

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

# 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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 直也

平成26(2014)年 3月

# 目 次

## I . 総括研究報告

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 の総括 .....	1
加藤 直也	

## II . 分担研究報告

1 . 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 .....	15
加藤 直也	
2 . 肝発癌における自然免疫関与の解析 .....	19
横須賀 収	
3 . 肝癌関連遺伝子MICAのmicroRNAによる発現制御 .....	23
小池 和彦	
4 . B 型肝炎の発癌感受性遺伝子の探索 .....	33
松田 浩一	
5 . B型肝炎におけるNKG2D依存免疫システムのインパクトについての検討 .....	37
地主 将久	

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	41
----------------------------	----

IV . 研究成果の刊行物・別刷 .....	51
------------------------	----

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 )

総括研究報告書 ( 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

研究者代表者：東京大学医科学研究所 先端ゲノム医学分野  
准教授 加藤 直也

研究要旨：肝炎ウイルスによる肝発癌抑止は肝臓病学の最重要課題である。我々はGWASにより、MICA SNPがC型肝炎と関連していることを明らかにした。MICA SNPはB型肝炎とも関連し、血中MICA濃度がそ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。B型肝炎ウイルス ( HBV ) 感染肝細胞とNK細胞を中心とした自然免疫系との攻防がB型肝炎における肝発癌に深く関わっていることを示す。そこで、本研究ではHBVによる発癌における自然免疫系の役割を明らかにし、自然免疫系の制御、特にMICAの発現調節による肝発癌抑止法を開発することを目的としている。

今年度は、1) MICAの発現調節機構の検討を行い、MICA発現にはmicroRNAが重要であること、MICA SNPによる血中MICA濃度の違いはプロモーター上のSNPによる転写活性の相違によること、その一つの機能的SNPがSP-1と結合することを明らかにした。2) MICAの発現調節を介したB型肝炎抑止法開発のために、MICA発現調節薬剤探索レポーターシステムを確立し、強力にMICAの発現を誘導する薬剤を見出した。3) 新たな肝癌感受性自然免疫系分子同定のために、HBV陽性肝癌約200例、慢性B型肝炎約2,000例のゲノムワイドタイピングを終えた。4) MICA遺伝子の3'-UTRにはmiR-92/-106b標的配列が2箇所あり、実際にmiR-92/-106bでMICA蛋白の発現量を調節可能であった。さらに肝細胞指向性をもつHBV Large S蛋白を応用し、肝細胞特異的miRNA導入に成功、MICA蛋白の発現量を調節可能であった。5) HBe抗原は自然免疫において重要な役割を担うRIPK2と相互作用するが、RIPK2の発現を増強させるとHBV増殖は抑制され、RIPK2はHBV増殖抑制の標的分子となる可能性が示唆された。6) 組織、腫瘍マクロファージ ( Mac ) におけるMICAレセプターであるNKG2Dの発現を検討したところ、腫瘍内Macで高いNKG2D発現を認め、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Macは抗癌剤やIFNなど免疫療法の抗腫瘍効果を相乗的に高めることを明らかとした。

これら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、肝癌治療薬の開発に結びつけたい。

研究分担者 横須賀 収  
千葉大学大学院医学研究院  
教授

研究分担者 小池 和彦  
東京大学医学部附属病院  
教授

研究分担者 松田 浩一

東京大学医科学研究所  
准教授

研究分担者 地主 将久  
北海道大学遺伝子病制御  
研究所  
准教授

## A. 研究目的

ウイルス肝炎はわが国の国民病とも言われ、肝炎ウイルスキャリアは350万人に及ぶ。しかも肝炎ウイルスは不適切な医療行為により蔓延した可能性が指摘されている。ウイルス肝炎の終末像は肝臓癌であり、肝臓癌こそ肝炎ウイルスキャリアが最も恐れるものである。肝臓癌はわが国における癌死の第4位を占め、毎年3万人以上もの尊い命を奪っている。その原因の70%がC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV)、20%がB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) であり、肝炎ウイルスによる肝臓癌の抑止は肝臓病学の最重要課題である。我々はゲノムワイド関連解析 (genome wide association study: GWAS) を行い、C型肝炎において、自然免疫の主要因子であるナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞の標的分子であるMICA (MHC class I-related peptide sequence A) の遺伝子多型が肝臓癌と関連していることを明らかにした (Nat Genet 2011)。MICA 遺伝子多型はB型肝炎とも関連していることを突き止めた。HBV 感染によりMICA 発現が誘導されるが、MICA 遺伝子多型によりMICA 発現量が異なり、その差が肝臓癌リスクのみならず予後までも規定している。このことはすなわち、ウイルス感染肝細胞とNK細胞を中心とした自然免疫系との攻防がB型肝炎における肝臓癌に深く関わっていることを示している。そこで、本研究ではHBVによる発癌における自然免疫系の役割を明らかにし、自然免疫系の制御、特にMICAの発現調節による肝臓癌抑止法を開発することを目的とする。B型肝炎は核酸アナログによりコントロール可能な疾病になりつつあるが、HBVは駆除されがたく、増殖を制御しても肝臓癌の発生は必ずしも抑止出来ない。すなわち抗ウイルス療法とは異なる肝臓癌抑止戦略が必要である。本研究は、GWASにより発見されたMICA/NK細胞と肝臓癌との関連を元に、B型肝炎における肝臓癌抑止を行うという独創的研究である。具体的には、

I. B型肝炎による肝臓癌におけるMICA/NK細胞を中心とした自然免疫系の役割の解明

II. GWASデータ解析によるB型肝炎に関わる自然免疫系分子多型の同定

III. 肝臓癌関連自然免疫分子(特にMICA)の発現調節による肝臓癌抑止法の開発

IV. NK細胞と肝臓癌細胞との細胞間相互作用の解明

を目的とした研究を推進していく。

## B. 研究方法

1. B型肝炎関連遺伝子MICAの発現調節機構の解明 (加藤・松田)

1) 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 (一塩基多型 single nucleotide polymorphism) の探索を行なった。

2) 肝臓癌細胞株のうち、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. B型肝炎感受性遺伝子MICAの発現調節薬剤の探索 (加藤)

培養細胞系として肝臓癌細胞株を用いた。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、MICA蛋白は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。

### 3. 新規 B 型肝炎癌関連自然免疫分子の探索 (松田)

新規の B 型肝炎癌関連遺伝子、特に自然免疫関連分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 2,000 例を用いてゲノムワイドのタイピングを進めている。

### 4. 肝癌感受性遺伝子 MICA の microRNA による発現制御 (小池)

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。

### 5. 肝発癌における自然免疫関与の解析 (横須賀)

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検討した。

2) ヒト肝細胞に NF- $\kappa$ B 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 IL1 $\beta$  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 IFN、TNF で刺激後、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 microRNA 発現状態との関連を調べるため、HepG2 および HepG2.2.15 細胞で 1,008 種類の microRNA 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。

### 6. B 型肝炎癌における NKG2D 依存免疫システムのインパクトについての検討 (地主)

1) 腫瘍および健常組織マクロファージ (Mac) サブセットでの NKG2D 発現、NKG2D を介した免疫機能を検証した。

2) 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)

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。厚生労働省等による「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。

動物実験に際しては、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、当該研究を行っている。動物実験方法については倫理面の問題がないと判断している。

また、培養細胞系において行われている多くの研究は、現時点で倫理面への配慮を必要とするものではない。

### C. 研究結果

#### 1. B 型肝炎癌関連遺伝子 MICA の発現調節機構の解明 (加藤・松田)

1) 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や CHIP assay、SP-1 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。MICA が肝癌発症に対して予防的に働くと考えており、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。

2) 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、機能性/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. B 型肝炎感受性遺伝子 MICA の発現調節薬剤の探索 (加藤)

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、各肝癌細胞株において MICA mRNA、細胞膜上 MICA 蛋白、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。

## 3. 新規 B 型肝炎関連自然免疫分子の探索 (松田)

これまで収集を行った肝癌症例のうち、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 型肝炎 11 名、C 型肝炎 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 2,000 例を用いた全ゲノムタイピングを施行中である。

## 4. 肝癌感受性遺伝子 MICA の microRNA による発現制御 (小池)

1) 肝癌細胞株 4 種で MICA の発現量を見たところ、MICA 発現細胞と非発現細胞の二群に群分けされた。特に HBV 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 miR-93 および-106b が標的としうる配列を同定し、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。

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 発現細胞の排除に参与する NKG2D 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 microarray を用いて検証したところ、検証した計 2,000 種類の microRNA のうち miR-93 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 miR-93 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、miR-93 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、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。

5. 肝発癌における自然免疫関与の解析(横須賀)

1) ヒト肝細胞において TNF および IL1 $\beta$  に対する受容体 TNFR1、TNFR2、IL1R1、ILR2 の発現を蛋白レベルで確認した。

2) ヒト肝細胞では HBV により NF- $\kappa$ B は活性化されたが、TNF または IL1 $\beta$  により cooperative effect がみられ、更なる増加がみられた。

3) HepG2.2.15 細胞を IFN または TNF 刺激すると、細胞内 RIPK2 の発現は増加し、conditioned medium 中および細胞内 HBV DNA の発現減少がみられた。

4) 1,008 種類の microRNA の内、HepG2 と比較し、HepG2.2.15 で少なくとも 30 種類の microRNA 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 microRNA のうち 7

microRNA は Toll-like receptor (TLR) 伝達経路関連 microRNA 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 microRNA のうち、8 microRNA も TLR 伝達経路関連 microRNA として既に報告されていた。

6. B 型肝炎における NKG2D 依存免疫システムのインパクトについての検討(地主)

1) 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。

2) 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 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。

3) 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 陽性 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。

4) 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。

5) 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

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 SP-1 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。

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。

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。

今後、B 型肝癌の新たな予防法、治療法を開発するためには、新規の B 型肝癌感受性遺伝子の同定が望まれる。そこで、症例数を増やした解析を進めている。

今回の検討によって、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 ( miR-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示された。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ることが示唆された。

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 を発現調節に關与する 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 bionanoparticle 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。

一般に、B 型慢性肝炎では血中炎症性サイトカイン TNF や IL1 $\beta$  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- $\kappa$ B を活性化し、この効果は TNF や IL1 $\beta$  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 KO 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。今回の研究により、IFN 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、HCV では miR-122 や miR-130a が重要であり、HIV 感染症でも microRNA が持続感染に關与していることが報告されている。今回の検討から、慢性 HBV 持続性感染でも microRNA 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。

今回の検討で 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癌剤や



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、肝癌に対する抗癌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

・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が、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。

・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。

・新規のB型肝炎感受性遺伝子の同定、それに続くゲノム創薬に向けた研究を進めている。

・MICA蛋白発現量は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miR-93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。

・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microRNA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microRNAが重要であると考えられた。

・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. 健康危険情報

特になし

#### G. 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- $\beta$  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)
  - 7) Tanikawa C, Matsuo K, Kubo M, Takahashi A, Ito H, Tanaka H, Yatabe Y, Yamao K, Kamatani N, Tajima K, Nakamura Y, Matsuda K. Impact of PSCA variation on gastric ulcer susceptibility. **PLoS One** 2013; 8: e63698
  - 8) 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, Bertagnolli MM. Germline variants and advanced colorectal adenomas: adenoma prevention with celecoxib trial genome-wide association study. **Clin Cancer Res** 2013; 19: 6430-6437
  - 9) 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. Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians. **Int J Cancer** 2014 (epub ahead of print)
  - 10) 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 (Epub ahead of print)
  - 11) 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 USA** 2014 (Epub ahead of print)
  - 12) 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 (Epub ahead of print)
  - 13) 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 (Epub ahead of print)
  - 14) 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 (Epub ahead of print)
- 15) 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. **Hepatology Res** 2013 (Epub ahead of print)
  - 16) 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 (Epub ahead of print)
  - 17) 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. **Hepatology Res** 2013 (Epub ahead of print)
  - 18) 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 (Epub ahead of print)
  - 19) 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 (Epub ahead of print)
  - 20) 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 (Epub ahead of print)
  - 21) 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 arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial. **Am J Gastroenterol** 2013 (Epub ahead of print)
  - 22) 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: e78346
  - 23) 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- $\alpha$  and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. **Hepatology Res** 2013; 43: 1005-1012
  - 24) 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: 384-396
- 25) 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; 3: 2739
- 26) 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: 22-27
- 27) Koike K. The oncogenic role of hepatitis C virus. Recent results. **Cancer Res** 2014; 193: 97-111
- 28) 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: 173-177
- 29) 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; 3: 2553
- 30) 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: 596-604
- 31) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enoku 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: 366-373
- 32) 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; 8: e59040
- 33) 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: 254-268
- 34) Ikeda H, Enoku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 2013; 57: 417-418
- 35) 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- $\kappa$ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. **Hepatology** 2013; 57: 162-170
- 36) 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** 2013; 64: 577-583
- 37) 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** 2013; 152: 8-15
- 38) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gono 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** 2013; 8: e73615
- 39) 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** 2013; 10: 647-652
- 40) 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** 2013; 10: 567-574
- 41) 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)
- 42) Jinushi M, Yagita H, Yoshiyama H, Tahara H. Putting the brakes on anticancer therapies: suppression of innate immune pathways by tumor-associated myeloid cells. **Trend Mole Med** 2013; 19: 536-545
- 43) 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** 2013; 39: 1070-1081
- 44) Baghdadi M, Jinushi M. The impact of TIM gene family on tumor immunity and immunosuppression. **Cell Mol Immunol** 2014; 11: 41-48
- 45) Jinushi M. Yin and yang of tumor inflammation: how innate immune suppressors shape the tumor microenvironments. **Int J Cancer** 2013 (Epub ahead of print)
- 46) Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. **Cancer Sci** 2013 (Epub ahead of print)
- 47) 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 (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 回日本肝臓学会 . 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 型肝炎/肝臓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 9-10 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臓感受性遺伝子 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) 松田浩一 . 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 . 東京 . 2013 年 1 月 28 日
  - 11) Koichi Matsuda. GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis. JCA-AACR joint symposium. Maui, U.S.A. 25 Feb, 2013
  - 12) 松田浩一 . 遺伝子、生活習慣と癌について . 第 15 回泌尿器疾患ゲノム解析研究会 . 高知 . 2013 年 3 月 9 日
  - 13) 松田浩一 . 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 . 東京 . 2013 年 6 月 8 日
  - 14) 松田浩一 . The roles of gene-environmental interaction in human carcinogenesis. 日本癌学会シンポジウム . 横浜 . 2013 年 10 月 2 日
  - 15) 松田浩一 . 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 . 盛岡 . 2013 年 12 月 8 日
  - 16) 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 . 東京 . 2013 年 1 月 29-30 日
  - 17) 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 . 2013 年 2 月

15-17 日

- 18) Jinushi M. Tumor-infiltrating dendritic cells impede antitumor innate immunity through interaction of TIM-3 and HMGB1. 5th Annual Translational Symposium in University of Hawaii Cancer Center. Honolulu, U.S.A. 25 February, 2013
- 19) Jinushi M. Interaction between cancer cells and myeloid cells determine therapeutic responses to chemotherapy. STC Annual Meeting. National Harbor, U.S.A. November 7-9, 2013
- 20) 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 シンポジウム “Tumor

Immunology” . 幕張 . 2013 年 12 月 11-13 日

#### H. 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

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- $\beta$  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

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型肝臓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：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- $\kappa$ B活性化を誘導し、この作用はTNFおよびIL1 $\beta$ で増強することを明らかにした。一方、TNFやIFN $\alpha$ 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- $\kappa$ B 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 IL1 $\beta$ 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  $\alpha$  (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 IL1 $\beta$ 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- $\kappa$ B は活性化された (3.2-fold)が, TNF (8.6-fold,  $p < 0.05$ ) または IL1 $\beta$  (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  $\alpha$ , 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 IL1 $\beta$  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- $\kappa$ B を活性化し, この効果は TNF や IL1 $\beta$  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  $\alpha$  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, Gono 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）・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、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箇所存在し、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性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 倫理面での問題は無いものとする。

## 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 箇所)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 発現細胞の排除に参与する 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 が肝発癌に参与 (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が

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 の結合量も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ということが示唆された。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 での検討をすすめて 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が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. **Hepato 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. **Hepato 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 arteriography 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- $\alpha$  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, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziaepostolou 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- $\kappa$ B 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：松田浩一 東京大学医科学研究所 准教授

分担研究課題：B 型肝炎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のプロモーター領域の解析の結果、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 型肝炎における自然免疫の機能解明を目指す。

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 型肝炎症例約 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 型肝炎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、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 型肝炎 11 名、C 型肝炎 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 型肝炎と C 型肝炎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ため、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 1 HBV 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- $\gamma$  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. 5<sup>th</sup> 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

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
Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, <u>Koike K</u> , <u>Kato N</u> , Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, <u>Matsuda K</u> .	Identification of a functional variant in the mica promoter which regulates mica expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk.	PLoS One	8(4)	e61279	2013
Urabe Y, Ochi H, <u>Kato N</u> , 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, <u>Matsuda K</u> .	A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region.	J Hepatol	58(5)	875-882	2013
Goto K, Lin W, Zhang L, Jilg N, Shao RX, Schaefer EA, Zhao H, Fusco DN, Peng LF, <u>Kato N</u> , Chung RT.	The AMPK-related kinase SNARK regulates hepatitis C virus replication and pathogenesis through enhancement of TGF- $\beta$ signaling.	J Hepatol	59(5)	942-948	2013
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
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.	Hepatology Res			[Epub ahead of print]
Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, <u>Yokosuka O</u> .	Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells.	Cytokine	64(2)	577-83	2013
Jiang X, Kanda T, Tanaka T, Wu S, Nakamoto S, Imazeki F, <u>Yokosuka O</u> .	Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines.	Immunol Lett	152(1)	8-15	2013
Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, <u>Yokosuka O</u> .	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
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, <u>Yokosuka O</u> .	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

Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, <u>Yokosuka O.</u>	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
Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, <u>Yokosuka O.</u>	Regulation of miRNA by HBV infection and their possible association with control of innate immunity	World J Gastroenter ol			2014 (in press)
Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H.	Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients.	Int J Cancer			[Epub ahead of print]
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, <u>Koike K</u> , Karin M, Maeda S.	Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis.	Proc Natl Acad Sci U S A			[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 Gastroenter ol			[Epub ahead of print]



Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, <u>Koike K.</u> Akatsuka T.	The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells.	Hepatol Res			[Epub ahead of print]
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, <u>Koike K.</u> Yatomi Y, Ikeda H.	High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential.	Int J Cancer			[Epub ahead of print]
Uchino R, Isayama H, Tsuji no 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, <u>Koike K.</u>	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			[Epub ahead of print]

Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, <u>Koike K</u> , Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H.	Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers.	Hepatol Res				[Epub ahead of print]
Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, <u>Koike K</u> .	Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression.	Biochem Biophys Res Commun				[Epub ahead of print]
Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enoku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, <u>Koike K</u> .	Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C.	Hepatol Res				[Epub ahead of print]
Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, <u>Koike K</u> .	Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database.	J Gastroenterol				[Epub ahead of print]
Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, <u>Koike K</u> .	High levels of HBV after the onset lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B.	Clin Infect Dis	57(7)	935-942	2013	

Mikoshiha N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, <u>Koike K.</u>	Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life.	Psychooncology			[Epub ahead of print]
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, <u>Koike K.</u>	CT with hepatic arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial.	Am J Gastroenterol	108	1305-1313	2013
Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, <u>Koike K.</u>	Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor.	PLoS One	8(11)	e78346	2013
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, <u>Koike K.</u> Yatomi Y, Ikeda H.	Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- $\alpha$ and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1.	Hepatol Res	43(10)	1005-1012	2013

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, <u>Koike K</u> , Karin M.	Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling.	Cell	155(2)	384-396	2013
Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, <u>Koike K</u> .	Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs.	Sci Rep	3	2739	2013
Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, <u>Koike K</u> , 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	432(1)	22-27	2013
<u>Koike K</u> .	The oncogenic role of hepatitis C virus.	Recent Results Cancer Res	193	97-111	2014
Uchino K, Tateishi R, Nakagawa H, Shindoh J, Sugawara Y, Akahane M, Shibahara J, Yoshida H, <u>Koike K</u> .	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	57(2)	173-177	2013

Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, <u>Koike K.</u>	The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice.	Sci Rep	3	2553	2013
Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, <u>Koike K.</u> , Hayashi N, Kumada H.	Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B.	Hepatol Res	43(6)	596-604	2013
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, <u>Koike K.</u> , Yatomi Y, Ikeda H.	Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients.	J Gastroenterol	48(3)	366-373	2013
Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, <u>Koike K.</u>	Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma.	PLoS One	8(4)	e59040	2013
Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, <u>Koike K.</u>	Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	J Gastroenterol	48(2)	254-268	2013
Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, <u>Koike K.</u> , Yatomi Y.	Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57	417-418	2013

Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, <u>Koike K.</u>	MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF-κB activity via directly targeting Dnmt1 expression.	Hepatology	57	162-170	2013
Zhang B, Jia WH, Matsuo K, Shin A, Xiang YB, <u>Matsuda K.</u> , 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.	Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians.	Int J Cancer.	doi: 10.1002/ijc.28733. [Epub ahead of print]		2014
Tanikawa C, Matsuo K, Kubo M, Takahashi A, Ito H, Tanaka H, Yatabe Y, Yamao K, Kamatani N, Tajima K, Nakamura Y, <u>Matsuda K.</u>	Impact of PSCA variation on gastric ulcer susceptibility.	Plos one	8(5)	E63698	2013
<u>Jinushi M.</u> , 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 (9)	536-545	2013

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 & <u>Jinushi M.</u>	TIM-4 glycoprotein-mediated degradation of dying tumor cells by autophagy leads to reduced antigen presentation and increased immune tolerance.	Immunity	39(6)	1070-1081	2013
Baghdadi M & <u>Jinushi M</u>	The impact of TIM gene family on tumor immunity and immunosuppression.	Cellular and Molecular Immunology	11(1)	1-48	2014
<u>Jinushi M</u>	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.		
Komohara Y, <u>Jinushi M</u> , Takeya M.	Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors.	Cancer Science	Published online 2013 Oct 30. doi: 10.1111/cas.12314.		
Okamoto T, Hayashi Y, Mizuno H, Yanai H, Nishikawa J, Nakazawa T, Iizasa H, <u>Jinushi M</u> , Sakaida I, Yoshiyama H.	Colonization of an acid resistant <i>Kingella denitrificans</i> in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by <i>Helicobacter pylori</i> .	Journal of Infection and Chemotherapy	Published 2013 Dec 11. pii: S1341-321X(13)00036-6. doi: 10.1016/j.jiac.2013.09.007.		