

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 (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の転写活性を規定するプロモーター上の2つのB型肝炎関連責任SNPを同定し、臨床検体を用いた解析により血中MICA濃度と関連すること、すなわちMICA発現量を規定していること、2) MICA発現を上昇させる薬剤SAHAを同定し、SAHAがMICA発現誘導を介した抗腫瘍効果を示すこと、を証明した。本研究を推し進めることで、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) MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) はプロモーター上の SNP (single nucleotide polymorphism) により、肝発癌のリスクや血中 MICA 濃度が異なっている。そこで、まず MICA の転写活性を変化させるプロモーター領域の SNP の同定を試み、引き続き臨床検体を用いた検討を行った。
- 2) 薬剤による MICA 発現制御を目的として、MICA プロモーター活性測定細胞系を用いての小規模一次スクリーンにより得られた MICA 発現誘導剤がもたらす NK 細胞抗腫瘍効果を検証した。

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。前年度までの検討で、それらのプロモーター配列を用いて、MICA のプロモーター・レポータープラスミドを作成し、ルシフェラーゼアッセイにより MICA の転

写活性を変化させる 2 つの候補 SNP を見出していた。そこで、まず候補 SNP の塩基を置換した変異型のレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行い、実際に転写活性を変化させるか否かを検討した。

さらに、臨床検体を用いた解析として、肝臓患者における候補 SNP のジェノタイプピングと血中 MICA 濃度の測定を行い、両者の関連性を検討した。

- 2) 培養細胞系は、肝臓細胞株である PLC/PRF/5 細胞、NK 細胞株、ヒト肝臓キメラマウス由来新鮮ヒト肝細胞である PXB 細胞を用いた。薬剤は、米国食品医薬品局 (FDA) 承認薬剤のプライマリースクリーニングにより最も強力な MICA 誘導効果を示した HDAC 阻害薬である suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA、Vorinostat) を用いた。MICA mRNA 発現は qRT-PCR により測定した。NK 細胞傷害性試験では、前処理を施した PLC/PRF/5 細胞と NK 細胞を 4 時間共培養した後、傷害された標的細胞からの培養上清中乳酸脱水

素酵素 (LDH) 放出レベルを酵素活性比色測定系により評価した。

(倫理面への配慮)

本研究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あり、かつ各医療機関、研究機関の倫理委員会の承認を済ませている。また、厚生労働省による「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守している。

培養細胞系において行われている研究に関しては、現時点で倫理面への配慮を必要とする段階に至っていない。

C. 研究結果

1) 前年度までに見出された MICA の転写活性を変化させる 2 つの候補 SNP に対し、それぞれ塩基置換を行った変異型のプロモーター・レポータープラスミドを作成してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、2 つの SNP はともにルシフェラーゼ活性を 3 ~ 4 倍変化させることが明らかとなった。

臨床検体を用いた解析では、2 つの SNP はともに血中 MICA 濃度との関連性を認め、MICA の転写活性が低いアレルを有する症例では、血中 MICA 濃度が低いことが明らかとなった。

2) これまでに構築した MICA プロモーター活性測定細胞系において FDA 承認薬ライブラリーより同定した候補のうち、最も強力な活性を示した薬剤 SAHA により細胞毒性を生じない濃度にて MICA 発現を誘導した PLC/PRF/5 細胞と、NK 細胞株を共培養した結果、NK 細胞傷害性は未処理の PLC/PRF/5 細胞に対する場合よりも有意に上昇した。加えて本 NK 細胞傷害性亢進は MICA 抗体により中和された。一方で SAHA は正常ヒト肝細胞である PXB 細胞において MICA 発現誘導をもたらさなかった。

D. 考察

1) B 型肝癌感受性を決定する MICA の転写活性を規定するプロモーター上の 2 つの責任 SNP が同定された。また臨床検体を用

いた解析により、この 2 つの SNP はともに、血中 MICA 濃度との関連性を認めた。このことより、MICA の発現制御において、MICA のプロモーター上の 2 つの SNP が転写レベルで重要な役割を果たしていると考えられた。

同定された 2 つの SNP が存在する部位には、何らかの転写因子が結合している可能性があり、その転写因子は B 型肝癌抑止法の開発において魅力的なターゲットの 1 つとなり得るため、今後、その同定を進めていく。また、同定された 2 つの SNP による B 型肝癌リスク群の予測などにつき、臨床検体を用いた解析を進めていく。

2) FDA 承認薬ライブラリーを用いた一次スクリーニングにより同定した候補薬剤のうち、最も強力な活性を示し、かつ、本解析にて肝癌細胞株特異的 MICA 発現誘導を介した NK 細胞抗腫瘍効果亢進が観察された薬剤 SAHA は目下他癌腫にて使用されている抗癌剤であるため、肝癌治療にも応用される可能性が考えられる。今後は SAHA のモデルマウスを用いた免疫細胞による抗腫瘍効果検証、MICA 誘導分子作用機序解明、類似活性化化合物の集中的探索に加え、新規 MICA 誘導剤の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、副作用を低減する標的特異性解明が進むと同時に、新規同定低分子化合物は肝癌に対する抗腫瘍免疫療法開発における魅力的な候補薬剤となることが期待される。

E. 結論

1) MICA の転写活性を規定するプロモーター上の 2 つの SNP が同定され、臨床検体を用いた解析により、血中 MICA 濃度と関連性を認めることが明らかとなった。

2) 構築済み MICA 発現増強薬剤探索レポーターシステムを用いた一次スクリーニングによる候補薬剤 SAHA に関して、MICA 発現誘導を介した抗腫瘍効果を、肝癌細胞株を標的とした NK 細胞との共培養系にて実証した。SAHA は natural-killer group 2, member D (NKG2D) リガンドである MICA の発現調節を介した肝癌治療開発に

つながると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. **Hepatology** 2014; 44: E137-144
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. **Virology** 2014; 462-463: 42-48
- 6) Goto K, Kato N. MICA SNPs and the NKG2D system in virus-induced HCC. **J Gastroenterol** 2015; 50:

261-272

- 7) Li W, Goto K, Matsubara Y, Ito S, Murayama R, Li Q, Kato N. The characteristic changes in hepatitis B virus X region for hepatocellular carcinoma: A comprehensive analysis based on global data. **PLoS One** 2015; 10: e0125555

2. 学会発表

- 1) Sato M, Kondo M, Tateishi R, Kato N, Yoshida H, Koike K. Impact of IL28B genetic variation on HCV-induced liver fibrosis, inflammation, and steatosis: a meta-analysis. 49th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. London, United Kingdom. 9-13 April, 2014
- 2) Nakagawa R, Takahashi H, Muroyama R, Tkano K, Li W, Goto K, Nakano M, Saeki C, Matsubara Y, Kato N, Zeniya M, Tajiri H. Tu1830 specifically expressed MicroRNAs in CD4+ T cells participate with the pathogenesis of primary biliary cirrhosis to regulate T cell signaling pathway. Digestive Disease Week 2014. Chicago, USA. 4-6 May 2014
- 3) Nakagawa R, Takahashi H, Muroyama R, Li W, Goto K, Seki C, Matsubara Y, Kato N, Zeniya M. Specifically expressed MiRNA in CD4+ T cells participates in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. European Association for the Study of the Liver. Milan, Italy. 23-24 May 2014
- 4) 後藤 覚、室山良介、加藤直也 . GWASにより同定された肝癌感受性遺伝子 MICA の発現制御を介した肝発癌抑止戦略 . 第 50 回日本肝臓学会総会 . 東京 . 2014 年 5 月 29-30 日
- 5) 室山良介、後藤 覚、松田浩一、田中靖人、茶山一彰、溝上雅史、小俣政男、小池和彦、加藤直也 . 腫瘍自然免疫を司る MICA の B 型および C 型

- 肝癌における役割 .第 50 回日本肝臓学会総会 .東京 .2014 年 5 月 29-30 日
- 6) 中川 良、高橋宏樹、室山良介、高野啓子、後藤 覚、中野真範、佐伯千里、松原康朗、加藤直也、銭谷幹男 . 原発性胆汁性肝硬変の CD4 + T 細胞における発現遺伝子の網羅的解析 . 第 50 回日本肝臓学会総会 .東京 .2014 年 5 月 29-30 日
 - 7) 李 雯雯、室山良介、後藤 覚、中川 良、松原康朗、古渡礼恵、李 強、加藤直也 .Characteristic mutations in genotype C Hepatitis B virus X region of acute on chronic liver failure patients. 第 50 回日本肝臓学会総会 .東京 .2014 年 5 月 29-30 日
 - 8) 佐藤雅哉、近藤真由子、建石良介、加藤直也、吉田晴彦、小池和彦 . IL28B SNP が C 型慢性肝炎患者における肝線維化・炎症・脂肪化に与える影響-メタアナリシスによる検討 .第 50 回日本肝臓学会総会 .東京 .2014 年 5 月 29-30 日
 - 9) 佐藤雅哉、加藤直也、小池和彦 . C 型肝癌に対するラジオ波焼灼術後の再発、予後に対する MICA, DEPDC5, IL28B, PNPLA3 遺伝子多型の意義の検討 .第 50 回日本肝臓学会総会 .東京 .2014 年 5 月 29-30 日
 - 10) Muroyama R, Goto K, Li W, Matsubara Y, Nakagawa R, Ito S, Kato N. HBV induces an HBV-induced HCC associated gene MICA through transcriptional activation in SNPS dependent manner. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA. 3-6 September, 2014
 - 11) Goto K, Muroyama R, Li W, Nakagawa R, Matsubara Y, Kato N. Potentiated anti-tumor activity of NK cells by an approved drug identified to induce the expression of a GWAS-discovered HCV-HCC susceptibility gene MICA. 21st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada. 7-11 September, 2014
 - 12) 加藤直也、後藤 覚、室山良介、中川 良、李 雯雯、伊藤彩弥香、松原康朗 . GWAS により見出された肝癌関連遺伝子 MICA の発現増強による新たな肝発癌抑止法の開発 . 広島 .2014 年 7 月 5 日
 - 13) 加藤直也、後藤 覚、室山良介 . B 型肝癌感受性遺伝子 MICA の発現制御による肝発癌抑止戦略 .神戸 .2014 年 10 月 23-24 日
 - 14) 中川 良、加藤直也、銭谷幹男 . 自己免疫性肝炎における CD4+T 細胞の mRNA と長鎖 non-codingRNA の発現の解析 .第 18 回日本肝臓学会大会 .神戸 .2014 年 10 月 23-24 日
 - 15) Nakagawa R, Muroyama R, Ito S, Takano K, Li W, Goto K, Nakano M, Saeki C, Matsubara Y, Kato N, Zeniya M. Prednisolone Changes mRNA and LincRNA Expression Profiles to Suppress Autoimmunity in CD4+ T Cells of Autoimmune Hepatitis Type1. The Liver Meeting 2014. Boston, USA. 7-11 November, 2014
 - 16) Goto K, Muroyama R, Li W, Nakagawa R, Matsubara Y, Kato N. NK cell anti-tumor activity was boosted by SAHA identified to induce the expression of a GWAS-discovered HCV-HCC susceptibility gene MICA. The Liver Meeting 2014. Boston, USA. 7-11 November, 2014
 - 17) 後藤 覚、加藤直也 . GWAS 肝癌感受性遺伝子 MICA を介した腫瘍免疫監視 . 第 3 回肝炎ウイルス研修会 .東京 .2015 年 2 月 26-27 日
 - 18) Li W, Goto K, Matsubara Y, Ito S, Muroyama R, Li Q, Kato N. The characteristic changes in hepatitis B 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