

201228007A

厚生労働科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

B型肝炎における自然免疫の機能解明と
その制御による発癌抑止法開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 直也

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

B型肝炎における自然免疫の機能解明と
その制御による発癌抑止法開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 直也

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
B型肝癌における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発の総括 -----	1
加藤 直也	
II. 分担研究報告	
1. B型肝癌における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発 -----	11
加藤 直也	
2. 肝発癌における自然免疫関与の解析 -----	15
横須賀 収	
3. 肝癌関連遺伝子MICAのmicroRNAによる発現制御 -----	17
小池 和彦	
4. B型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析 -----	21
松田 浩一	
5. 自然免疫応答制御に着目したB型肝炎感染を契機とした発癌機構の解明 -----	23
地主 将久	
6. B型肝炎ウイルスによる肝発癌に関与するMICAの発現調節機構の解明 -----	25
室山 良介	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	35

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
総括研究報告書（平成24年度）

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

研究代表者：東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット
特任准教授 加藤 直也

研究要旨：肝炎ウイルスによる肝発癌抑止は肝臓病学の最重要課題である。我々はGWASにより、MICA遺伝子多型がC型肝炎と関連していることを明らかにした。MICA遺伝子多型はB型肝炎とも関連し、ウイルス感染肝細胞とNK細胞を中心とした自然免疫系との攻防がB型肝炎における肝発癌に深く関わっていることを示す。そこで、本研究ではB型肝炎ウイルス（HBV）による発癌における自然免疫系の役割を明らかにし、自然免疫系の制御、特にMICAの発現調節による肝発癌抑止法を開発することを目的としている。まず、MICA遺伝子多型とB型肝炎との関連を検討した。MICA遺伝子多型がB型肝炎発症リスクと相関すること、またMICA遺伝子多型と分泌型MICA値が有意な相関を示すことを明らかとした。さらに分泌型MICA陽性肝癌では、予後不良であった。MICAが予後マーカーであるだけでなく、治療標的としても有望であることが示された。そこで、MICA発現を調節する薬剤の同定を試みている。既にHDAC阻害薬を始めとした複数の候補薬剤を同定した。また、microRNAを用いた転写後修飾によるMICA蛋白発現制御についても検討し、microRNA-92および-106bがMICAを標的とすることを明らかにした。これらmicroRNAの機能を阻害すると、MICA蛋白発現が増えることも確認した。MICA蛋白の発現量に相関して、MICA蛋白のレセプターであるNKG2DとMICA蛋白発現細胞との間の結合量に変化が生じることが確認され、MICA蛋白発現制御によりウイルス感染細胞や癌細胞の排除機能の制御につながることも可能と思われた。

また、HBVと自然免疫との関連を検討している。HBe抗原が肝細胞においてRIPK2と相互作用し、その発現を抑制することにより各種サイトカイン産生を抑制することを明らかにした。HBV、HBx蛋白は炎症性サイトカインによるNF- κ Bの活性化を増強しており、HBVは自然免疫系に影響し、慢性持続感染および肝発癌に寄与していることが再認識された。肝癌における自然免疫の役割についても検討している。がん進展において需要と考えられる肝臓内腫瘍マクロファージで高いNKG2D発現を認めたが、NKG2D陽性腫瘍マクロファージはNK細胞と異なり、リガンド陽性腫瘍細胞への細胞障害活性を認めなかった。

研究分担者 横須賀 収
千葉大学大学院医学研究院
教授
研究分担者 小池 和彦
東京大学医学部附属病院
教授
研究分担者 松田 浩一
東京大学医科学研究所
准教授
研究分担者 地主 将久
北海道大学遺伝子病制御
研究所
教授
研究分担者 室山 良介
東京大学医科学研究所
特任助教

A. 研究目的

ウイルス肝炎はわが国の国民病とも言われ、肝炎ウイルスキャリアは350万人に及ぶ。ウイルス肝炎はわが国の国民病とも言われ、肝炎ウイルスキャリアは350万人にも及ぶ。しかも肝炎ウイルスは不適切な医療行為により蔓延した可能性が指摘されている。ウイルス肝炎の終末像は肝癌であり、肝癌こそ肝炎ウイルスキャリアが最も恐れるものである。肝癌はわが国における癌死の第4位を占め、毎年3万人以上もの尊い命を奪っている。その原因の70%がC型肝炎ウイルス（hepatitis C virus: HCV）、20%がB型肝炎ウイルス（hepatitis B virus: HBV）であり、肝炎ウイルスによる肝発癌の抑止は肝臓病学の最重要課題である。我々はゲノムワイド関連解析（GWAS）を行い、C型肝炎において、自然免疫の主要因子であるナチュラルキラー（NK）細胞

の標的分子である MICA の遺伝子多型が肝発癌と関連していることを明らかにした (Nat Genet 2011)。MICA 遺伝子多型は B 型肝炎とも関連していることを突き止めた。B 型肝炎ウイルス感染により MICA 発現が誘導されるが、MICA 遺伝子多型により MICA 発現量が異なり、その差が肝発癌リスクのみならず予後までも規定している。このことはすなわち、ウイルス感染肝細胞と NK 細胞を中心とした自然免疫系との攻防が B 型肝炎における肝発癌に深く関わっていることを示している。そこで、本研究では B 型肝炎ウイルスによる発癌における自然免疫系の役割を明らかにし、自然免疫系の制御、特に MICA の発現調節による肝発癌抑止法を開発することを目的とする。B 型肝炎は核酸アナログによりコントロール可能な疾病になりつつあるが、B 型肝炎ウイルスは駆除されがたく、増殖を制御しても肝癌の発生は必ずしも抑止出来ない。すなわち抗ウイルス療法とは異なる肝発癌抑止戦略が必要である。本研究は、GWAS により発見された MICA/NK 細胞と肝癌との関連を元に、B 型肝炎における肝発癌抑止を行うという独創的研究である。具体的には、

1. B 型肝炎による肝発癌における MICA/NK 細胞を中心とした自然免疫系の役割の解明
 2. GWAS データ解析による B 型肝炎に関わる自然免疫系分子多型の同定
 3. 肝発癌関連自然免疫分子 (特に MICA) の発現調節による肝発癌抑止法の開発
 4. NK 細胞と肝癌細胞との細胞間相互作用の解明
- を目的とした研究を推進していく。

B. 研究方法

1. B 型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析 (松田・加藤・小池)

まず MICA 多型の HBV 陽性肝癌の発症リスクとの関連について検討した。解析に用いた症例は、HBV 陽性肝癌症例 407 例、慢性 B 型肝炎症例 699 例、健常人コントロール 5679 症例である。SNP rs2596542 のタイピングは、イルミナ GeneCHIP、インベーター法、タックマン法にて行った。統計解析には、Cochran-Armitage trend test を用いた。

また 111 名の HBV 陽性肝癌患者血清を用いて血清中の MICA (sMICA) を ELISA 法にて測定した。さらに sMICA と MICA 遺伝子多型及び肝癌患者の予後 (overall survival) との関連を検討した。解析には Kruskal-Wallis test, log-rank test を用いた。

2. B 型肝炎ウイルスによる肝発癌に関与する

MICA の発現調節機構の解明 (室山)

1) データベース上では MICA の mRNA に非常に類似した non-coding RNA (ncRNA) が転写されている可能性が示唆されたので、実際に発現しているか否かにつき、培養細胞株の cDNA を用いて確認した。また、MICA の mRNA と ncRNA とを個別に定量できる Realtime PCR の系を確立し、種々の肝癌細胞株における発現レベルを検討した。

2) MICA の発現ベクターを構築し、市販されている MICA の抗体を用いて Western blot を行い、細胞内 MICA 蛋白レベルを検出可能な抗体を探索した。

3) ELISA を用いて種々の肝癌細胞株における上清中の MICA 濃度を測定した。

3. B 型肝炎ウイルス肝発癌に関与する MICA の発現調節薬剤探索 (加藤)

培養細胞系として肝癌細胞株である Huh7、PLC/PRF/5 (Alexander) 細胞を用いた。薬剤は臨床応用を見据え、全て市販のものを利用した。MICA mRNA 発現は qRT-PCR により測定した。レポーターは MICA プロモーター配列を市販のルシフェラーゼベクターにクローニングし作製した。細胞毒性は細胞によるテトラゾリウム塩還元産物の培養上澄中吸光度により測定した。プライマリー・スクリーニングには市販の FDA-approved Drug Library を用いた。

4. 肝癌関連遺伝子 MICA の microRNA による発現制御 (小池)

1) はじめに、広く研究用途に用いられている各種肝癌細胞株の MICA 発現量を FACS で検定した。

2) MICA の 3'UTR を組み込んだルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製し microRNA による MICA 遺伝子発現調節能を検定した。この効果が、microRNA の機能に依存することを示すために、コンピューター解析で得られる microRNA の予想標的部位の seed 配列に相当する配列の中の二か所に変異を導入した変異レポーターコンストラクトを作製し上記の効果の変化を確認した。

3) microRNA の機能を落とす anti-sense 配列発現ベクターを用いて MICA の発現変化を検定した。

4) microRNA による MICA 発現調節後に、実際にそのレセプターである NKG2D との結合を FACS で検定した。

5. 自然免疫応答制御に着目した B 型肝炎感染を契機とした発癌機構の解明 (地主)

1) 腫瘍および健常組織マクロファージサブセットでの NKG2D 発現、NKG2D を介した免疫機能

を検討した。

2) B 型肝炎発癌モデル(HBX-トランスジェニック(TG)マウス、NKG2D ノックアウト(KO)マウスを対象に、マクロファージにおける NKG2D 免疫応答を検証した。

6. 肝発癌における自然免疫関与の解析 (横須賀)

1) ヒト肝癌細胞 HepG2 に遺伝子を導入することにより HBe 抗原と HB コア蛋白、HB コア蛋白のみを産生する HepG2-HBeAg(+), HepG2-HBeAg(-)をそれぞれ作成した。

2) 細胞培養液中の蛋白産生の確認は HBe 抗原および HBeC 抗原を ELISA にて測定した。

3) 各肝細胞 RNA を用いてサイトカイン関連遺伝子発現を Real-time PCR にて比較検討した。

4) ヒト肝細胞 TPH1, HepG2 および Huh7 細胞において、レポーターアッセイにより TNF および HBx が NF- κ B の活性化に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本解析に用いた症例は全て、インフォームドコンセントを取得済みで、また各医療機関、研究機関の倫理委員会の承認済みである。厚生労働省等による「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守している。また、一般論として弱者、女性、少数民族の疫学調査等を行う場合は倫理上十分配慮している。

動物実験に際しては、動物実験等の実施に関する基本指針や動物愛護法を遵守し、当該研究を行っている。動物実験方法については倫理面の問題がないと判断している。

また、培養細胞系において行われている多くの研究は、現時点で倫理面への配慮を必要とするものではない。

C. 研究結果

1. B 型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析 (松田・加藤・小池)

上記の解析によって、rs2596542 が HBV 陽性肝癌の発症リスクと関連を示すことが明らかとなった ($p=0.029$)。さらに rs2596542 と sMICA 値も関連を示した。また sMICA が高値の肝癌症例では予後が不良であった。

2. B 型肝炎ウイルスによる肝発癌に関与する MICA の発現調節機構の解明 (室山)

1) 培養細胞株の cDNA を用いた検討の結果、MICA に類似した ncRNA が実際に転写されていることが確認された。また Realtime PCR により、培養細胞株ごとの MICA、ncRNA の発現量が定

量され、MICA の発現量よりも ncRNA の発現量の方が高い細胞株も存在していた。2) MICA の細胞内蛋白レベルを検出すべく、市販されている MICA の抗体を数種類用いて Western blot を行ったが、MICA 蛋白を明瞭に検出できる抗体は見出せなかった。3) ELISA にて培養細胞株ごとの上清 MICA 濃度を定量したところ、多くの細胞株では MICA の mRNA 発現量と正の相関を示したが、中には乖離している細胞株も存在していた。3. B 型肝炎ウイルス肝発癌に関与する MICA の発現調節薬剤探索 (加藤)

これまで肝癌細胞株やヒト白血病 T 細胞株において MICA 発現誘導が知られている酪酸ナトリウム (Sodium butyrate: NaB) 処理をしたところ、用いた Huh7、Alexander 両細胞において顕著な MICA mRNA レベル上昇が観察された。一方で MICA プロモータ領域をルシフェラーゼ上流に連結したレポーターを作製後 Huh7、Alexander 両細胞株において安定形質発現細胞クローンを単離した。それらに対して NaB 処理を行ったところ、同様に MICA mRNA レベルと共にルシフェラーゼ活性の顕著な上昇が観察された。上記の処理濃度において細胞毒性は観察されなかった。次に本系を用いて FDA-approved Drug Library による小規模プライマリー・スクリーニングを行い MICA の発現を制御し得る薬剤の候補を見出した。

4. 肝癌関連遺伝子 MICA の microRNA による発現制御 (小池)

1) 肝癌細胞株 4 種 (HLE, Huh7, Hep3B, PLC/PRF/5) と Hela 細胞で MICA の発現量を見たところ、MICA 発現細胞 (Hela, Hep3B, PLC/PRF/5) と非発現細胞 (HLE, Huh7) の二群に群分けされた。特に B 型肝炎ウイルス DNA の組み込みがあることが知られている Hep3B と PLC/PRL/5 細胞では MICA 遺伝子が高発現していたが、B 型肝炎ウイルスの関与が知られていない Huh7 と HLE では MICA 遺伝子の発現は低かった。

2) MICA の 3'UTR 内に microRNA-93 および -106b が標的としうる配列 (Seed sequence が 100% マッチする配列 2 箇所) を同定し、実際にこれらの microRNA の過剰発現コンストラクトを用いたレポーターアッセイによってその部分が microRNA の標的になることを確認した。ここで、microRNA-93 と microRNA-106b はゲノム上で tandem に遺伝子座が並んでいて発現を含む挙動を共にする可能性が高いことから、敢えてこれらの microRNA が同時に発現するような過剰発現系を作製し今回の検討に充てた。

3) 逆にそれらの microRNA の anti-sense 配列を

発現するコンストラクトを用いて microRNA の機能を阻害すると、Hela 細胞や Hep3B 細胞ではそれに応じて MICA の発現量が増えることが確認された。ただし、もともと MICA を全く発現していない Huh7 細胞では、microRNA の機能阻害による MICA の遺伝子発現量調節が効かなかった。したがって、このような例では転写後調節ではなく転写自体による発現調節の存在も示唆された。

4) microRNA の制御に伴う MICA の発現量変化と相関して、MICA 発現細胞の排除に關与する NKG2D (MICA のレセプター) との結合量に変化が生じることから、microRNA によって制御した MICA 発現量の変化は、実際に免疫応答性を規定している可能性が確認された。

5. 自然免疫応答制御に着目した B 型肝炎感染を契機とした発癌機構の解明 (地主)

1) 組織、腫瘍マクロファージの NKG2D 発現を検証したところ、NKG2D は F4/80(+)CD11b(+) 腫瘍内 Mac でも特に CD206^{high} MHC-II (-) の M2 サブタイプに限局して認められた。

2) 肝臓内 Mac では、脾臓、リンパ節など他組織 Mac と比較して高い NKG2D 発現を認めた。

NKG2D 陽性 Mac は、NK 細胞と異なりリガンド陽性腫瘍細胞への細胞障害活性を認めず、他の免疫能修飾能が疑われた。

3) HBx-TG マウスと NKG2D-KO マウスを対象に HBV 発癌に対する Mac、NK 細胞を介した NKG2D 免疫システムの役割を検証する実験系を立ち上げた。

4) TIM-3 を介した自然免疫制御システムが HBV 感染、発癌病態に与える影響を HBV 感染系、TIM-3-KO マウスを対象に準備中である。

6. 肝発癌における自然免疫関与の解析 (横須賀)

1) Genotype C HBeAg (+) ASC 患者の血清より HBV Pre-C/Core 領域をクローニングし、site-directed mutagenesis を用いて HBe 抗原発現および非発現ベクターを構築した。

2) HepG2 Stable Cell の Conditioned Medium 中に HBe 抗原の分泌を CLEIA 法にて確認した。

3) HBe 抗原は IFN, IL6 をはじめとするインターフェロン、サイトカイン産生を抑制することを確認した。

4) HBe 抗原は NF- κ B 上流に位置する Receptor-Interacting Serine/Threonine Protein Kinase 2 (RIPK2) と相互作用することを免疫沈降、免疫染色を用いて明らかにした。

5) HBe 抗原は NOD1-RIPK2-NF- κ B シグナル伝

達経路を介した NF- κ B の活性化を抑制し、肝細胞 IL6 産生を抑制することを確認した。

6) HBV 及び HBx 蛋白は TNF による NF- κ B の活性化を増強した。この NF- κ B 活性化はプロテアソーム阻害剤 MG132 により抑制された。

D. 考察

我々は以前行った GWAS 解析 によって、B 型肝炎・C 型肝炎ウイルス感染からの肝臓癌感受性を規定する SNP として MICA のプロモーター領域の SNP を同定した。この rs2596542 の A アレルを持つ患者では sMICA が低くなる傾向が見られたが、この傾向は HCV 陽性肝癌と同様の結果であった。これらの結果より遺伝子多型が MICA の発現制御に重要であることが示された。一方、遺伝子多型と発癌リスクの関連においては、HCV 陽性肝癌と HBV 陽性肝癌とではリスクアレルが逆転していた。この原因としては、MICA の切断の有無が関与すると推測された。膜型 MICA は NK 細胞を活性化することによってウイルス感染細胞の排除を促進する。このことから、膜型 MICA は癌抑制遺伝子として機能すると予測される。一方分泌型 MICA は、decoy receptor と機能することで、NK 細胞の活性を抑制することが報告されており、結果として癌化を促進すると考えられる。HBV 陽性肝癌では様々な MMP が活性化しており、その結果分泌型 MICA の効果が優位となるため、リスクアレルが逆転する結果になったと考えられる。

MICA の発現調節機構を解明する上で、その動態を把握する検出・定量系を確立することは必須となるが、本研究にて MICA の mRNA レベル、血中レベルの検出・定量系を確立され、種々の肝癌細胞株における MICA の動態が判明した。また、本研究において MICA の mRNA に非常に類似した ncRNA が実際に転写されていることが明らかとなり、個別に定量することも可能となった。

MICA 発現誘導能が報告されている NaB により、肝癌細胞株における MICA mRNA 発現量上昇を本研究でも観察した。とりわけ NaB の HDAC (histone deacetylase) 阻害活性は興味深く、HAT (histone acetyltransferase) 阻害剤や HDAC 阻害剤をはじめヒストンのアセチル化を標的とした薬剤の利用可能性が示唆される。一方で同時に NaB 処理により、構築した MICA 発現レポーターシステムの検証も行うことができた。加えて本レポーターシステムが小規模プライマリー・スクリーニングにおいて検出した薬剤は全て米国食品医薬品局 (FDA) 承認薬であるため、候補剤が早期に肝癌治療へ応用され得る可能性を有している。今後はより規模を拡大したハイスルー

プット・スクリーニングを視野に入れており、同定される低分子化合物は魅力的な抗肝癌剤候補となる。

今回の検討によって、MICA の発現調節にはプロモーター活性だけではなく転写後調節、とくに microRNA による mRNA の安定性調節もしくは蛋白翻訳効率の調節が重要であることが示唆された。特に MICA 遺伝子の 3'UTR には、ゲノム近傍から発現する二種類の microRNA (microRNA-93, -106b) の seed 配列に完全に相補的な配列が二か所存在しており、これらの microRNA によって発現が制御されている可能性が高いことが *in silico* 解析によって想定されていたが、本研究によって実際に microRNA による発現量の調節が可能であることが証明された。ただし、もともと全く MICA が発現していない細胞においては、本研究では microRNA の機能を変化させるだけでは発現量の調節ができなかった。このようなケースでは、MICA の発現については転写後調節よりもプロモーター活性あるいはエピジェノミク的な変化が重要なかもしれない。このようなケースも想定すると転写後調節の制御だけではなく転写活性の解析も並行して行なう必要があると考えられた。逆に、本研究の内容を鑑みると、多少でも転写が進めば、以降の発現量調整は転写後調節の制御によって一定の変化を得られることは想定できることから、ケースによっては転写活性と転写後調節の両者を同時に制御することが重要なものもあると考えられる。MICA の発現量に応じてそのレセプターである NKG2D の結合量が変化することも証明されたため、実際に MICA の発現量を制御することがその後の免疫応答性をも制御することになるということが示され、感染細胞の排除・癌化細胞の排除にむけた細胞性免疫を駆動するのに有効な分子標的となりうることが示唆された。

肝、腫瘍マクロファージにおいて、M2 サブセットマクロファージに局限して NKG2D は発現していた。また NKG2D 陽性マクロファージは NK 細胞と異なり、抗腫瘍細胞障害活性を認めず、他の免疫修飾機能が疑われた。M2 マクロファージは免疫寛容や腫瘍活性に寄与する細胞群であることから、NKG2D 陽性マクロファージは NK 細胞などとは逆に、免疫抑制や腫瘍活性を正に制御している可能性があり、今後の検討において解明されなければならない課題である。

我々はこれまで HBV が増殖する場である肝細胞に注目して解析を進めてきた。今回、HBe 抗原が RIPK2 と相互作用し、肝細胞インターフェロ

ン、サイトカイン産生を抑制することを見出した。また、HBe 抗原が NOD1-RIPK2-NF- κ B 活性化シグナル伝達経路と相互作用することを明らかにしたことから、この経路が HBV 持続感染における創薬ターゲットになりうる可能性が示唆された。

また B 型肝炎では、その血中炎症性サイトカイン TNF、IL1beta 等が増加していることが知られているが、今後 HBV、HBx による TNF の NF- κ B 活性化増強機序について更なる検討を行なうことで、B 型肝炎ウイルスと肝自然免疫の相互作用をより明らかにし、B 型肝炎による発がん過程における自然免疫の関与を明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

- ・MICA 多型及び分泌型 MICA が慢性 B 型肝炎及び HBV 陽性肝癌患者の予後因子として有用であることが明らかとなった。また、MICA に対する抗体が HBV 陽性肝癌の治療標的となりうることが示唆された。

- ・MICA の動態を把握する検出・定量系を確立し、種々の肝癌細胞株における MICA 動態が把握された。このことは本研究課題の達成に向け、十分、寄与するものと考えられる

- ・薬剤探索レポーターシステムの構築を完了し、本年度の目標であったプライマリー・スクリーニングまで実施することができた。本研究において見出される薬剤は、MICA 発現調節を介した抗肝癌剤開発に直結するものと期待される。

- ・MICA 蛋白の発現量は microRNA およびその anti-sense の発現によって、一定の調節が可能であった。ただし MICA 蛋白がもともと全く発現していない細胞では microRNA 機能の制御だけでは MICA 蛋白の発現量を調節することは難しく、他の方策も必要と思われた。いっぽう、MICA 蛋白の発現量制御と免疫応答性の相関も示されたことから、現在の核酸医薬開発の進展とあいまって、MICA 蛋白量の調節は細胞性免疫調節を利用した肝発癌の予防・治療に応用しうる有望な方策と考えられた。このように、本研究で得られた成果は、MICA 遺伝子を標的とした核酸医薬を用いた B 型肝炎感染からの発癌予防・治療の開発に向けた重要な一歩と考えられる。

- ・NKG2D 陽性マクロファージの存在を明らかにしたとともに、その機能が従来の抗腫瘍免疫活性能とは異なる可能性が示唆された。

- ・HBe 抗原は NF- κ B と IFN β プロモーターの上流に存在する RIPK2 の発現を抑制し、RIPK2 と相互作用することを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Li Q, Yu C-H, Yu J-H, Liu L, Xie S-S, Li W-W, Yang X, Fan W-B, Gai Z-T, Chen S-J, Kato N. ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. **PLoS One** 2012; 7: e29928
- 2) Li Q, Li W-W, Yang X, Fan W-B, Yu J-H, Xie S-S, Liu L, Ma L-X, Chen S-J, Kato N. Type 2 diabetes and hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. **Int J Cancer** 2012; 131: 1197-1202
- 3) Shiina S, Tateishi R, Imamura M, Teratani T, Koike Y, Sato S, Obi S, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Omata M, Koike K. Percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma: 20-year outcome and prognostic factors. **Liver Int** 2012; 32: 1434-1442
- 4) Kumar V, Lo PHY, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2012; 7: e44743
- 5) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. **J Hepatol** 2013 (Epub ahead of print)
- 6) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma cells. **Anticancer Res** 2012; 32: 3775-83.
- 7) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. **J Infect Dis** 2012 ;206: 415-20.
- 8) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y. Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. **Hepatol Res** 2012; 42: 523-542.
- 9) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. **Biochem Biophys Res Commun** 2013 Jan 31. PMID: 23376718.
- 10) Hikita H, Enooku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. **Hepatol Res** 2013 Jan 3. PMID: 23356977.
- 11) Gotoh H, Enooku K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Yamazaki T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement observed at a general health examination: A cross-sectional study. **Hepatol Res** 2012 Nov 27. PMID: 23279215.
- 12) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. **Hepatol Res** 2012 Nov 2. PMID: 23131000.
- 13) Ohki T, Isogawa A, Iwamoto M, Ohsugi M, Yoshida H, Toda N, Tagawa K, Omata M, Koike K. The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone. **Scientific World Journal** 2012: 496453. PMID:22927782.
- 14) Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Okamoto K, Iso-O N, Matsushima T, Koike

- K, Tsukamoto K. Modulation of lipid metabolism with the over-expression of NPC1L1 in mice liver. **J Lipid Res** 2012 Aug 13. PMID: 22891292.
- 15) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. **Hepatology** 2013;57:162-170.
 - 16) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. **J Gastroenterol** 2012 Jul 12. PMID: 22790352.
 - 17) Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **J Gastroenterol** 2012 Jul 12. PMID: 22790350.
 - 18) Okushin K, Asaoka Y, Fukuda I, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Mikami S, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. IGF-II producing hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: metabolic complications and a foresight to molecular targeting therapy to the IGF signal. **Case Rep Gastroenterol** 2012;6(3):784-789.
 - 19) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. **J Infect Chemother** 2012;18(6):883-890.
 - 20) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 2013;57:417-418.
 - 21) Uchino K, Obi S, Tateishi R, Sato S, Kanda M, Sato T, Arano T, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Systemic combination therapy of intravenous continuous 5-fluorouracil and subcutaneous pegylated interferon alfa-2a for advanced hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol** 2012;47(10):1152-1159.
 - 22) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Koike K. Mortality and morbidity of hepatectomy, radiofrequency ablation, and embolization for hepatocellular carcinoma: a national survey of 54,145 patients. **J Gastroenterol** 2012;47(10):1125-1133.
 - 23) Yoshikawa T, Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K. Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. **Sci Rep** 2012;2:637.
 - 24) Mikami S, Tateishi R, Akahane M, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Computed Tomography Follow-up for the Detection of Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Initial Radiofrequency Ablation: A Single-center Experience. **J Vasc Interv Radiol** 2012;23(10):1269-1275.
 - 25) Nakagawa H, Isogawa A, Tateishi R, Tani M, Yoshida H, Yamakado M, Koike K. Serum gamma-glutamyltransferase level is associated with serum superoxide dismutase activity and metabolic syndrome in a Japanese population. **J Gastroenterol** 2012;47(2):187-194.
 - 26) Soroida Y, Ohkawa R, Nakagawa H, Satoh Y, Yoshida H, Kinoshita H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Shiina S, Sato T, Obi S, Hoshino T, Nagatomo R, Okubo S, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence. **J Hepatol** 2012;57(2):330-336.
 - 27) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Kudo Y, Goto T, Yoshida H, Koike K. A miRNA machinery component DDX20 controls NF- κ B via microRNA-140 function. **Biochem Biophys Res Commun** 2012;420(3):564-569.
 - 28) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Shiina S, Omata M, Koike K. Assessment of disease progression in patients with transfusion-associated chronic hepatitis C using transient elastography. **World J Gastroenterol** 2012;18(12):1385-1390.
 - 29) Kudo Y, Tateishi R, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G,

- Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. **Cancer Sci** 2012;103(4):670-676. PMID: 22320381.
- 30) Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol**. 2012;47(4):477-485.
- 31) Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, Koike K. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. **Am J Gastroenterol** 2012;107(4):569-577.
- 32) Enooku K, Tateishi R, Kanai F, Kondo Y, Masuzaki R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Evaluation of molecular targeted cancer drug by changes in tumor marker doubling times. **J Gastroenterol**. 2012;47(1):71-78.
- 33) Jinushi M. Regulatory mechanisms of nucleic acid-mediated innate immune responses in tumor microenvironments. **OncoImmunology** 2012 Dec 1; 1(9):1632-1634.
- 34) Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, Jinushi M & Yoshiyama H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. **Viruses**. 2012 Dec; 4(12):3420-39.
- 35) Jinushi M, Chiba S, Baghdadi M, Yoshiyama H. Regulation of cancer stem cell activities by tumor-associated macrophages. **American Journal of Cancer Research** 2012;2(5):529-39.
- 36) Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka A, Yagita H, Jinushi M. Tumor-infiltrating dendritic cells suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interaction between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. **Nat Immunol** 2012 Sep; 13(9):832-42.
- 37) Baghdadi M, Nagao H, Yoshiyama H, Akiba H, Yagita H, Dosaka-Akita H & Jinushi M. Combined blockade of TIM-43 and TIM-4 augments cancer vaccine efficacy against established melanomas. **Cancer Immunol Immunotherapy** (in press)
2. 学会発表
- 1) Muroyama R, Goto K, Kowatari N, Li WW, Nakagawa R, Kato N. Fusion HBx translated from hepatitis B virus integrant is a responsible molecule for hepatocarcinogenesis and could be a universal treatment target. The 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. September 22-25, 2012. Oxford, UK.
- 2) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. A genome wide association study for HCV-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 6, 2012. Venice, Italy.
- 3) Goto K, Muroyama R, Kowatari N, Nakagawa R, Li W, Kato N. Exploration for inducers of MICA, a GWAS-identified genetic susceptibility factor for HCV-induced HCC. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy. October 6, 2012
- 4) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. A genome wide association study of HCV induced liver cirrhosis identified novel susceptibility loci at MHC region. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 9, 2012. Boston, USA.
- 5) Goto K, Muroyama R, Kowatari N, Nakagawa R, Li W, Kato N. HDAC inhibitors are potent suppressors of HCV-induced hepatocarcinogenesis by upregulating MICA, a GWAS-identified HCC susceptibility gene. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA. November 13, 2012

- 6) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Yoshida H, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. Genome wide association studies for HCV-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”. November 22, 2012. Tokyo, Japan.
- 7) Kato N. Host genetics and HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. 2012 Annual Conference of Taiwan Association for the Study of the Liver (TASL), Single Topic Conference on Chronic Hepatitis C. December 23, 2012. Kaohsiung, Taiwan.
- 8) Kato N. A genome wide association study for hepatitis C virus-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The 2nd Joint GCOE Symposium of The IMSUT & RCAST GCOE, The University of Tokyo and Chiba University GCOE “Current and Future Trends in Genome-based Immunity, Infection and Cancer”. January 28, 2013. Tokyo, Japan.
- 9) Matsuda K. Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma. ISVHLD 2012 25th June 2012 (Invited speaker).
- 10) Matsuda K. Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma KSLM 16th Oct 2012 (Invited speaker).
- 11) Matsuda K. GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis JCA-AACR joint symposium 25th Feb 2013 (Invited)
- 12) Matsuda K. MICA variation and soluble MICA are possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma 102th AACR meeting 2nd Apr 2012
- 13) 後藤覚、室山良介、李雯雯、中川良、古渡礼恵、加藤直也: C型肝癌感受性遺伝子 MICA を誘導する薬剤の探索。第 48 回日本肝臓学会総会、OWS-295、金沢、2012 年 6 月
- 14) 後藤覚、室山良介、李雯雯、中川良、古渡礼恵、加藤直也: C型肝癌感受性を決定する遺伝子 MICA を誘導する薬剤による肝発癌抑制法の開発。第 16 回肝臓学会大会 (第 20 回日本消化器関連学会週間)、肝 P-161、神戸、2012 年 10 月
- 15) 松田浩一. 遺伝子から分かる癌になりやすい体質とは 山梨県立中央病院 がん拠点病院勉強会 26th July 2012
- 16) 松田浩一. ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索—病気になりやすい体質とは?—第 2 回 Diabetes and endocrinology Forum 29th Nov 2012 (招待講演)
- 17) 松田浩一. 発癌関連遺伝子解析 10 年のあゆみ「オーダーメイド医療実現化プロジェクト 10 年間の歩みと未来への一歩」28th Jan 2013 (Invited)
- H. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 1) 出願名称: Methods for treating MICA-related disorders (MICA 関連疾患治療法)
 - 出願番号: WO/2008/036981
 - 国際出願番号:PCT/US2007/079342
 - 発明者: Glenn Dranoff, Masahisa Jinushi, F. Stephen Hodi
 2. 実用新案登録

特になし
 3. その他

特になし

II. 分担研究報告

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

研究分担者：加藤 直也 東京大学医科学研究所 疾患制御ゲノム医学ユニット 特任准教授
研究協力者：後藤 覚 東京大学医科学研究所 疾患制御ゲノム医学ユニット

分担研究課題：B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

研究要旨：われわれは、MICA遺伝子転写調節領域内SNPがB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) による肝発癌に関与し、B型肝炎患者において血中MICA濃度が上昇していることを報告した。そこで本研究ではMICAを介した新規肝癌治療薬開発を目指し、MICA発現を調節する薬剤の同定を試みている。

A. 研究目的

薬剤による MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) 発現制御を目的とする。本年度はまず初めに MICA 発現量変化をハイスループットで検出可能な MICA プロモータ活性測定系の構築、検証と小規模プライマリー・スクリーニングを目標とした。

B. 研究方法

培養細胞系として肝癌細胞株である Huh7、PLC/PRF/5 (Alexander) 細胞を用いた。薬剤は臨床応用を見据え、全て市販のものを利用した。MICA mRNA 発現は qRT-PCR により測定した。レポーターは MICA プロモータ配列を市販のルシフェラーゼベクターにクローニングし作製した。細胞毒性は細胞によるテトラゾリウム塩還元産物の培養上澄中吸光度により測定した。プライマリー・スクリーニングには市販の FDA-approved Drug Library を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞系において行われており倫理面への配慮を必要とする段階に至っていない。しかし、今後ヒト由来試料を用いる場合には厚生労働省等による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。

C. 研究結果

これまでに肝癌細胞株やヒト白血病 T 細胞株において MICA 発現誘導が知られている酪酸ナトリウム (Sodium butyrate: NaB) 処理をしたところ、用いた Huh7、Alexander 両細胞において顕著な MICA mRNA レベル上昇が観察された。一方で MICA プロモータ領域をルシフェラーゼ上流に連結したレポーターを作製後 Huh7、Alexander 両細胞

株において安定形質発現細胞クローンを単離した。それらに対して NaB 処理を行ったところ、同様に MICA mRNA レベルと共にルシフェラーゼ活性の顕著な上昇が観察された。上記の処理濃度において細胞毒性は観察されなかった。次に本系を用いて FDA-approved Drug Library による小規模プライマリー・スクリーニングを行い MICA の発現を制御し得る薬剤の候補を見出した。

D. 考察

MICA 発現誘導能が報告されている NaB により、肝癌細胞株における MICA mRNA 発現量上昇を本研究でも観察した。とりわけ NaB の HDAC (histone deacetylase) 阻害活性は興味深く、HAT (histone acetyltransferase) 阻害剤や HDAC 阻害剤をはじめヒストンのアセチル化を標的とした薬剤の利用可能性が示唆される。一方で同時に NaB 処理により、構築した MICA 発現レポーターシステムの検証も行うことができた。加えて本レポーターシステムが小規模プライマリー・スクリーニングにおいて検出した薬剤は全て米国食品医薬品局 (FDA) 承認薬であるため、候補剤が早期に肝癌治療へ応用され得る可能性を有している。今後はより規模を拡大したハイスループット・スクリーニングを視野に入れており、同定される低分子化合物は魅力的な抗肝癌剤候補となる。

E. 結論

薬剤探索レポーターシステムの構築を完了し、本年度の目標であったプライマリー・スクリーニングまで実施することができた。本研究において見出される薬剤は、MICA 発現調節を介した抗肝癌剤開発に直結するものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 38) Li Q, Yu C-H, Yu J-H, Liu L, Xie S-S, Li W-W, Yang X, Fan W-B, Gai Z-T, Chen S-J, Kato N. ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. **PLoS One** 2012; 7: e29928
- 39) Li Q, Li W-W, Yang X, Fan W-B, Yu J-H, Xie S-S, Liu L, Ma L-X, Chen S-J, Kato N. Type 2 diabetes and hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B. **Int J Cancer** 2012; 131: 1197-1202
- 40) Shiina S, Tateishi R, Imamura M, Teratani T, Koike Y, Sato S, Obi S, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Omata M, Koike K. Percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma: 20-year outcome and prognostic factors. **Liver Int** 2012; 32: 1434-1442
- 41) Kumar V, Lo PHY, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2012; 7: e44743
- 42) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. **J Hepatol** 2013 (Epub ahead of print)

2. 学会発表

- 18) Muroyama R, Goto K, Kowatari N, Li WW, Nakagawa R, Kato N. Fusion HBx translated from hepatitis B virus integrant is a responsible molecule for hepatocarcinogenesis and could be a universal treatment target. The 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. September 22-25, 2012. Oxford, UK.
- 19) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. A genome wide association study for HCV-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 6, 2012. Venice, Italy.

- 20) Goto K, Muroyama R, Kowatari N, Nakagawa R, Li W, Kato N. Exploration for inducers of MICA, a GWAS-identified genetic susceptibility factor for HCV-induced HCC. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy. October 6, 2012
- 21) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. A genome wide association study of HCV induced liver cirrhosis identified novel susceptibility loci at MHC region. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 9, 2012. Boston, USA.
- 22) Goto K, Muroyama R, Kowatari N, Nakagawa R, Li W, Kato N. HDAC inhibitors are potent suppressors of HCV-induced hepatocarcinogenesis by upregulating MICA, a GWAS-identified HCC susceptibility gene. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA. November 13, 2012
- 23) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Yoshida H, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. Genome wide association studies for HCV-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science". November 22, 2012. Tokyo, Japan.
- 24) Kato N. Host genetics and HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. 2012 Annual Conference of Taiwan Association for the Study of the Liver (TASL), Single Topic Conference on Chronic Hepatitis C. December 23, 2012. Kaohsiung, Taiwan.
- 25) Kato N. A genome wide association study for hepatitis C virus-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The 2nd Joint GCOE Symposium of The IMSUT & RCAST GCOE, The University of Tokyo and Chiba University GCOE "Current and Future Trends in Genome-based Immunity, Infection and Cancer". January 28, 2013. Tokyo, Japan.
- 26) 後藤覚、室山良介、李雯雯、中川良、古渡礼恵、加藤直也: C型肝癌感受性遺伝子 MICA を誘導する薬剤の探索。第48回日本肝臓学会総会、OWS-295、金沢、2012年6月
- 27) 後藤覚、室山良介、李雯雯、中川良、古渡礼恵、加藤直也: C型肝癌感受性を決定する遺伝子 MICA を誘導する薬剤による肝発癌抑制法の開発。第16回肝臓学会大会(第20回日本消化器関連学会週間)、肝 P-161、神戸、2012年10月

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

分担研究者：横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学・教授
研究協力者：神田 達郎 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学・講師

分担研究課題：肝発癌における自然免疫関与の解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)のHBe抗原が肝細胞において Receptor-Interacting Serine/Threonine Protein Kinase 2 (RIPK2)と相互作用し、RIPK2の発現を抑制することにより各種サイトカイン産生を抑制することを明らかにした。またHBV、HBx蛋白は炎症性サイトカインによるNF-κBの活性化を増強しており、HBVは獲得免疫のみならず、自然免疫系に影響することにより、慢性持続感染および肝発癌に寄与していることが再認識され、今後さらなる検討を行なう予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変および肝細胞癌の主要な原因の一つであり、その対策は重要課題である。これまでに Tumor necrosis factor (TNF), gamma interferon (IFN-gamma) はHBV排除に重要であり、TLR signalingはHBV複製を抑制することが知られている。一方、HBxはTNFの関与するNF-κB持続活性化を誘導し、TNFはHBxの安定化を増加させ、NF-κBシグナル伝達を介して、B型肝炎発癌に関与することが示唆されている。このようにB型肝炎の病態およびその発癌に肝自然免疫が深く関与していることが知られている。B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発を目的に、B型肝炎ウイルス(HBV)蛋白及びその関連の肝細胞サイトカイン産生に与える影響およびそのサイトカインの与える影響について検討した。

B. 研究方法

- 1) ヒト肝癌細胞 HepG2 に遺伝子を導入することにより HBe 抗原と HB コア蛋白、HB コア蛋白のみを産生する HepG2-HBeAg(+), HepG2-HBeAg(-)をそれぞれ作成した。
- 2) 細胞培養液中の蛋白産生の確認は HBe 抗原および HBcr 抗原を ELISA にて測定した。
- 3) 各肝細胞 RNA を用いてサイトカイン関連遺伝子発現を Real-time PCR にて比較検討した。
- 4) ヒト肝細胞 TPH1, HepG2 および Huh7 細胞において、レポーターアッセイにより TNF および HBx が NF-κB の活性化に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮) 血清の解析に関しては千葉大学医学部倫理委員会に申請(No.1241)し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。また、一般論として弱者、女性、少数民族の疫学調査等を行う場合は倫理上十分配慮している。

C. 研究結果

- 1) Genotype C HBeAg (+) ASC 患者の血清より HBV Pre-C/Core 領域をクローニングし、site-directed mutagenesis を用いて HBe 抗原発現および非発現ベクターを構築した。
- 2) HepG2 Stable Cell の Conditioned Medium 中に HBe 抗原の分泌を CLEIA 法にて確認した。
- 3) HBe 抗原は IFN, IL6 をはじめとするインターフェロン、サイトカイン産生を抑制することを確認した。
- 4) HBe 抗原は NF-κB 上流に位置する Receptor-Interacting Serine/Threonine Protein Kinase 2 (RIPK2)と相互作用することを免疫沈降、免疫染色を用いて明らかにした。
- 5) HBe 抗原は NOD1-RIPK2-NF-κB シグナル伝達経路を介した NF-κB の活性化を抑制し、肝細胞 IL6 産生を抑制することを確認した。
- 6) HBV 及び HBx 蛋白は TNF による NF-κB の活性化を増強した。この NF-κB 活性化はプロテアソーム阻害剤 MG132 により抑制された。

D. 考察

我々はこれまで HBV が増殖する場である肝細胞

胞に注目して解析を進めてきた。今回、HBe 抗原が RIPK2 と相互作用し、肝細胞インターフェロン、サイトカイン産生を抑制することを見出した。また、HBe 抗原が NOD1-RIPK2-NF- κ B 活性化シグナル伝達経路と相互作用することを明らかにしたことから、この経路が HBV 持続感染における創薬ターゲットになりうる可能性が示唆された。

また B 型肝炎では、その血中炎症性サイトカイン TNF, IL1 β 等が増加していることが知られているが、今後 HBV, HBx による TNF の NF- κ B 活性化増強機序について更なる検討を行なうことで、B 型肝炎ウイルスと肝自然免疫の相互作用をより明らかにし、B 型肝炎による発がん過程における自然免疫の関与を明らかにしていきたいと考えている。

E. 結論

HBe 抗原は NF- κ B と IFN β プロモーターの上流に存在する RIPK2 の発現を抑制し、RIPK2 と相互作用することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma cells. *Anticancer Res.* 2012; 32: 3775-83. PubMed PMID: 22993319.
- 2) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. *J Infect Dis.* 2012 ;206: 415-20. Epub 2012 May 21. PubMed PMID: 22615316.
- 3) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y. Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol Res.* 2012; 42: 523-542. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00981.x. PubMed PMID: 22568457.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特になし

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

研究分担者： 小池和彦 東京大学医学部 (病)・教授
研究協力者： 大塚基之 東京大学医学部 (病)・助教

分担研究課題： 肝癌関連遺伝子 MICA の microRNA による発現制御

研究要旨：我々が以前、B型・C型ウイルス肝炎感染からの肝臓癌発生に相関する一塩基多型 (SNP) が MICA 遺伝子の上流に存在することを報告した。MICA 蛋白は本来、ウイルス感染肝細胞や癌細胞に発現し免疫細胞を活性化して排除に向かわせる役割を担っているが、SNP 依存的な MICA 蛋白の発現量の多寡が肝臓癌発生と相関していた。この結果に基づいて本研究は、microRNA を用いた転写後修飾による MICA 蛋白発現制御を応用した肝癌予防法・治療法の開発を目的としている。MICA 遺伝子の 3' UTR 内には microRNA-92 および -106b が標的としうる配列が 2 箇所存在し、実際にその microRNA の過剰発現系を用いたレポーターアッセイでこれらの microRNA の標的になることを確認した。同様に、microRNA-92 および 106b の機能を阻害すると、MICA 蛋白の発現量が増えることも確認された。ただし、もともと MICA 蛋白を全く発現していない細胞ではその調節が効かないことから、転写後調節ではなく転写自体による発現調節の存在も同時に示唆された。MICA 蛋白の発現量に相関して、MICA 蛋白のレセプターであり免疫排除機構を誘導する NKG2D と MICA 蛋白発現細胞との間の結合量に変化が生じることが確認されたため、MICA 蛋白の発現量の制御を、そのままウイルス感染細胞や癌細胞の排除機能の制御につなげることが可能と思われた。これらの結果は今後の核酸医薬を用いた MICA 蛋白発現制御を介した肝発癌の予防および治療法開発に向けた基盤となると考えられる。

A. 研究目的

我々はこれまでに、ゲノムワイドアソシエーションスタディ解析 (GWAS) によって、B型肝炎・C型肝炎ウイルス感染から肝臓癌の発生に関わる疾患感受性因子として MHC class I polypeptide-related sequence A gene (MICA 遺伝子) の一塩基多型 (SNP) を同定し報告した (*Nat Genet* 2011, *PLoS ONE* 2012)。

MICA は本来、ウイルス感染肝細胞に高度に発現し natural killer 細胞や CD8+T 細胞を活性化して感染細胞の排除に向かわせる役割を担っていると考えられている遺伝子である。同定された SNP は MICA 遺伝子の 5' flanking region に存在し、MICA 遺伝子の発現量を調節していることが示唆されている。そのいっぽうで、MICA の発現量の調節は、そのすべてをプロモーター活性に依存しているわけではなく、転写後の mRNA 分解や翻訳抑制も重要とされている。特に癌細胞では MICA を標的とする microRNA が過剰発現する結果、MICA の発現が低いままに抑えられ、免疫担当細胞による癌細胞の排除機構を回避している

可能性がある。さらには、逆に MICA が高発現してもその後の翻訳後修飾の変化によって soluble form の MICA の量が増える結果、末梢部位で MICA の受容体である NKG2D 陽性細胞が trap され、本来排除されるべき MICA 発現肝細胞が NKG2D 陽性細胞からの攻撃を回避している可能性も示唆されている。

いずれにしても MICA 遺伝子の発現量の調節機構を解明しそれを制御する方法を開発することは、感染肝細胞の排除あるいは癌化細胞の免疫学的排除を介して、肝炎ウイルス感染からの肝臓癌発生を制御するためにも極めて重要と考えられる。そこで、MICA の遺伝子発現量の調節によって行なう肝炎ウイルス感染からの肝癌予防法・治療法の開発のために、本研究ではまず microRNA による MICA 蛋白発現の制御機構を明らかにすることを目的とした。

B. 方法

(1) はじめに、広く研究用途に用いられている各種肝臓癌細胞株の MICA 発現量を FACS で検定し