F. 研究発表

1. 論文発表

1) Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. **PLoS One** 2013; 8: e61279
2) 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; 58: 875-882
3) Goto K, Lin W, Zhang L, Jilg N, Shao RX, Schaefer EA, Zhao H, Fusco DN, Peng LF, Kato N, Chung RT. The AMPK-related kinase SNARK regulates hepatitis C virus replication and pathogenesis through enhancement of TGF-β signaling. **J Hepatol** 2013; 59: 942-948
4) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol** 2014; 49: 748-754
5) Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, Koike K. Impact of IL28B genetic variation on HCV-induced liver fibrosis, inflammation, and steatosis: a meta-analysis. **PLoS One** 2014; 9: e91822
6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Hepatol Res** 2013 (Epub ahead of print)

2. 学会発表

1) Naoya Kato, Vinod Kumar, Ryosuke Muroyama, Ryosuke Tateishi, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Masao Omata, Kazuhiko Koike, Koichi Matsuda. MICA plays an opposite role in hepatocarcinogenesis between hepatitis B and hepatitis C. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Amsterdam, Netherlands. 24-28 April, 2013
2) Ryosuke Muroyama, Kaku Goto, Norie Kowatari, Wenwen Li, Ryo Nakagawa, Naoya Kato. Regulation of MHC class I-related chain A on hepatocellular carcinoma by microRNAs. 40th IMSUT Founding Commemorative Symposium. Tokyo, Japan. 30-31 May, 2013
3) 加藤直也、室山良介、小池和彦. 肝発癌において自然免疫関連分子 MICA は B 型肝炎と C 型肝炎では反対の役目を担っている. 第 49 回日本肝臓学会総会. 東京. 2013 年 6 月 6-7 日
4) 加藤直也. 肝硬変における BCAA の最近の話題－BCAA は肝発癌抑止に関わる自然免疫分子を誘導する. 第 49 回日本肝癌研究会. 東京. 2013 年 7 月 11-12 日
5) Ryosuke Muroyama, Vinod Kumar, Kaku Goto, Norie Kowatari, Wenwen Li, Ryo Nakagawa, Ryosuke Tateishi, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Masao Omata, Kazuhiko Koike, Koichi Matsuda, Naoya Kato. MICA might have opposite effect on

hepatocarcinogenesis between B-HCC and C-HCC. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 20-23 October, 2013

6) Kaku Goto, Ryosuke Muroyama, Wenwen Li, Norie Kowatari, Ryo Nakagawa, Naoya Kato. Effective inducers of a GWAS-discovered anti-HCC gene MICA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 6-10 October, 2013

7) 室山良介、松田浩一、加藤直也. ゲノムワイド関連解析による C 型肝硬変/肝癌の感受性遺伝子の同定. 第 17 回日本肝臓学会大会. 東京. 2013 年 10 月 9 日-10 日.

8) 後藤　覚、室山良介、李ウェンウェン、中川　良、古渡礼恵、加藤 直也. GWAS により同定された肝癌感受性遺伝子 MICA の発現を誘導する薬剤の探索. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜. 2013 年 10 月 3-5 日

9) Kaku Goto, Ryosuke Muroyama, Wenwen Li, Norie Kowatari, Ryo Nakagawa, Naoya Kato. An HCV-HCC susceptibility gene MICA found in GWAS was effectively induced by HDAC inhibitors. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington, DC, U.S.A. 1-5 November, 2013

10) 後藤覚: GWAS における HCV-HCC 感受性遺伝子 MICA の発現誘導剤探索。肝炎ウイルス研修会 2013. 東京. 2013 年 12 月 18 日

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

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）
分担研究報告書（平成25年度）

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

分担研究者：横須賀　收　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
中本　晋吾　千葉大学大学院医学研究院分子ウイルス学・助教

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：慢性B型肝炎の進展には自然免疫および獲得免疫の両者が重要であることが知られている．特にToll-like receptor (TLR), サイトカイン, インターフェロンシグナル伝達経路を含む自然免疫は特に重要と考えられている．我々はこれまでにB型肝炎ウイルス(HBV)とReceptor-Interacting Serine/Threonine Protein Kinase 2 (RIPK2)の相互作用について報告してきた．今回の研究では肝細胞においてHBV増殖はNF-κB活性化を誘導し，この作用はTNFおよびIL1βで増強することを明らかにした．一方，TNFやIFNαでRIPK2の発現を増強させると，HBV増殖は抑制された．RIPK2はHBV増殖に関与し，HBV増殖抑制の一つの標的分子となり得る可能性が示唆された．またHBV増殖と関連してTLR関連microRNAの発現に変化がみられ，HBVはmicroRNAを介して自然免疫に影響を与えている可能性が示唆された．

A. 研究目的

これまでに，我々は HBV HBe 抗原が 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報告してきた(Wu et al. J Infect Dis 2012)．また肝細胞において TNF は RIPK2 を誘導することも報告してきた．今回 RIPK2 の発現と HBV 増殖の関連について検討した．また HBV 感染における microRNAs (miRNAs)の関連についても検討した．

B. 研究方法

1) Western blotting にて各種肝細胞におけるサイトカイン受容体 TNFR1, TNFR2, IL1R1, ILR2 の発現を蛋白レベルで確認した．

2) ヒト肝細胞 TPH1 および Huh7 に NF-κB レポーターベクターおよび HBV 発現ベクターを共に細胞内遺伝子導入した後，TNF および IL1βを添加しその活性化に対する影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した．

3) HepG2.2.15 細胞をインターフェロン α (10,00IU/mL), TNF (100 ng/mL)で刺激後，120 時間での細胞内 RIPK2 mRNA レベルと Conditioned Medium および細胞内 HBV DNA 量を比較検討した．

4) HBV 感染増殖と miRNA 発現状態との関連を調べるため，HepG2 および HepG2.2.15 細胞で 1008 種類の miRNAs について real-time PCR によりその発現を網羅的に比較検討した．

（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，個人情報を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) ヒト肝細胞 HepG2, HepG2.2.15, Huh7, TPH1 において TNF および IL1βに対する

受容体 TNFR1, TNFR2 および IL1R1, ILR2 の発現を蛋白レベルで確認した.

2) ヒト肝細胞 Huh7 および TPH1 では HBV により NF-κB は活性化された(3.2-fold)が, TNF (8.6-fold, $p<0.05$)または IL1β (8.0-fold, $p<0.05$) により Cooperative effects がみられ, 更なる増加がみられた.

3) HepG2.2.15 細胞をインターフェロン α, または TNF 刺激すると, 細胞内 RIPK2 の発現は増加し(2.1~2.6-fold), Conditioned Medium 中(0.03~0.05-fold)および細胞内 HBV DNA(0.21~0.38-fold)の発現減少がみられた.

4) 1008 種類の miRNAs の内, HepG2 と比較し, HepG2.2.15 で少なくとも 30 種類(2.9%)の miRNAs で 5 倍以上の発現増加を認めた. HepG2.2.15 細胞で 5 倍以上の発現増加を認めた miRNA のうち 7 miRNAs (miR-200b-3p, miR-148a-3p, miR-145-5p, miR-146b-5p, miR-200c-3p, miR-455-3p, miR-455-5p) は TLR 伝達経路関連 miRNAs として既に報告されていた. HepG2.2.15 細胞で 5 倍以上の発現低下を認めた 35 miRNA (3.4%)のうち, 8 miRNAs (let-7e-5p, let-7a-3p, let-7i-3p, let-7a-5p, let-7d-5p, let-7i-5p, miR-132-3p, let-7b-5p)も TLR 伝達経路関連 miRNAs として既に報告されていた.

D. 考察

一般に, B 型慢性肝炎では血中炎症性サイトカイン TNF や IL1β の増加がみられることが報告されている. 肝細胞ではそれぞれに対する受容体が発現しており, HBV は NF-κB を活性化し, この効果は TNF や IL1β といった炎症性サイトカインで増強されることが明らかになった.

近年 RIPK2 ノックアウトマウスでインフルエンザ感染症の重篤化が観察されている(Lupfer et al. Nat Immunol 2013).

今回我々の研究により, インターフェロン α や TNF は肝細胞において RIPK2 を発現増加させ, 肝細胞内および Conditioned Medium 中の HBV DNA レベルを低下させることが明らかとなった.

一方これまでに, C 型肝炎ウイルスでは microRNA miR-122 や miR-130a が重要であり, HIV 感染症でも miRNA が持続感染に関与していることが報告されている. 今回我々の検討から, 慢性 HBV 持続性感染でも miRNAs が宿主免疫反応を修飾し重要な役割をしている可能性が改めて示唆された.

E. 結論

RIPK2 は HBV の増殖複製に関与し, HBV 治療薬の一つの標的である可能性が示唆された. また HBV 感染期間中に miRNAs の発現状態が変化し、HBV 感染に対する自然免疫が変化することが示唆され, HBV 感染症において miRNAs が重要であると考えられた.

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, Yokosuka O. Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells. Cytokine 64(2): 577-83, 2013.

2) Jiang X, Kanda T, Tanaka T, Wu S, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines. Immunol Lett 152(1): 8-15, 2013.

3) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gonoi T, Yokosuka O. Prevalence of hepatitis C virus subgenotypes 1a and 1b in Japanese patients: ultra-deep sequencing analysis of HCV NS5B genotype-specific region. PLoS One 8(9): e73615, 2013.

4) Miyauchi T, Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Kato K, Arai M, Mikami S, Sugiura N, Kimura M, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or entecavir against

virological rebound after achieving HBV DNA negativity in chronic hepatitis B patients. Int J Med Sci 10(6): 647-52, 2013.
5) Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, Yokosuka O. Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine. Int J Med Sci 10(5): 567-74, 2013.
6) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O. Regulation of miRNA by HBV infection and their possible association with control of innate immunity. World J Gastroenterol 2014 (in press).

G. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特になし

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）
分担研究報告書（平成25年度）

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

分担研究者：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：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。我々は以前に、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し、SNP依存的なMICA蛋白の発現量の多寡が肝癌発生と相関していることを報告した。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個所存在し、実際にそのmicroRNAの過剰発現系、および microRNA-92および106bの機能を阻害するオリゴ核酸の肝細胞への導入で、MICA蛋白の発現量を調節できることが示された。さらに肝細胞指向性をもつB型肝炎ウイルスLarge S 蛋白を応用したbionanoparticle にオリゴ核酸を封入することで、肝細胞特異的にオリゴ核酸を導入できる系を確立し、 MICA蛋白の発現量をこの系を用いて調節しうることが示された。初代ヒト肝細胞を用いたHBV複製系では、microRNA-92の発現が低下するとともに培養上清中の可溶型MICAの量が増えており、HBV感染細胞の免疫排除系からの回避機構のひとつになっている可能性が示唆された。これらの結果に今後のさらなる分子機構・生理的意義の解明を加えることによって、オリゴ核酸のB型肝炎ウイルス感染肝細胞への導入によるMICA蛋白の発現量調節が、ウイルス感染細胞の排除やウイルス感染による肝発癌の予防法のひとつになる可能性が考えられた。

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MKG2D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るB型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、本年度は 昨年度に引き続き microRNAによるMICA蛋白発現の制御方法の開発を進め、創薬の観点から効果的な肝細胞デリバリー法を検証した。

B. 研究方法

（1）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効果を検証した。

（2）microRNAの発現をmimicする過剰発現コンストラクト、microRNAの機能を落とすanti-sense配列発現コンストラクトを用いてMICAの発現変化を検定した。

（3）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。

（4）抽出・検証したMICA発現調節に関わるmicroRNAをHBV large S 蛋白の殻に封入したbionanoparticleを作製し肝細胞へのmicroRNAのデリバリーと機能を検証した。

（5）HBVが感染複製しうる培養初代ヒト肝細胞を用いて、HBVが感染した際のmicroRNAの発現量の変化を網羅的に解析した。

「倫理面への配慮」：今回の研究はin vitroでの研究が主体であり 倫理面での問題はないものと考える。

C. 研究結果

（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。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個所)を同定し、実際にそれらの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。

（2）これらの microRNA の過剰発現と、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、それらのコンストラクトを導入した肝細胞では 導入コンストラクトに応じて MICA の発現量が減少・増加することが確認された。これらの microRNA は MICA の発現に密接に関わることが確認された。

（3）microRNA の制御に伴う MICA の発現量変化と相関して、MICA 発現細胞の排除に関与する 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。

（4）HBV large S 蛋白を酵母を用いて合成しその内部に遺伝子を封入し肝細胞特異的に導入する方法は以前に樹立されていた。そこで、上記の microRNA を HBV large S 蛋白内に封入し、肝細胞特異的なデリバリー法として応用できないか検証した。今回はこの方法を用いて in vitro において細胞内に microRNA が導入され実際に機能して MICA 蛋白の発現を変化させることを確認した。

（5）初代ヒト肝細胞に HBV を感染させ、複製維持されることを確認した。この系を用いて、HBV 感染後の microRNA の発現量の変化について microRNA microarray を用いて検証したところ、検証した計 2000 種類の microRNA のうち microRNA93 の発現が HBV 感染・複製に伴って有意に減少していた。MICA 蛋白は microRNA93 によって発現調節を受けることが上記の検討から明らかになっていたため、この系で細胞表面の MICA の発現を検討したところ、HBV の感染によって細胞表面の MICA 蛋白の発現量は変化が無いものの、培養上清中の MICA 量は増加していた。この結果から、初代ヒト肝細胞における HBV の感染系では、microRNA93 の発現が低下するものの それに伴う MICA の発現量増加は細胞表面で見られるのではなく、可溶性の sMICA として培養上清中の量が増えることで認められるということが判明した。

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。C 型肝炎ウイルス感染からの肝発癌においては MICA 遺伝子発現を抑える方向に働く SNP が肝発癌に関与（rs2596542 の A allele： $P = 4.21 \times 10^{-13}$, オッズ比 1.39）していたが、不思議なことに、B 型肝炎ウイルス感染からの肝発癌においては逆に MICA 遺伝子の発現を増やす SNP が肝発癌と相関（rs2596542 の G allele： $P = 0.029$, オッズ比 1.19）していた。B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス感染からの発癌における MICA の SNP のリスクアレルについての真逆の結果の生物学的意義や分子機構は現時点ではまだ不明であるが、いずれにしても MICA 遺伝子の発現量と制御がウイルス感染からの肝発癌に密接に関与していることはこれらの結果か

ら強く示唆されていた。

今回の我々の検討によって、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はいたが、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しめされた。また、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。ここまでの内容については今年度 論文としてまとめ報告した（Kishikawa et al. Sci Rep）。

さらに、初代ヒト肝細胞を用いた検討結果から、HBVの感染に伴ってMICAを発現調節に関与するmicroRNAの発現が変化し、それに伴って 実際にMICAの発現量も変化するものの、発現増加したMICA蛋白は細胞表面にとどまらず培養上清に出ていくことが明らかとなった。この現象についての分子機構や生理的意義については次年度以降 引き続き検討を重ねていく予定である。また、創薬実用化の観点からmicroRNAのbio-nano-particle封入による肝細胞デリバリー法の検証についてもin vitroでの検討は終了しており、次年度以降 vivoでの検討をすすめMICA蛋白のmicroRNAによる発現調節を介したウイルス駆除および肝癌予防法の開発を目指す。

E. 結論

MICA蛋白の発現量はmicroRNAおよびそのanti-senseの発現によって調節が可能であった。さらにBionanoparticleを用いることでmicroRNAをはじめとするオリゴ核酸を肝細胞特異的に導入することが出来る可能性が開け、創薬実用化に向けた大切な進展が得られたと考える。また、初代ヒト肝細胞を用いたHBV複製系での検討から、HBVはMICAを標的とするmicroRNA93の発現量を変化させ、その結果 発現量が増加したMICA蛋白は細胞表面にとどまることなく細胞上清中にsheddingされることが明らかとなった。その分子機構と生物学的な意義の解明を突き詰めていくことによって、これら結果に基づいた肝癌予防法あるいはHBV感染細胞の排除法の開発につなげられる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

A英文

1) Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H,

Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. **Int J Cancer** 2014 Jan 13. doi: 10.1002/ijc.28720. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24420733.

2) Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2014 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24395807.

3) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. **J Gastroenterol** 2013 Nov 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID:24258409.

4) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. **Hepatol Res** 2013 Nov 14. doi:10.1111/hepr.12275. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24224477.

5) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. **Int J Cancer** 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24174293.

6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus Infection. **Hepatol Res** 2013 Oct 11. doi: 10.1111/hepr.12258. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24125181.

7) Uchino R, Isayama H, Tsujino T, Sasahira N, Ito Y, Matsubara S, Takahara N, Arizumi T, Toda N, Mohri D, Togawa O, Yagioka H, Yanagihara Y, Nakajima K, Akiyama D, Hamada T, Miyabayashi K, Mizuno S, Kawakubo K, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Nakai Y, Hirano K, Tada M, Koike K. Results of the Tokyo

Trial of Prevention of Post-ERCP Pancreatitis with Risperidone-2: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **Gastrointest Endosc** 2013 Jul 30. doi:pii: S0016-5107(13)02093-2. 10.1016/j.gie.2013.06.028. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23910063.

8) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H. Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers. **Hepatol Res** 2013 Aug 14. doi: 10.1111/hepr.12221. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23941604.

9) Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, Koike K. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. **Biochem Biophys Res Commun** 2013 Jul 23. doi:pii: S0006-291X(13)01224-2. 10.1016/j.bbrc.2013.07.064. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23891753.

10) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. **Hepatol Res** 2013 Jul 11. doi:10.1111/hepr.12203. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23841664.

11) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, Koike K. Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. **J Gastroenterol** 2013 Jun 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23783841.

12) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of HBV after the onset lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. **Clin Infect Dis** 2013 May 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23704123.

13) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol** 2013 May 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23689989.

14) Mikoshiba N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, Koike K. Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life. **Psychooncology** 2013 May 19. doi:10.1002/pon.3300. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23686523.

15) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, Koike K. CT with hepatic arterioportography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial. **Am J Gastroenterol** 2013 Apr 30. doi: 10.1038/ajg.2013.109. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23629602.

16) Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, Koike K. Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor. **PLoS One** 2013;8(11):e78346. PubMed PMID: 24223793

17) 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;43(10):1005-1012. PubMed PMID: 23356977.

18) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalapour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. **Cell** 2013;155(2):384-396. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031. PubMed PMID: 24120137.

19) Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, Koike K. Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs. **Sci Rep** 2013 Sep 24;3:2739. doi:10.1038/srep02739. PubMed PMID: 24061441.

20) 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;432(1):22-27. PMID: 23376718.

21) Koike K. The oncogenic role of hepatitis C virus. **Recent Results Cancer Res** 2014;193:97-111. PMID: 24008295.

22) Uchino K, Tateishi R, Nakagawa H, Shindoh J, Sugawara Y, Akahane M, Shibahara J, Yoshida H, Koike K. Uninodular combined hepatocellular and cholangiocarcinoma with multiple non-neoplastic hypervascular lesions appearing in the liver of a patient with HIV and HCV coinfection. **J Clin Virol** 2013;57(2):173-177. PMID: 23434197.

23) Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, Koike K. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. **Sci Rep** 2013 Aug 30;3:2553. doi: 10.1038/srep02553. PubMed PMID: 23989853.

24) 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** 2013;43(6):596-604. PubMed PMID: 23131000.

25) 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;58(5):875-882. PubMed PMID: 23321320.

26) 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** 2013;48(3):366-373. PMID: 22790352

27) Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2013 Apr 12;8(4):e59040. doi:

10.1371/journal.pone.0059040. Print 2013. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.

28) Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the mica promoter which regulates mica expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. **PLoS One** 2013 Apr 11;8(4):e61279. doi: 10.1371/journal.pone.0061279. Print 2013. PubMed PMID: 23593449; PubMed Central PMCID: PMC3623965.

29) 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** 2013;48(2):254-268. PMID: 22790350.

30) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 2013;57:417-418. PubMed PMID: 22707340.

31) 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-κB activity via directly targeting Dnmt1 expression. **Hepatology** 2013;57:162-170. PMID: 22898998.

2. 学会発表

なし

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

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）
分担研究報告書（平成25年度）

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

分担研究者：松田浩一　東京大学医科学研究所　准教授

分担研究課題：B型肝癌の発癌感受性遺伝子の探索

研究要旨：発癌リスク感受性遺伝子であるMICAのプロモータ領域の解析の結果、SP1の結合に影響を与える機能的SNPを同定した。このSNPのGアレル特異的に転写因子SP1が結合し、遺伝子の発現を活性化することが明らかとなった。またこの遺伝子多型と血中MICA濃度が有意な関連を示した。これらの結果より、MICAが肝癌の感受性領域の責任遺伝子であることが示された。これまでに、HBV陽性肝癌約200例、慢性B型肝炎約2000例のゲノムワイドのタイピングが終了した。これらの結果を元に、新規のHBV陽性肝癌の感受性遺伝子の探索を進めている。

A.　研究目的

MICA多型及び分泌型MICAのHBV陽性肝癌の発症リスクや予後に及ぼす影響を検討することによって、B型肝癌における自然免疫の機能解明目指す。

B.　研究方法

ゲノム創薬に向けた取り組みとして、MICAの活性化による肝癌予防法の開発を目指している。そこで実際にMICAが疾患感受性領域の原因遺伝子であるかを検証するために、MICA遺伝子のプロモーター領域について機能的なSNPの探索を行なった。

また新規の発癌関連遺伝子の同定を目的として、HBV陽性肝癌症例約200例、慢性B型肝炎症約2000例を用いてゲノムワイドのタイピングを進めている。これらの結果を元に、新規のB型肝癌感受性遺伝子のスクリーニングを行う。

（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。

C.　研究結果

MICAのプロモーター領域にある12のSNPについて、網羅的にEMSAを行ったところ、rs2596538のGアレル特異的に転写因子が結合することが同定された。インシリコの解析および抗体などを用いた競合阻害実験によって、SP-1が結合する可能性が示された。この結果は、レポーターアッセイヤ、CHIP assay, SP1の過剰発現がMICAの遺伝子発現量を増加させることなどから証明された（**参考文献1**）。C型の肝癌患者では、SP-1に対して親和性が高いGアレルを持つ人では、血清MICA値が高く、肝癌の発症リスクが低くなることから、MICAが肝癌発症に対して予防的に働くことが示された。MICAの活性化が肝癌の治療に有用となりうることが示された。

またこれまで収集を行った肝癌症例の内、発症原因不明な５０４例について血中HBs-Ag及び抗HCV抗体の測定を行った。その結果、B型肝癌11名、C型肝癌83名について発症原因を特定した。これらの結果を元に、HBV陽性肝癌症例約200例、慢性B型肝炎症例約2000例を用いた全ゲノムタイピングを施行中である。

D.　考察

rs2596542アレルとsMICAの相関については HCV 陽性肝癌と同様の相関を示しており、HBV陽性肝癌にいおいても遺伝子多型がMICAの発現制御に重要であることが示された。GWASで同定されたrs2596542は今回アレル特異的なSP1の結

合が示されたrs2596538と強い連鎖にあることから、rs2596538 が機能的な SNP である事、また MICA の発現量の違いが予後に影響を与えることが示された。
一方、B 型肝癌と C 型肝癌ではリスクアレルが逆転しているため、MICA の腫瘍発生、腫瘍免疫に対する機能も異なる可能性があるので、今後さらなる機能解析が必要となると考えられる。
また新規の疾患感受性遺伝子の同定が必須となる。現在我々は症例数を増やした解析を勧めている。

E. 結論

本解析の結果、MICA 多型が慢性 B 型肝炎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。現在新規の疾患感受性遺伝子の同定及びゲノム創薬に向けた研究を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. PLoS One. 2013 Apr 11;8(4):e61279.
2. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region.
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. J Hepatol. 2013 May;58(5):875-82.
3. Impact of PSCA variation on gastric ulcer susceptibility. Tanikawa C, Matsuo K, Kubo M, Takahashi A, Ito H, Tanaka H, Yatabe Y, Yamao K, Kamatani N, Tajima K, Nakamura Y, Matsuda K. PLoS One. 2013 May 21;8(5):e63698.
4. Germline variants and advanced colorectal adenomas: adenoma prevention with celecoxib trial genome-wide association study. Wang J, Carvajal-Carmona LG, Chu JH, Zauber AG; APC Trial Collaborators, Kubo M, Matsuda K, Dunlop M, Houlston RS, Sieber O, Lipton L, Gibbs P, Martin NG, Montgomery GW, Young J, Baird PN, Ratain MJ, Nakamura Y, Weiss ST, Tomlinson I, Bert gnolli MM. Clin Cancer Res. 2013 Dec 1;19(23):6430-7.
5. Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians. Zhang B, Jia WH, Matsuo K, Shin A, Xiang YB, Matsuda K, Jee SH, Kim DH, Cheah PY, Ren Z, Cai Q, Long J, Shi J, Wen W, Yang G, Ji BT, Pan ZZ, Matsuda F, Gao YT, Oh JH, Ahn YO, Kubo M, Thean LF, Park EJ, Li HL, Park JW, Jo J, Jeong JY, Hosono S, Nakamura Y, Shu XO, Zeng YX, Zheng W. Int J Cancer. 2014 Jan 21. doi: 10.1002/ijc.28733.

2. 学会発表

1. 発癌関連遺伝子解析 10 年のあゆみ バイオバンクシンポジウム 2013.1.28 品川、東京 (Invited speaker).
2. GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis. JCA -AACR joint symposium. 2013.2.25 Maui, Hawaii, U.S.A. (Invited speaker).
3. 遺伝子、生活習慣と癌について 平成 25 年 3 月 9 日 第 15 回泌尿器疾患ゲノム解析研究会 高知 (Invited speaker).
4. MICA variation and soluble MICA are possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma 102th AACR meeting 2nd Apr 2012
5. 個別化医療へ向けた遺伝子多型研究 第 13 回 東京大学生命科学シンポジウム 2013.6.8 (Invited speaker).
6. The roles of gene-environmental interaction in human carcinogenesis. 日本癌学会シンポジウム 2013.10.2. 横浜

7. 「聞いて納得！遺 伝子と病気の関係
～がん・糖尿病・アレルギーなど～」
市民公開講座 ひとりひとりに合った医療をめざして」 2013.12.8. 盛岡(Invited speaker).

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

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）
分担研究報告書（平成25年度）

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

分担研究者：地主 将久

分担研究課題：B型肝癌におけるNKG2D依存免疫システムのインパクトについての検討

研究要旨：がん進展における腫瘍マクロファージ(Mac)の重要性を背景として、組織、腫瘍MacのNKG2D発現を検討したところ、腫瘍内Macで他組織Macと比較して高いNKG2D発現を認めた。NKG2D陽性Macは、腫瘍細胞の貪食レセプターとして機能し、その免疫原性を正に保持する機能を有することを同定した。また、NKG2D陽性およびNKG2D遺伝子欠損Mac移入キメラマウスでの検討により、NKG2D陽性Macは抗がん剤やIFNなど免疫療法の抗腫瘍効果を相乗的に高めることが明らかとなった。さらに、現在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構築中である。また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。

A. 研究目的

研究目的は次の２点である。第一に、NKG2D 依存免疫システムが腫瘍マクロファージによる発癌制御に与えるインパクトを世界で初めて明らかにすること、第二に、NKG2D 免疫システムの肝発癌自然史に与えるインパクトを、NKG2D 遺伝子欠損１HBV 自然発癌モデルを対象に検討することである、HB 以上の検討を通して、新たな発癌発症マーカーや分子標的剤開発につなげることを目的とする。

B. 研究方法

・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。

・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 免疫システムが発癌活性や抗腫瘍応答に与えるについて検証した。

（倫理面への配慮）

動物実験に際し、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、当該研究を行った。以上より、実験方法について倫理面の問題がないと判断した。

C. 研究結果

・腫瘍 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（腫瘍 vs 非腫瘍=20.7% vs 5 .4%)。

・NKG2D 陽性 Mac は、NKG2D リガンド発現腫瘍細胞の貪食取込を促進するとともに、IL-6、IFN-γ 産生など炎症応答を正に制御する役割を果たしていることを同定した。

・NKG2D 陽性 Mac および NKG2D 欠損 Mac を移入した NKG2D-KO マウスについて、抗がん剤など治療効果を検証したところ、NKG2D+Mac は、オキサロプラチンや IFN による抗腫瘍効果を改善することを明らかとした。

・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。
・TIM-4 を介した抗原処理・提示システムが HBV 感染、発癌病態に与える影響を HBV 感染肝細胞、TIM-4-KO マウスや HBX-TG マウスを対象に準備中である。

D. 考察

本研究では、NKG2D 陽性マクロファージによる新たな抗腫瘍免疫制御機構の存在を世界に先駆けて明らかにした。とくに肝癌において有効とされる白金系抗がん剤や IFN の治療効果を高める可能性が示唆されたことは臨床的に意義のあることと考えられる。今後の研究の進展により、腫瘍マクロファージにおける NKG2D 発現を制御する分子メカニズムの解明や、発現増強に寄与する薬剤の開発を推進することで、肝癌に対する抗がん効果の増強に寄与する創薬基盤に貢献できるものと考えられる。

E. 結論

NKG2D 陽性マクロファージの腫瘍監視メカニズムの一旦を明らかにしたとともに、その機能修飾が、今後の HBV 肝発癌の制御に重要な位置付けを占めうる可能性を提示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **Jinushi M***, Yagita H, Yoshiyama H, Tahara H. Putting the brakes on anticancer therapies: suppression of innate immune pathways by tumor-associated myeloid cells. **Trends in Molecular Medicine**, 19: 536-545, 2013.
2. Baghdadi M, Yoneda A, Yamashina T, Nagao H, Komohara Y, Nagai S, Akiba H, Foretz M, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Takeya M, Viollet B, Yagita H & **Jinushi M***. TIM-4 glycoprotein-mediated degradation of dying tumor cells by autophagy leads to reduced antigen presentation and increased immune tolerance. **Immunity** 39: 1070-1081, 2013.
3. Baghdadi M & **Jinushi M*** The impact of TIM gene family on tumor immunity and immunosuppression. **Cellular and Molecular Immunology** 11: 41-48, 2014.
4. **Jinushi M.*** Yin and yang of tumor inflammation: how innate immune suppressors shape the tumor microenvironments. **International Journal of Cancer**, published online 2013 Nov 22. doi: 10.1002/ijc.28626.
5. Komohara Y, **Jinushi M**, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. **Cancer Science**, published online 2013 Oct 30. doi: 10.1111/cas.12314.
6. Okamoto T, Hayashi Y, Mizuno H, Yanai H, Nishikawa J, Nakazawa T, Iizasa H, **Jinushi M**, Sakaida I, Yoshiyama H. Colonization of an acid resistant Kingella denitrificans in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by Helicobacter pylori. **J Infect Chemother**, 2013 Dec 11. pii: S1341-321X(13)00036-6. doi: 10.1016/j.jiac.2013.09.007.

* Corresponding author

2. 学会発表(招待講演のみ)

1. 地主 将久* 自然免疫修飾を介した新たながん免疫逃避メカニズムの解明. 新学術領域研究がん支援活動公開シンポジウム, 一ツ橋講堂(東京), January 29-30, 2013.
2. 地主 将久* 自然免疫応答の制御を介した腫瘍免疫逃避機構. 第 9 回宮崎サイエンスキャンプ, 宮崎, February 15～17: 宮崎シーガイア(宮崎), 2013.
3. Jinushi M* Tumor-infiltrating dendritic cells impede antitumor innate immunity through interaction of TIM-3 and HMGB1. 5th Annual Translational Symposium in University of Hawai'i Cancer Center. Honolulu, HI, USA, February 25, 2013.
4. Jinushi M*. Interaction between cancer cells and myeloid cells determine therapeutic responses to chemotherapy. STC Annual Meeting. National Harbor, MA, USA, November 7-9, 2013.
5. Jinushi M* Cancer-myeloid cell cross-talk is critical to regulate therapeutic responses to chemotherapy. 第４２回日本免疫学会学術集会, Symposium 「Tumor Immunology」幕張 , December 11-13, 2013.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

3. その他