

virus X region for hepatocellular carcinoma: a comprehensive analysis based on global data. 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Istanbul, Turkey. 11-15 March, 2015

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  
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：B型肝炎ウイルス(HBV)は、感染複製効率の良い培養系も少ないことからその感染排除に関しては依然不明な点が多い。ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞にHBVを感染させ、肝細胞における自然免疫関連分子MHC class I polypeptide-related chain A (MICA)およびreceptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2)等の発現状態を比較検討した。ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞では少なくとも90日間のHBV感染状態の観察が可能であった。HBV関連肝細胞癌との関連が報告されたMICAはHBV感染とともに発現が増強し、HBsAgの排除前から発現の減弱がみられ、HBV感染およびHBsAg排除との関連から非常に興味深く思われた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は、感染複製効率の良い培養系も少ないことからその感染排除に関しては依然不明な点が多い。ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞にHBVを感染させ、肝細胞における自然免疫関連分子MICAおよびRIPK2等の発現状態を比較検討した。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスから分離されたPXB細胞  $4 \times 10^5$  cells/wellにHBV genotype C  $1 \times 10^6$  copies/wellまたは  $1 \times 10^5$  copies/wellを感染させ(Day 0)、4-5日に1度Cell culture mediumを交換した。HBV DNAおよびHBsAgはそれぞれTaqMan PCRおよびCLIAにて測定した。Day 7, Day 27, Day 62, Day 90にて細胞蛋白をSDS lysis bufferにて回収し、Western blotにてMICAおよびRIPK2の発現状態をHBV非感染肝細胞と比較検討した。

(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) Condition medium 中HBV DNAはDay 2で3.9, 4.7 log copies/mL, Day 7で3.8, 4.5 log copies/mL, Day 27で5.5, 5.1 log copies/mL, Day 62で4.5, 5.5 log copies/mL, およびDay 90で3.3, 3.3 log copies/mLと検出可能であった。
- 2) Condition medium 中HBsAgはDay 2で<0.05, 0.06 IU/mL, Day 7で<0.05, 0.24 IU/mL, Day 27で2.38, 0.76 IU/mL, Day 62で1.41, 1.57 IU/mLであったが以後急速に検出感度以下となった。
- 3) 肝細胞MICAは、Day 27で感染HBV量依存的に非感染肝細胞と比較し発現が増加していた。Day 62では非感染肝細胞と比較し発現が減少し、Day 90ではHBV感染肝細胞では発現のさらなる減弱がみられた。

4) 肝細胞 RIPK2 は HBV 感染により発現の減弱がみられた。

#### D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスから分離された PXB 細胞中のヒト肝細胞の割合は約 70%以上と報告されている (Joyce ら, PLoS Pathogen 2009). そこで今回我々は MICA および RIPK2 の解析を Western blot を用いて蛋白レベルで行った. HBV 粒子の半減期は HBe 抗原陰性者および陽性者ではそれぞれ中央値 2.5 min および 46 min であり, Dandri ら (Hepatology 2008) は免疫不全 uPA mice では HBV 粒子の半減期は 44 min から 4 時間と延長していることを報告している. 今回研究に用いた HBV は HBe 抗原産生株であるが約 90 日間 Condition medium 中で HBV DNA が検出可能であった.

#### E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞では少なくとも 90 日間の HBV 感染状態の観察が可能であった. HBV 関連肝細胞癌との関連が報告された MICA は HBV 感染とともに発現が増強し, HBsAg の排除前から発現の減弱がみられ, HBV 感染および HBsAg 排除との関連から非常に興味深く思われた.

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O. Reactivation of hepatitis B virus in hematopoietic stem cell transplant recipients in Japan: efficacy of nucleos(t)ide analogues for prevention and treatment. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 21455-21467
- 2) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O. Regulation of microRNA by hepatitis B virus

infection and their possible association with control of innate immunity. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7197-7206

- 3) Kanda T, Jiang X, Yokosuka O. Androgen receptor signaling in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 9229-9236
- 4) Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Nakamura M, Wu S, Mikata R, Yokosuka O. Knockdown of glucose-regulated protein 78 enhances poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in human pancreatic cancer cells exposed to endoplasmic reticulum stress. *Oncol Rep* 2014; 32: 2343-2348
- 5) Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Miyamura T, Wu S, Yokosuka O. Involvement of androgen receptor and glucose-regulated protein 78 kDa in human hepatocarcinogenesis. *Exp Cell Res* 2014; 323: 326-336
- 6) Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, Yokosuka O. Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2015; 22: 94-102
- 7) Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Yasui S, Arai M, Yokosuka O. Reappearance of serum HBV DNA in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance. *Hepatology* 2015 (Epub ahead of print)

##### 2. 学会発表

- 1) 神田達郎、中村昌人、呉霜、中本晋吾、姜霞、宮村達雄、白澤浩、横須賀収. ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞を用いた HBV 感染と MICA 発現状態の解析. 第 18 回日本肝臓学会大会. 2014 年 10 月 23 日

2) Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Nakamura M, Yokosuka O. HBV up-regulates IGFBP1 and MCA expressions in hepatocytes from humanized SCID Alb-uPA mouse model. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B – Recent Progress in Basic and Clinical Research –. Hiroshima, Japan. 20 November, 2014

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

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)・特任講師

分担研究課題: B型肝炎感受性遺伝子 MICA の発現と shedding に関する研究

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臓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、MICA蛋白発現制御を応用した肝臓癌予防法・治療法の開発を目的としている。これまで、特定のmicroRNA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を示してきた。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、感染肝細胞のMICA蛋白の発現量をこの系を用いて調節しうることを示してきた。今回は、さらにMICA蛋白の細胞外分泌を制御する化合物をレポーター細胞を構築してスクリーニングし、実際に複数のMICA蛋白の細胞外分泌を阻害する物質を同定した。今後これらの結果を統合し、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蛋白の発現量調節と同定した化合物によるMICA蛋白のshedding制御が、ウイルス感染細胞の排除やウイルス感染による肝臓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同定したMHC class I polypeptide-related sequence A gene(MICA 遺伝子)(*Nat Genet* 2011, *PLoS ONE* 2012)の発現制御を転写後調節の観点から、microRNAを用いて検討してきた。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。癌細胞やウイルス感染細胞では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

ている可能性が指摘されている。さらに、逆にMICAが高発現しても、その後の翻訳後修飾(shedding)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るB型肝炎ウイルス感染からの肝臓癌予防法・治療法の開発のために、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。さらに、発現制御をした MICA 蛋白の翻訳後修飾（特に shedding による分泌）を制御する化合物を網羅的にスクリーニングするために適した reporter を構築し、化合物スクリーニングを行った。これらの MICA 蛋白の発現量調節および shedding 調節を組み合わせることによって、MICA 蛋白を感染肝細胞の表面への発現を制御することができ、劇的な HBV 増殖抑制、排除、病態改善が可能となると考えられる。

## B. 研究方法

1) MICA 蛋白は C 端寄りで切断され、その N 端側が細胞外に分泌される。そこで、N 端の最初に Halo-tag を発現する融合蛋白を発現するコンストラクトを作製し、それをゲノムに組み込まれた遺伝子由来の B 型肝炎ウイルスが複製する HepG2.2.15 細胞に発現させたうえで化合物を作用させ、細胞上清中に出てくる Halo-tag 融合 MICA 蛋白を Halo-tag への結合蛍光物質で定量しスクリーニングを行った。蛍光強度の測定は 48well-plate で蛍光リーダーを用いて検討した。

2) さらに高感度にするために、Halo-tag を nano-luc (小分子ルシフェラーゼ蛋白) に置き換えたレポーターコンストラクトを作製し、これを HepG2.2.15 細胞で恒常的に発現するレポーター細胞を作製し、同様のスクリーニングを行った。化合物スクリーニングは商業的に入手可能な 1,000 種以上の化合物を用いて、luciferase の発現、発光強度は 96well-plate ベースで GloMax を用いて測定した。

3) スクリーニングの結果、得られた候補化合物について、個別に検討し、そのうえで細胞表面発現 MICA 蛋白の量が変化するかを FACS によって検討した。

(倫理面への配慮)

組み換え DNA、レンチウイルス(P2 レベル)の取扱いについては機関承認(平成 16 年 9 月 10 日の医学部組み換え DNA 実験安

全委員会「遺伝子改変マウスを用いた消化器癌の悪性化因子および治療標的の探索的研究」を得て、拡散防止措置を施したうえで研究を進めている(承認番号 P-13-074)。

## C. 研究結果

1) Halo-tag 融合 MICA 蛋白を発現するコンストラクトを用いたスクリーニングを行った。蛍光強度の dynamic range が狭いためか、ポジティブコントロールとして用いた pan ADAM 阻害剤や MMP 阻害剤でも有意な変化が得られず、この系でのスクリーニングは困難であると考え、次の luciferase ベースの検討に移行した。

2) MICA 蛋白の N 端に nano-luc 蛋白を融合させたレポーター蛋白では、ポジティブコントロールとして用いた panADAM 阻害剤を作用させると、想定通りに、上清の luciferase の値が減少するいっぽうで、細胞溶解液中の luciferase の値が増加する傾向が認められた。そこでこの系を用いてレンチウイルスによって HepG2.2.15 細胞にこのコンストラクトを組み込み恒常的にレポーター蛋白が発現するレポーター細胞を確立した。この細胞と商業的に入手した 1280 種の化合物についてスクリーニングを行った。その結果、negative control における luciferase の(上清中/細胞溶解液中)の値が通常では 0.02 程度のものが、Molsidomine, Metergoline, などの化合物によって、0.009 程度にまで下がり、かつ、細胞溶解液中の絶対値が増えていた。すなわちこれらの化合物を作用させると、細胞内 MICA 蛋白量が増える一方で、細胞外 MICA 蛋白量は減少し、その結果、shedding が抑制されていることが示唆された。

3) そこでこれらの候補化合物を用いて、実際に細胞表面の MICA 蛋白量変化を FACS にて確認した。その結果、ポジティブコントロールとして検討した ADAM 阻害剤・MMP 阻害剤と同程度の強さで、細胞表面の MICA 蛋白の発現量を増やすことが確認できた。

#### 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。

これまで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を示している。実際に細胞表面の 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唆されており、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ということが示唆されたている。

今年度は、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 *in vitro* で行った結果を論文としてまとめる ( Ohno et al. *Oncotarget* 2014;5(14):5581-90.) とともに、特に MICA 蛋白の翻訳後修飾 (shedding) 制御についての検討を行った。Drug screening を行うためには簡便なモニター系が必要であるが、本研究において MICA の N 端に小分子 luciferase である nano-luc を連結すること

によって、容易に細胞内・外の MICA 蛋白量を luciferase の発光によるレポーターに置き換えることが可能となった。今回スクリーニングで同定した MICA 蛋白の shedding を抑える可能性のある薬剤は、先の検討で同定した MICA 蛋白の発現そのものをふやす microRNA と組み合わせることで効果的に細胞表面の MICA 蛋白を増やすことが可能であり、さらに昨年報告した Bio-nano-capsules を用いたデリバリー法と組み合わせることによって、効果的に HBV 感染肝細胞にこれらの material を送達させ、免疫細胞の活性化をもたらすことで 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が可能となると思われる。

#### E. 結論

GWAS で同定した肝癌感受性遺伝子 MICA の肝細胞における発現量とその後の shedding をも制御することができれば、肝発癌予防法の開発につながるだけでなく、感染肝細胞の排除にも有用となると考える。今年度の成果としての MICA 蛋白の shedding 制御法の開発はこれまでの知見と合わせることによって効果的な免疫学的治療法につながると思われる。さらに広範なスクリーニングとそこを契機とした分子機構の解明をつづけ、それに基づく病態改善、特に発癌抑制効果のための方策とウイルス排除法の開発を継続していきたいと考える。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 2014; 5: 5581-5590
- 2) 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** 2014; 49 :173-184
- 3) Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. **World J Hepatol** 2015; 7: 1-6
- 4) Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, Koike K, Itoh F. DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences. **Genome Res** 2015; 25: 328-337
2. 学会発表
- 1) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, and Koike K. MicroRNA delivery by bionanoparticles: regulation of the liver cancer susceptibility gene MICA expression in hepatocytes. American Association for cancer Research Annual meeting 2014. California, USA. 5-9 April, 2014
- 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：東京大学 医科学研究所 准教授・松田 浩一  
研究協力者：東京大学 医科学研究所 助教・谷川 千津

分担研究課題：B型肝炎に関連する遺伝因子の解析

研究要旨：B型肝炎発症に関わる遺伝因子を同定する目的で、HBV陽性肝癌患者237名、非癌コントロール15060名を用いて、全ゲノム関連解析を行なった。その結果、HLA-DP領域に有意な関連を認めた ( $P=3.5 \times 10^{-12}$ )。さらにHLA領域以外において10<sup>-6</sup>位の強い関連を示す6領域が明らかとなった。またこれまでB型肝炎以外の悪性腫瘍との関連が報告されている288SNPについて、B型肝炎との関連を検討した。その結果、CDKN2AやPHLDB1が $P<0.01$ と有意な関連を示すことが明らかとなった。今後これらの領域を中心に、独立したサンプルでの検討を進める予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス感染や発癌に関わる宿主因子の解析を通して、疾患の発症リスク予測や発癌メカニズムの解明を行う。

B. 研究方法

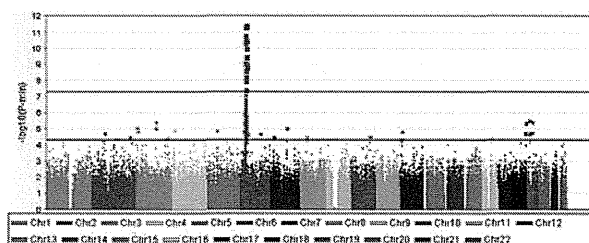
HBV陽性肝癌患者237名、非癌コントロール15060名を用いてイルミナ Human Hap610 BeadsChipにより、約60万箇所のSNPのタイピングを行なった。解析にあたり、年齢性別を交絡因子とした。また、既報の文献のreviewを行い、癌の発症と関連が報告されている483SNPを抽出した。これらのSNPについて、GWASの結果を用いて、発がんリスクとの関連を確認した。

(倫理面への配慮)

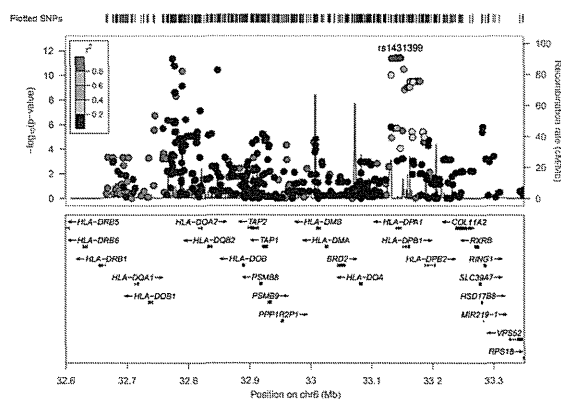
本解析に用いた症例は全て、インフォームドコンセントを取得済みで、また各医療機関、研究機関の倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

全ゲノム関連解析の結果、480702 SNPについてのデータ取得された。



もっと強い関連を示したのは、HLA-DP領域であった ( $P=3.5 \times 10^{-12}$ )。この領域は、慢性B型肝炎との関連が既に報告済みであることから、このSNPは癌化ではなく、HBV感染の慢性化に関与すると考えられた。



また HLA 領域以外では、ITPR1, LOC389141, KIAA0319, ZNF804B,

FCHO1, POP4 の 6 領域が 10<sup>-6</sup> 台の強い関連を示した。

表. HLA 以外の領域の解析結果

SNP	Chr.pos.	OR	P	gene	location	
rs4147799	1	94357047	1.62	7.06E-05	ABCA4	0
rs3789450	1	94358890	1.63	6.83E-05	ABCA4	0
rs6546024	2	63775279	1.60	6.18E-05	LOC647112	9926
rs7589857	2	70271843	0.62	1.70E-05	C2orf42	-188
rs2706768	2	70310090	0.65	8.95E-05	TIA1	0
rs1382457	2	70396890	0.64	6.35E-05	FAM136A	-14185
rs9808069	2	123392154	1.55	9.60E-05	LOC728241	713248
rs6747870	2	135186239	2.30	3.75E-05	TMEM163	0
rs10932384	2	212118093	1.56	2.98E-05	ERBB4	0
rs16863738	2	223045043	1.69	7.36E-05	SGPP2	0
rs17041369	3	4769980	2.13	8.08E-06	ITPR1	0
rs2600174	3	9264086	1.56	1.45E-05	SRGAP3	0
rs4974120	3	56196033	1.69	9.87E-05	ERC2	0
rs4974176	3	56196647	1.69	9.87E-05	ERC2	0
rs1462307	3	111984538	1.92	3.51E-06	LOC389141	-99766
rs10934067	3	111990953	1.88	9.02E-06	LOC151760	102614
rs9838303	3	163137089	1.97	4.04E-05	LOC100132484	-382355
rs6443429	3	178352192	0.62	6.68E-05	TBL1XR1	0
rs7611092	3	178395228	0.61	3.57E-05	TBL1XR1	0
rs1157531	4	13491883	1.68	1.17E-05	LOC391636	-96005
rs1399249	4	71029223	1.53	4.62E-05	CSN1S2B	4687
rs12649554	4	102115699	0.65	5.34E-05	PPP3CA	47911
rs4524412	4	122160349	1.56	9.05E-05	C4orf31	15883
rs6836062	4	181345504	1.52	6.85E-05	LOC728081	876732
rs7665398	4	181350686	1.64	9.40E-05	LOC728081	871550
rs16882451	5	53542995	1.60	1.30E-05	ARL15	0
rs3985087	5	110100555	2.58	5.89E-05	SLC25A46	-2098
rs1205918	6	22473741	0.58	1.45E-05	PRL	-68032
rs7765678	6	24438523	2.75	1.18E-06	DCDC2	0
rs2760181	6	24656540	2.54	4.24E-06	KIAA0319	0
rs6928412	6	43624206	2.33	8.19E-05	XPO5	0
rs7764616	6	45653953	1.61	2.19E-05	RUNX2	27156
rs7773293	6	114070787	1.54	2.10E-05	LOC728590	60880
rs2301677	7	17292583	0.63	3.30E-05	LOC100131512	0
rs1557917	7	88388864	1.67	9.39E-06	ZNF804B	0
rs2158499	7	88396705	1.58	6.02E-05	ZNF804B	0
rs10091962	8	40482035	2.30	3.22E-05	ZMAT4	25235
rs7018220	8	40502000	2.30	4.21E-05	ZMAT4	5270
rs1249744	9	116083173	0.64	8.57E-05	COL27A1	0
rs4917418	10	106285577	1.55	7.00E-05	CCDC147	80739
rs1028918	10	106291065	1.55	6.80E-05	CCDC147	86227
rs12252609	10	106291589	1.55	6.90E-05	CCDC147	86751
rs11192121	10	106313791	1.58	2.64E-05	SORCS3	-77058
rs6487679	12	9262599	1.74	4.51E-05	PZP	-10366
rs12229800	12	13697499	2.10	6.80E-05	GRIN2B	0
rs7301344	12	15186200	1.60	1.47E-05	RERG	0
rs12889177	14	22561169	2.24	9.90E-05	PSMB5	3731
rs3112614	16	51190534	1.51	6.91E-05	LOC643714	0
rs12597685	16	51195281	0.65	4.35E-05	LOC643714	0
rs3104811	16	51221448	1.53	3.62E-05	LOC643714	-23050
rs4940181	18	48264629	2.30	7.48E-05	DCC	0
rs8095066	18	72016459	1.67	1.74E-05	ZNF516	184148
rs2927261	18	74731402	1.83	3.96E-06	LOC645321	107937
rs265555	19	17756874	3.28	2.83E-06	FCHO1	0
rs265552	19	17761158	2.77	1.92E-05	FCHO1	792
rs8112048	19	19678749	1.49	7.31E-05	ZNF14	3532
rs7246866	19	19683049	1.50	6.12E-05	ZNF14	0
rs8110890	19	19709485	1.50	5.98E-05	ZNF14	-4564
rs7256487	19	19716654	1.54	1.86E-05	LOC100130292	-5772
rs12978630	19	34784968	1.91	1.82E-05	POP4	-4073
rs7247377	19	34788403	1.91	1.66E-05	POP4	-638
rs12983160	19	34804197	1.98	3.64E-06	POP4	5650
rs4239875	22	33668995	2.14	7.31E-05	ISX	-123135

さらに様々な悪性腫瘍の罹患性と関連が知られている 483SNP について、HBV 肝癌との関連を検討した。この内、288SNP について関連解析結果が得られた。相関解析の結果、CDKN2A や PHLDB1 が 0.01 以下の強い関連を示した。しかしながら多重検定の補正後も有意な関連を示す SNP は同定されなかった。

#### D. 考察

今回の解析では、既報の領域以外には強

い関連を示す領域は同定されなかった。しかしながら、CDKN2A は様々な疾患との関連が知られていることから、HBV 肝癌のリスクマーカーとして有望と考えられる。今後は独立した検体での再現性の確認に加え、サンプル数を増やした解析や、慢性 B 型肝炎をコントロールとした解析などが必要になると考えられる。

#### E. 結論

HBV 陽性肝癌の疾患関連遺伝子を網羅的に解析した結果、HLA 領域が強い関連を示した。また他にも複数の候補領域が同定された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kashiya T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji H, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T. Antitumor Activity and Induction of TP53-Dependent Apoptosis toward Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma by the Dual PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423. *PLoS One* 2014; 9: e87220
- 2) Lin J, Deng Z, Tanikawa C, Shuin T, Miki T, Matsuda K, Nakamura Y. Downregulation of the tumor suppressor HSPB7, involved in the p53 pathway, in renal cell carcinoma by hypermethylation. *Int J Oncol* 2014; 44: 1490-1498
- 3) Yamamoto Y, Miyamoto M, Tatsuda D, Kubo M, Nakagama H, Nakamura Y, Satoh H, Matsuda K, Watanabe T, Ohta T. A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability. *Cancer Res* 2014; 74: 3707-3715
- 4) Zhang B, Jia WH, Matsuda K, Kweon SS, Matsuo K, Xiang YB, Shin A, Jee SH, Kim DH, Cai Q, Long J, Shi J,

- Wen W, Yang G, Zhang Y, Li C, Li B, Guo Y, Ren Z, Ji BT, Pan ZZ, Takahashi A, Shin MH, Matsuda F, Gao YT, Oh JH, Kim S, Ahn YO, Chan AT, Chang-Claude J, Slattery ML, Gruber SB, Schumacher FR, Stenzel SL, Casey G, Kim HR, Jeong JY, Park JW, Li HL, Hosono S, Cho SH, Kubo M, Shu XO, Zeng YX, Zheng W. Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk. **Nat Genet** 2014; 46: 533-542
- 5) Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, Nakamura Y. Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis. **Int J Oncol** 2014; 45: 147-156.
- 6) Cai Q, Zhang B, Sung H, Low SK, Kweon SS, Lu W, Shi J, Long J, Wen W, Choi JY, Noh DY, Shen CY, Matsuo K, Teo SH, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Hartman M, Takahashi A, Ashikawa K, Matsuda K, Shin MH, Park MH, Zheng Y, Xiang YB, Ji BT, Park SK, Wu PE, Hsiung CN, Ito H, Kasuga Y, Kang P, Mariapun S, Ahn SH, Kang HS, Chan KY, Man EP, Iwata H, Tsugane S, Miao H, Liao J, Nakamura Y, Kubo M, Delahanty RJ, Zhang Y, Li B, Li C, Gao YT, Shu XO, Kang D, Zheng W. Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1. **Nat Genet** 2014; 46: 886-890
- 7) Deng Z, Matsuda K, Tanikawa C, Lin J, Furukawa Y, Hamamoto R, Nakamura Y. Late Cornified Envelope Group I, a Novel Target of p53, Regulates PRMT5 Activity. **Neoplasia** 2014; 16: 656-664
- 8) Matsuda K, Takahashi A, Middlebrooks CD, Obara W, Nasu Y, Inoue K, Tamura K, Yamasaki I, Naya Y, Tanikawa C, Cui R, Figueroa JD, Silverman DT, Rothman N, Namiki M, Tomita Y, Nishiyama H, Kohri K, Deguchi T, Nakagawa M, Yokoyama M, Miki T, Kumon H, Fujioka T, Prokunina-Olsson L, Kubo M, Nakamura Y, Shuin T. Genome-wide association study identified SNP on 15q24 associated with bladder cancer risk in Japanese population. **Hum Mol Genet** 2015; 24: 1177-1184
- 9) Lo PH, Tanikawa C, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of novel epigenetically inactivated gene PAMR1 in breast carcinoma. **Oncol Rep** 2015; 33: 267-273
2. 学会発表
- 1) Matsuda K, Tanikawa C, Nakamura Y. PSCA as a potential therapeutic and prognostic biomarker for common cancer. American Association for cancer Research Annual meeting 2014. California, USA. 5-9 April, 2014
- 2) 松田浩一. バイオバンクジャパンについて. 第103回日本病理学会. 広島. 2014年4月24-25日
- 3) Matsuda K. Impact of genetic variations on chronic viral infection and prognosis. 4th International Kyoto Liver Cancer Symposium. Kyoto, Japan. 7-8 June, 2014
- 4) 松田浩一. 膀胱癌 GWAS の進捗について. 泌尿器疾患ゲノム解析研究会. 横浜. 2014年8月29日
- 5) Matsuda K. BioBank Japan Project for personalize medicine. 第73回日本癌学会学術総会. 横浜. 2014年9月25-27日
- 6) 松田浩一. 遺伝子多型解析による疾患感受性遺伝子探索. がんゲノム・エピゲノム、数理統計解析についての勉強会. 大分. 2014年12月20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

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：地主将久

研究協力者：山階維騎、森田智子、Byron Baron

分担研究課題：B型肝炎発癌の治療標的

研究要旨：腫瘍内マクロファージは発癌活性制御に重要な役割を果たしているが、B型肝炎発癌におよぼすインパクトは明らかではない。研究では近年B型肝炎発癌制御に重要な役割を果たすことが注目されているNKG2D発現やその機能意義について検討した。腫瘍マクロファージにおけるNKG2D発現は正常と比較して高値であり、腫瘍細胞貪食を介して抗腫瘍免疫活性の誘導に寄与していた。さらにI型IFNと相乗的な抗がん効果を発揮することが判明した。以上の成果から、HBV自然発癌モデルやB型肝炎ヒト検体を対象に、NKG2Dなどマクロファージ発現因子を標的とした予防マーカーや治療法の開発につながる成果の創出に向けた前臨床試験を準備中である。

A. 研究目的

腫瘍マクロファージによる発癌活性が知られているが、HBV発癌への寄与は不明である。

よって腫瘍マクロファージにおける自然免疫分子(NKG2D, TIM-3, TIM-4等)の機能を解明する。さらにNKG2DとHBVウイルス因子クロストークが発癌に及ぼす影響を自然発がんモデルで解明する。

B. 研究方法

マウス・ヒト腫瘍マクロファージを対象に上記の免疫因子発現やその腫瘍制御能を検討する。

さらにHBV発癌モデル(HBx-TG)を対象にこれら免疫因子の自然発癌に対する影響を検討する。

(倫理面への配慮)

ヒト検体の取り扱いや個人情報保護について北海道大学病院および研究所倫理審査委員会での審議・承認を受けており、その規則を遵守している。

C. 研究結果

- ・ NKG2D は正常マクロファージと比して腫瘍内マクロファージに高発現していた。
- ・ NKG2D 陽性マクロファージは、IFN- $\alpha/\beta$  を介して抗がん剤による抗腫瘍効果を高める効果を発揮した。
- ・ HBx-TG マウスと NKG2D-KO マウスを対象に HBV 発癌に対するマクロファージ、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。
- ・ ヒト化マウスの系を用いて、HDAC 阻害剤 SAHA による抗腫瘍効果が NKG2D 系免疫応答に依存することを、ヒト化マウスを対象にした前臨床試験の系で証明した。

D. 考察

肝発がんモデルにおいて、腫瘍マクロファージにおける NKG2D, TIM-3, TIM-4 が発

癌制御に重要な役割を果たすことが明らかになった。今後は HBV 感染、発癌プロセスにどのように影響を及ぼすか、さらなる検証が重要である。さらに、NKG2D 欠損 HBX-TG における肝、腫瘍マクロファージの機能解析と発がん活性、HBV 発癌予防、治療薬としての NKG2D、TIM-3 阻害剤の可能性の in vivo モデルにおける検証が重要となる。

#### E. 結論

腫瘍マクロファージによる HBV 発癌制御の一旦を明らかにできた。腫瘍マクロファージ発現因子を標的とした新たな診断・治療法開発につながる成果である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. **Cancer Sci** 2014; 105: 1-8
- 2) Jinushi M. Immune regulation of therapy-resistant niches: Emerging targets for improving anticancer drug responses. **Cancer Metastasis Rev** 2014; 33: 737-745
- 3) Yamashina T, Baghdadi M, Yoneda A, Kinoshita I, Suzu S, Dosaka-Akita H, Jinushi M. Cancer stem-like cells derived from chemoresistant tumors have a unique capacity to prime tumorigenic myeloid cells. **Cancer**

**Res** 2014; 74: 2698-2709

- 5) Jinushi T, Shibayama Y, Kinoshita I, Oizumi S, Jinushi M, Aota T, Takahashi T, Horita S, Dosaka-Akita H, Iseki K. Low expression levels of microRNA-124-5p correlated with poor prognosis in colorectal cancer via targeting of SMC4. **Cancer Med** 2014; 3: 1544-1552
- 6) Jinushi M, Komohara Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1855: 123-130

##### 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

発明者：地主将久、八木田秀雄、秋葉久弥  
特許出願人：北海道大学

出願名称：Tumor-specific immune stimulator (腫瘍特異的免疫増強剤)  
出願番号 P2014-089806

##### 2. 実用新案登録 なし

##### 3. その他 なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Sato M, <u>Kato N</u> , Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K</u> .	Impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection.	Hepato Res	44(10)	E137-144	2014
Sato M, <u>Kato N</u> , Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K</u> .	IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection.	J Gastroenterol	49(4)	748-754	2014
Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, <u>Kato N</u> , Yoshida H, Taguri M, <u>Koike K</u> .	Impact of IL28B genetic variation on HCV-induced liver fibrosis, inflammation, and steatosis: a meta-analysis.	PLoS One	9(3)	E91822	2014
Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, <u>Kato N</u> , Kuroda S, <u>Koike K</u> .	Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA.	Oncotarget	5(14)	5581-5590	2014
Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, <u>Kato N</u> , Yoshikawa T, Takata A, <u>Koike K</u> .	The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels.	Virology	462-463	42-48	2014
Goto K, <u>Kato N</u> .	MICA SNPs and the NKG2D system in virus-induced HCC.	J Gastroenterol	50(3)	261-272	2015



Li W, Goto K, Matsubara Y, Ito S, Murayama R, Li Q, <u>Kato N</u>	The characteristic changes in hepatitis B virus X region for hepatocellular carcinoma: A comprehensive analysis based on global data.	PLoS One	10(5)	E0125555	2015
Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, <u>Yokosuka O.</u>	Reactivation of hepatitis B virus in hematopoietic stem cell transplant recipients in Japan: efficacy of nucleos(t)ide analogues for prevention and treatment.	Int J Mol Sci	15(11)	21455-21467	2014
Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, <u>Yokosuka O.</u>	Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity.	World J Gastroenterol	20(23)	7197-7206	2014
Kanda T, Jiang X, <u>Yokosuka O.</u>	Androgen receptor signaling in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers.	World J Gastroenterol	20(28)	9229-9236	2014
Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Nakamura M, Wu S, Mikata R, <u>Yokosuka O.</u>	Knockdown of glucose-regulated protein 78 enhances poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in human pancreatic cancer cells exposed to endoplasmic reticulum stress.	Oncol Rep	32(6)	2343-2348	2014
Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Miyamura T, Wu S, <u>Yokosuka O.</u>	Involvement of androgen receptor and glucose-regulated protein 78 kDa in human hepatocarcinogenesis.	Exp Cell Res	323(2)	326-336	2014

Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, <u>Yokosuka O.</u>	Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B.	J Viral Hepat	22(2)	94-102	2015
Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Yasui S, Arai M, <u>Yokosuka O.</u>	Reappearance of serum HBV DNA in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance.	Hepatology			[Epub ahead of print]
Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, <u>Koike K.</u>	The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis : current knowledge and future prospects.	J Gastroenterol	49(2)	173-184	2014
Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, <u>Koike K.</u>	Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma.	World J Hepatol	7(1)	1-6	2015
Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, <u>Koike K,</u> Itoh F.	DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences.	Genome Res	25(3)	328-337	2015

Kashiyama T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji H, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Nakagawa S, <u>Matsuda K</u> , McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T.	Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR inhibitor DS-7423.	PLoS One	9(2)	E87220	2014
Lin J, Deng Z, Tanikawa C, Shuin T, Miki T, <u>Matsuda K</u> , Nakamura Y.	Downregulation of the tumor suppressor HSPB7, involved in the p53 pathway, in renal cell carcinoma by hypermethylation.	Int J Oncol	44(5)	1490-1498	2014
Yamamoto Y, Miyamoto M, Tatsuda D, Kubo M, Nakagama H, Nakamura Y, Satoh H, <u>Matsuda K</u> , Watanabe T, Ohta T.	A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability.	Cancer Res	74(14)	3707-3715	2014

Zhang B, Jia WH, <u>Matsuda K</u> , Kweon SS, Matsuo K, Xiang YB, Shin A, Jee SH, Kim DH, Cai Q, Long J, Shi J, Wen W, Yang G, Zhang Y, Li C, Li B, Guo Y, Ren Z, Ji BT, Pan ZZ, Takahashi A, Shin MH, Matsuda F, Gao YT, Oh JH, Kim S, Ahn YO, Chan AT, Chang-Claude J, Slattery ML, Gruber SB, Schumacher FR, Stenzel SL, Casey G, Kim HR, Jeong JY, Park JW, Li HL, Hosono S, Cho SH, Kubo M, Shu XO, Zeng YX, Zheng W.	Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk.	Nat Genet	46(6)	533-542	2014
Fujitomo T, Daigo Y, <u>Matsuda K</u> , Ueda K, Nakamura Y.	Identification of a nuclear protein, LRRRC42, involved in lung carcinogenesis.	Int J Oncol	45(1)	147-156	2014