

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服実用化研究事業(B型肝炎創薬実用化等研究事業))

分担研究報告書(平成26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：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 が肝発癌に關与 (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關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