

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：加藤 直也・東京大学医科学研究所・先端ゲノム医学分野・准教授
研究協力者：室山 良介・東京大学医科学研究所・先端ゲノム医学分野・特任助教
研究協力者：後藤 覚・東京大学医科学研究所・先端ゲノム医学分野・日本学術振興会
特別研究員

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：我々は、B型肝炎ウイルスによる肝臓にMICA遺伝子上の一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）が関与すること、さらに血中MICA濃度がMICA SNPの遺伝子型と相関し、B型肝炎において高いことを報告した。そこで、本研究では、1) MICAの発現調節機構を解明し、2) MICAの発現調節を介したB型肝炎抑止法を開発すること、を課題として取り組んだ。その結果、1) MICAの発現にはmicroRNAが重要な役割を担っていること、MICA遺伝子上のSNPによる血中MICA濃度の違いは、MICAプロモーター上のSNPによる転写活性の相違により規定されていること、2) MICA発現を上昇させる薬剤、を見出した。本研究を押し進めることで、患者の予後改善や治療に伴う負担の減少、さらには日本発の肝発癌予防薬、肝臓治療薬の開発に結びつけたい。

A. 研究目的

- 1) まず、MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) の発現が microRNA (miRNA) により制御されているかどうか、また、MICA の SNP が microRNA による制御に関与しているかどうか、につき検討を行った。加えて、MICA の SNP が mRNA の転写活性に及ぼす影響につき検討を行った。
- 2) 薬剤による MICA 発現制御を目的として、まずは MICA プロモーター活性測定細胞系を用いた MICA 発現増強薬のプライマリースクリーニングを行った。

B. 研究方法

- 1) 肝臓細胞株のうち、B型肝炎のリスクアレルを有する HLE 細胞と、プロテクティブアレルを有する Huh7 細胞の配列を検討に用いた。microRNA を介する制御については、MICA の 3'-UTR を 3'-UTR luc vector にクローニングして、ルシフェラー

ゼ活性を測定することにより検討した。転写活性については、MICA のプロモーター領域を luc vector にクローニングして、ルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。

- 2) 培養細胞系として肝臓細胞株である Huh7、PLC/PRF/5 (Alexander)、HepG2 細胞を用いた。薬剤は米国食品医薬品局 (FDA) 承認薬剤をプライマリースクリーニングに用いた。MICA mRNA 発現は qRT-PCR により測定した。MICA タンパク質は immunofluorescence および FACS により検出した。培養細胞上清中可溶性 MICA (soluble MICA: sMICA) 濃度は ELISA により測定した。転写活性については、MICA のプロモーター領域を luc vector にクローニングして、ルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。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。

(倫理面への配慮)

本研究は、今までのところ培養細胞株を用いた検討を行っており、倫理面への配慮は特に必要ない。将来的にヒト由来試料を用いる場合には、厚生労働省等により定められた「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

1) MICA の 3'-UTR 領域をクローニングした 3'-UTR luc vector を用いた検討では、HLE、Huh7 細胞由来の配列とともにルシフェラーゼ活性の低下を認めたが、両者間に差は認められなかった。すなわち、MICA 発現は microRNA の制御を受けるが、SNP によりその制御に違いはないことが明らかになった。

それに対し、MICA のプロモーター領域をクローニングした luc vector を用いた検討では、Huh7 細胞由来の配列に比し、HLE 細胞由来の配列では約 3~4 倍、ルシフェラーゼ活性が高値であった。さらに検討を進め、両者間のルシフェラーゼ活性の相違を生じさせる SNP を探索したところ、プロモーター領域上の 2 つの SNP が候補 SNP として見出された。1 つの SNP は最初に同定された SNP と連鎖不平衡にあり、原因 SNP である可能性が高い。もう 1 つの SNP は rare variant であり、頻度は低くても肝癌と関連の強い SNP である可能性がある。

2) 構築した MICA プロモーター活性測定細胞系を用いて FDA 承認薬剤ライブラリーを用いて、強力に MICA プロモーターを活性化させる薬剤を複数同定した。そのうち、最も強力な活性を示した薬剤につき詳細な検討を加えたところ、本薬剤は細胞毒性をもたらさない濃度にてレポーター細胞の濃度依存的なルシフェラーゼ活性上昇が認められると共に、Huh7、Alexander、HepG2 各肝癌細胞株において MICA mRNA、細胞膜上 MICA タンパク質、sMICA 濃度の上昇が観察された。その効果は MICA 発現誘導効果が既に報告されている酪酸ナトリウムをはるかに凌駕する顕著

なものであった。一方で他の候補薬剤に関しても細胞毒性はもたらさず同様の MICA 発現誘導効果を確認した。

D. 考察

1) MICA の発現調節において、microRNA を介した制御の関与が示唆されたが、3'-UTR 上の SNP は影響していないと考えられた。一方、MICA の転写活性にはプロモーター上の SNP が影響しており、この SNP の違いにより、MICA の発現量が異なると考えられた。

2) FDA 承認薬ライブラリーを用いたプライマリースクリーニングにより同定した複数の MICA 発現増強剤のうち最も強力な活性を有していたものは、他の癌腫に対して現在使用されている抗癌剤であるため、早期に肝癌治療にも応用されると期待される。今後は同定した薬剤の抗肝癌効果を調べるための培養細胞系およびモデル動物を用いた免疫細胞による抗腫瘍効果検証実験を予定している。また、MICA 誘導作用機序の分子レベルでの解析を検討することで、副作用低減のための特異性を担保する薬剤標的の解明が可能になると期待される。また、今回確立したスクリーニング系を用いた大規模ハイスループットスクリーニングを視野に入れており、新規に同定される低分子化合物は肝癌に対する抗腫瘍免疫療法の魅力的な候補となることが期待される。

E. 結論

1) MICA の発現調節機構において、microRNA を介した制御が関与していることが示された。また、MICA の遺伝子座の SNP による血中 MICA 濃度の違いは、プロモーター領域上の SNP による転写活性の相違により規定されていると考えられた。

2) MICA 発現調節薬剤探索レポーターシステムを確立し、本システムを用いてプライマリースクリーニングを行い、強力な MICA 発現誘導効果を有する薬剤を見出した。本薬剤は MICA 発現調節を介した抗肝癌治療開発に直結すると期待される。

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 回日本肝臓研究会 . 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、李ウエンウエン、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