL-12およびIL-18をDay25とDay28に添加した。これまでの研究において、培養28日におけるNK細胞の誘導効率は、20~95%とロット間で差を認めているため、誘導細胞を磁気ソーティング法によってNK細胞群と非NK細胞群に分離し、各々のHCV感染抑制能についてHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルを用いて評価した。

2. リモデリングNK細胞の *in vitro* 感染抑制能の評価

NK細胞のHCVウイルス増幅抑制効果について、HCVレプリコン保持肝細胞株(Huh-7)をTarget cellとして *in vitro* replicon assay systemで評価した。E:T ratio=10:1で、CD34⁺血液幹細胞から誘導したNK細胞あるいは非NK細胞とHCVレプリコン保持肝細胞株を共培養し、48時間後のHCVレプリコン細胞のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。また、培養上清中のサイトカインをCBA assay法で測定した。

NK細胞はIFN- γ 介在性に抗HCV効果を発揮することがわかっているため、anti-IFN- γ ブロッキング抗体によってHCV増幅抑制能が減弱するか否かを検討した。また、最近TNF- α がHCVの感染を助長するとの報告があるため、anti-TNF- α ブロッキング抗体によるHCV複製能の変化についても検討した。

3. HCV 感染防御に関わるNK細胞機能分子の探索

分化誘導NK細胞の表面抗原をフローサイトメトリーで解析し、活性化および抑制性機能分子とサイトカイン産生能とHCV感染ヒト肝細胞キメラマウスでの *in vivo* 感染抑制能との関連性について解析した。さらに、NK細胞以外で誘導されている細胞群の同定を試みた。

4. iPS 誘導性NK細胞の誘導効率の検討

ヒト線維芽細胞由来のiPS細胞株(01株)を用いて、M210-B4(マウス骨髄線維芽細胞)とともに24日間培養し、造血幹細胞(CD34⁺CD45⁺)に分化させ、その後磁気ソーティング法でCD34⁺細胞を分離後、AFT-024(マウス胎児肝線維芽細胞)、サイトカイン(IL-15, IL-7, SCF, Flt3-L, IL-3)とともに30日間培養し、NK細胞に分化させている。細胞増殖率と形態学的評価とともにフローサイトメトリーによるNK細胞分化効率を解析した。

5. 末梢血CD34⁺細胞からのNK細胞誘導

骨髄からではなく末梢血からCD34⁺細胞を効率良く採取しNK細胞をリモデリングする手法は、今後臨床応用するうえで有用である。そこで、同意を得られた健常人ボランティアの末梢血から採取したCD34⁺細胞からのNK細胞リモデリングを行い、リモデリングNKフェノタイプの結果が骨髄由来CD34⁺細胞と同等か否かを検討した。

C. 研究結果

1. CD34⁺血液幹細胞由来リモデリングNK細胞のHCV感染抑制能の *in vivo* 評価

ヒト肝細胞キメラマウスに、ジェノタイプ1b型のHCV感染血清を接種すると、高率にHCV持続感染が成立する。このモデルを用い、血清接種24時間以内に誘導細胞を移入し、感染防御し得るか否かをマウス血清中のHCV-RNA値を測定して評価した。その結果、投与したNK細胞数に依存して1週目および2週目の感染抑制を認めたが、一旦感染が成立した場合は、感染を抑制することはできなかった。また、非NK細胞群を投与したマウスは全例感染を認め、これらの細胞群は感染を助長する可能性が示唆された(図1)。

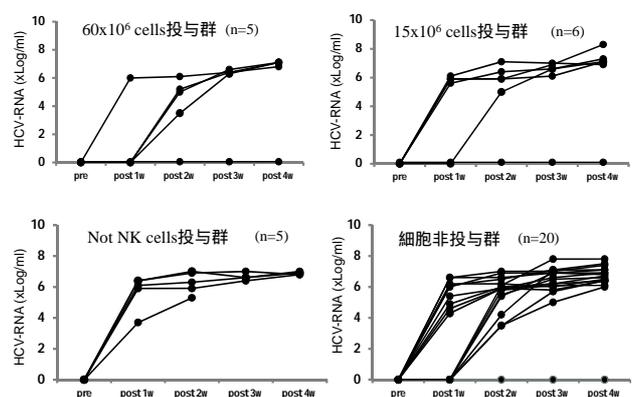


図1. リモデリングNK細胞のHCV感染抑制能評価 (ヒト肝キメラマウスモデル)

2. リモデリングNK細胞の *in vitro* 感染抑制能の評価

CD34⁺細胞から分化誘導した細胞のHCVウイルス増幅抑制効果を確認するため、*in vitro*

replicon assay systemによるHCVウイルス増幅抑制能を評価した。また、抗ヒトIFN- γ あるいはTNF- α モノクローナル抗体を添加したブロッキングアッセイを行った。その結果、誘導NK細胞は強い抗HCV増幅抑制能を呈したが、非NK細胞群は抑制能が弱いことが分かった(図2)。さらに、抗ヒトIFN- γ において有意な抑制の解除を示した一方で、TNF- α 抗体は影響を及ぼさなかった(図3)。

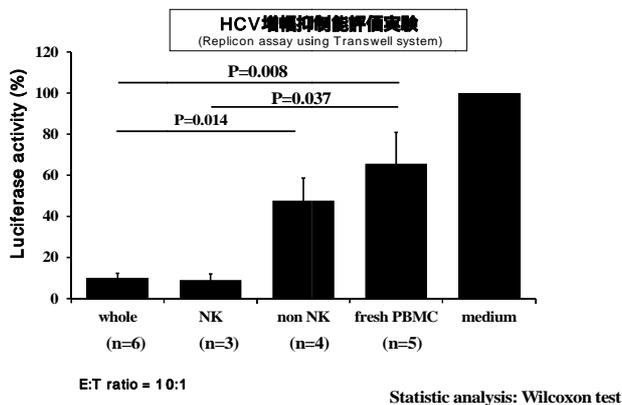


図2. リモデリング細胞のHCV増幅抑制能評価実験

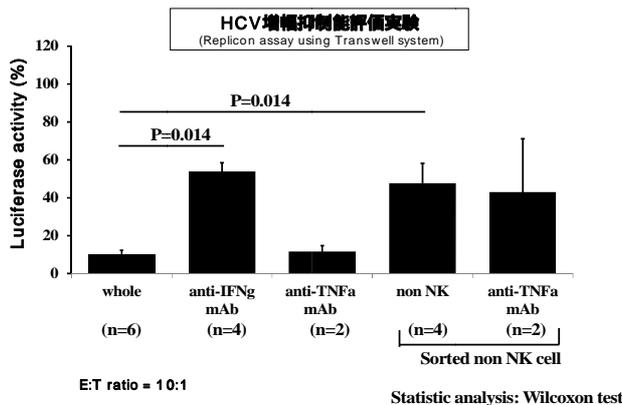


図3. リモデリング細胞のHCV増幅抑制能評価実験 (Blocking抗体添加実験)

3. HCV 感染防御に関わる NK 細胞機能分子の探索

分化誘導細胞のNK細胞フェノタイプマーカーおよび機能分子マーカーの表出についてフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、NK細胞活性化分子であるNKp30、NKp44、NKp46や抗腫瘍活性に関与するNKG2D、TRAIL、CD226の表出を認めた。とくにNKp46、NKG2D、CD226の高発現はHCVレプリコンアッセイにおける抑制率も高く(図4)HCV抑制に寄与する

因子であることが示唆された。一方で、CD56の表出を伴わない非NK細胞群は、図1、2に示す通り、抗HCV抑制能を有せず、むしろ感染を助長する可能性のある細胞群であった。これらは、FCM解析の結果、CD11b、CD11c陽性の骨髓系樹状細胞やマクロファージに分化した細胞群であった。

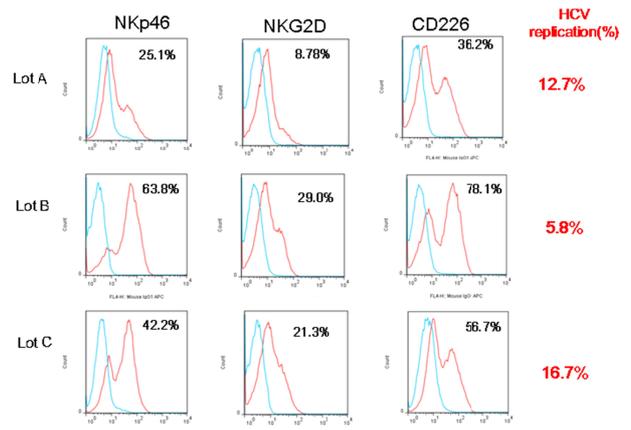


図4. NK活性化分子はHCV replication抑制に関与する

4. iPS 誘導性 NK 細胞の誘導効率の検討

24日の培養期間で、iPS細胞からCD34⁺細胞への誘導効率は約40倍であった。その後は、磁気ソーティングでCD34⁺細胞を純化し、CD34⁺細胞からNK細胞への誘導法でさらに28日間分化を行った。現在CD56⁺NKp46⁺のNK細胞への分化誘導は成功したが、回収細胞数に乏しく、培養日数も長期にわたるためさらなる改善の余地が必要と思われた。

5. 末梢血 CD34⁺細胞からの NK 細胞誘導

同意を得られた健常人ボランティアの末梢血から単核球を採取し、磁気ソーティング法でCD34⁺細胞を分離し、NK細胞リモデリングを行った。培養28日後のNK細胞のフェノタイプにおいてHCV効果に関与すると思われるNKp46、NKG2D、CD226の表出が骨髓由来CD34⁺細胞に比べ高い傾向にあった。

D. 考察

活性化NK細胞はIFN- γ 産生能が強く、高い抗HCV効果を発揮する。リモデリングNK細胞

においても IFN- γ は HCV 複製能を抑制する重要なサイトカインであることが分かった。一方で、TNF- α は HCV 複製能に与える影響は認めなかった。最近、TNF- α は HCV のエントリーを促す働きがあるとの報告がある。さらに、TNF- α はマクロファージや樹状細胞が産生することは知られている。我々の CD34⁺血液幹細胞由来の誘導細胞において非 NK 細胞分画は、CD11b、CD11c 陽性の骨髓系樹状細胞やマクロファージに分化した細胞群であり、これらの細胞はヒト肝キメラマウスを用いた HCV ウイルス感染抑制実験において感染を助長する結果を認め、*in vitro*での HCV レプリコン解析で HCV 増幅能の抑制効果を認めなかった。我々が今回使用した *in vitro* 解析は HCV レプリコン含有肝細胞を用いた評価システムであり、そのために抗 TNF- α 抗体の効果を確かめできなかった可能性がある。今後は HCV のエントリーを模倣した *in vitro* 解析系による TNF- α の関与と、リモデリング NK 細胞との併用による HCV 制御の相乗効果について検討する予定である。

また、末梢血 CD34⁺細胞の存在比率は非常に乏しい(約0.05~0.2%程度)が、今回のリモデリング誘導実験において、誘導NK細胞の機能分子の誘導効率が高いことが示唆された。今後は機能解析とより詳細なフェノタイプ解析を行い、アフエレーシス法による末梢血中 CD34⁺細胞からのNK細胞リモデリングの臨床応用の可能性について検討する。

E. 結論

iPS 細胞および CD34⁺細胞から抗 HCV 効果を有する活性化NK細胞の分化誘導法の改良を検討した。抗 HCV 効果を効率よく発揮するためには、NK 細胞の高純度を維持すること、NKp46、NKG2D、CD226 の高表出および高い IFN- γ 産生能の誘導が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi T, Ishiyama K, Ohdan H. Prevention of recurrence after curative treatment for hepatocellular carcinoma. Surg Today. 43:1347-1354. 2013.
2. Ohdan H. Is living donor liver transplantation really equivalent to deceased donor liver transplantation? Transpl Int. 26:778-779. 2013.
3. Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, Ohdan H, Tzakis AG. Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells via interferon-gamma production. Transplant Proc. 2013.45(5):2045-2050.
4. Onoe T, Tanaka Y, Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation. Transplantation. 2013.95(12):1521-1527.
5. Teraoka Y, Ide K, Morimoto H, Tahara H, Ohdan H. Expression of Recipient CD47 on Rat Insulinoma Cell Xenografts Prevents Macrophage-Mediated Rejection through SIRPalpha Inhibitory Signaling in Mice. PLoS One. 8:e58359. 2013.
6. 大段秀樹. State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery. Frontiers in Gastroenterology. 2013. 18(3):203-213.

2. 学会発表

1. 谷峰直樹, 田中友加, 石山宏平, 井手健太郎, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 安部智之, 橋本慎二, 平田文宏, 森本

博司, 清水誠一, 佐伯吉弘, 五十嵐友香, 田代裕尊, 大段秀樹. 硬変肝に局在する Natural Killer 細胞の機能抑制機構. 第113回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.11-13. 福岡.

2. Ohdan H. Do Allograft Responses Effect HCV Recurrence? ILTS 19th. 2013.6.12-15. Sydney, Australia.

3. 谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田澤宏文, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝内在NKp46高発現NK細胞は移植後HCV再感染初期に抑制的機能を有する. 第31回日本肝移植研究会. 2013.7.4-5. 熊本.

4. 田中友加, 大平真裕, 尾上隆司, 井手健太郎, 石山宏平, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後抗ドナーT細胞応答に伴い産生されるIFN- γ は術後HCV-RNA抑止に關与する. 第31回日本肝移植研究会. 2013.7.4-5. 熊本.

5. 大平真裕, 石山宏平, 堀田龍一, 清水誠一, 田中友加, 田代裕尊, Andreas Tzakis, 西田正剛, 大段秀樹. 肝臓由来ナチュラルキラー細胞を用いた肝細胞癌肝移植に対する補助免疫療法: 広島大学・マイアミ大学共同研究の臨床経過報告. 第49回日本移植学会総会. 2013.9.5-7. 京都.

6. 清水誠一, 田中友加, 堀田龍一, 平賀伸彦, 石山宏平, 井手健太郎, 五十嵐友香, 田代裕尊, 茶山一彰, 大段秀樹. 造血幹細胞から分化誘導したNK細胞のHCV増殖抑制効果. 第113回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.11-4.13.

G. 知的所有權の取得状況

特になし

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
田中純子、片山恵子	新しい診断と治療のABC 肝硬変 第一章 概念・定義・疫学 疫学	沖田極	最新医学	最新医学社	大阪	2013	20-30
田中純子	B型肝炎に関する疫学調査の最新情報	溝上雅史	B型肝炎 最新治療コンセンサス(別冊・医学のあゆみ)	医歯薬出版株式会社	東京	2013	5-12
片山恵子、田中純子	ウイルス肝炎 最新の疫学		診断と治療	診断と治療社	東京	2013	1287-1292
田中純子、片山恵子、松尾順子	わが国におけるHBV感染の疫学	持田智	de novo B型肝炎	医薬ジャーナル社	大阪	2013	14-29
片山恵子、田中純子	肝炎・肝癌の疫学	林紀夫、上西紀夫、下瀬川徹、日比紀文	Annual Review 消化器	中外医学社	東京	2013	88-93
田中純子	HBV感染症のインパクト	田中榮司、竹原徹郎、持田智	HEPATOLOGY PRACTICE	文光堂	東京	2013	27-35

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
Kobayashi T, Ishiyama K, <u>Ohdan H.</u>	Prevention of recurrence after curative treatment for hepatocellular carcinoma.	Surg Today.	43	1347-1354	2013
<u>Ohdan H.</u>	Is living donor liver transplantation really equivalent to deceased donor liver transplantation?	Transpl Int.	26	778-779	2013
Ohira M, Nishida S, Matsuura T, Muraoka I, Tryphonopoulos P, Fan J, Tekin A, Selvaggi G, Levi D, Ruiz P, Ricordi C, <u>Ohdan H.</u> Tzakis AG.	Comparative analysis of T-cell depletion method for clinical immunotherapy-anti-hepatitis c effects of natural killer cells via interferon-gamma production.	Transplant Proc.	45	2045-2050	2013
Onoe T, <u>Tanaka Y.</u> Ide K, Ishiyama K, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, <u>Ohdan H.</u>	Attenuation of Portal Hypertension by Continuous Portal Infusion of PGE1 and Immunologic Impact in Adult-to-Adult Living-Donor Liver Transplantation.	Transplantation.	95	1521-1527	2013

Teraoka Y, Ide K, Morimoto H, Tahara H, <u>Ohdan H.</u>	Expression of Recipient CD47 on Rat Insulinoma Cell Xenografts Prevents Macrophage-Mediated Rejection through SIRPalpha Inhibitory Signaling in Mice.	PLoS One.	8	e58359	2013
<u>大段秀樹</u>	State of the Art 肝免疫と肝臓外科 Liver Immunity and Surgery.	Frontiers in Gastroenterology.	18(3)	203-213	2013
Abe Y, Aly HH, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M	Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice with Humanized Livers	Gastroenterology	145	658-667	2013
Yamasaki S, Taguchi Y, Shimamoto A, Mukasa H, <u>Tahara H</u> , Okamoto T.	Generation of Human Induced Pluripotent Stem (Ips) Cells in Serum- and Feeder-Free Defined Culture and TGF-B1 Regulation of Pluripotency	PLoS One	9	e87151	2014
Shiotani B, Nguyen H.D, Håkansson P, Maréchal A, Tse A, <u>Tahara H</u> , Zou L.	Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1	Cell Rep	3	1651-1662	2013
<u>Tahara H</u> , Kay M.A, Yasui W, Tahara E.	MicroRNAs in Cancer: the 22nd Hiroshima Cancer Seminar/the 4th Japanese Association for RNA Interference Joint International Symposium, 30 August 2012, Grand Prince Hotel Hiroshima.	Jpn J Clin Oncol.	46	579-582	2013
Akita T, Ohisa M, Kimura Y, Fujimoto M, Miyakawa Y, <u>Tanaka J</u>	Validation and limitation of age-period-cohort model in simulating mortality due to hepatocellular carcinoma from 1940 to 2010 in Japan	Hepatology Research	in press		2013
Sato T, Do H S, Asao T, Akita T, Katayama K, Tatara K, Miyakawa Y, <u>Tanaka J</u>	Estimating numbers of persons with persistent hepatitis B virus infection transmitted vertically and horizontally in the birth cohort during 1950-1985 in Japan	Hepatology Research	in press		2013
Chen D-S, Locarnini S, Wait S, Bae SH, Chen PJ, Fung JY, Kim HS, Lu SN, Sung J, <u>Tanaka J</u> , Wakita T, Ward J, Wallace J	Report from a Viral Hepatitis Policy Forum on implementing the WHO framework for global action on viral hepatitis in North Asia	Journal of Hepatology	59(5)	1073-1080	2013
Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, <u>Tanaka J</u> , Kagebayashi C, Satomura S.	High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma	Journal of Gastroenterology	in press		2013

Kumada T, Toyoda H, Kiriyaama 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	28(2)	357-364	2013
Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama 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	58(3)	427-433	2013
Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T.	Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver disease with or without type 2 diabetes mellitus	Journal of Gastroenterology	48(4)	515-525	2013
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	54(1)	84-86	2013
松尾順子、片山恵子、中島歩、頼岡徳在、田中純子、広島透析患者肝炎Study Group.	血液透析患者における肝炎ウイルス感染率と生命予後	日本透析医学会雑誌	28(1)	161-166	2013
田中純子、片山恵子.	HCV感染の疫学の変化	肝胆膵	67(6)	811-818	2013
田中純子、片山恵子.	B型肝炎の疫学 -キャリア率, キャリア数について-	最新医学	68(3)	14-21	2013
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	30(2)	194-202	2013
Murata Y, Saito Y, Kaneko T, Kotani T, Kaneko Y, Ohnishi H, Matozaki T.	Autoimmune animal models in the analysis of the CD47-SIRPα signaling pathway.	Methods	65	254-259	2014
Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K.	The BALB/c-specific polymorphic SIRPα enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment.	Exp Hematol	42	163-171	2013

Koskinen C, Persson E, Baldock P, Stenberg A, Bostrom I, <u>Matozaki T</u> , Oldenborg PA, Lundberg P.	Lack of CD47 impairs bone cell differentiation and results in an osteopenic phenotype in vivo due to impaired signal regulatory protein alpha (SIRP α) signaling.	J Biol Chem	288	29333-29344	2013
Zen K, Guo Y, Bian Z, Lv Z, Zhu D, <u>Matozaki T</u> , Liu Y.	Inflammation-induced proteolytic processing of the SIRP α cytoplasmic ITIM in neutrophils propagates a proinflammatory state.	Nat Commun	4	2436	2013
Takahashi S, Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Hamatani H, Watanabe M, Ikeuchi H, Kaneko Y, Maeshima A, Aoki T, Ohnishi H, <u>Matozaki T</u> , Nojima Y.	SIRP α signaling regulates podocyte structure and function.	Am J Physiol Renal Physiol	305	F861-F870	2013
Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, <u>Matozaki T</u> , Akashi K.	Polymorphic <i>Sirpa</i> is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment.	Blood	121	1316-1325	2013
Dansako H, Yamane D, Welsch C, McGivern DR, Hu F, <u>Kato N</u> , Lemon SM.	Class A scavenger receptor 1 (MSR1) restricts hepatitis C virus replication by mediating toll-like receptor 3 recognition of viral RNAs produced in neighboring cells.	PLoS Pathogens	9	e1003345	2013
Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, <u>Kato N</u> .	Adenosine kinase is a key determinant for the anti-HCV activity of ribavirin.	Hepatology	58	1236-1244	2013
Ueda Y, Takeda M, Mori K, Dansako H, Wakita T, Kim HS, Sato A, Wataya Y, Ikeda M, <u>Kato N</u> .	New preclinical antimalarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication.	PLoS ONE	8	e72519	2013
Banshodani M, <u>Onoe T</u> , Shishida M, Tahara H, Hashimoto S, Igarashi Y, <u>Tanaka Y</u> , <u>Ohdan H</u> .	Adoptive transfer of allogeneic liver sinusoidal endothelial cells specifically inhibits T-cell responses to cognate stimuli.	Cell Transplant.	22	1695-1708	2013
Yanai H, Matsuda A, An J, Koshiba R, Nishio J, Negishi H, Ikushima H, <u>Onoe T</u> , <u>Ohdan H</u> , Yoshida N, Taniguchi T.	Conditional ablation of HMGB1 in mice reveals its protective function against endotoxemia and bacterial infection.	Proc Natl Acad Sci U S A.	110	20699-704	2013