

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

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 加藤 直也

平成27(2015)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	13
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 . B型肝炎感受性遺伝子MICAの発現とsheddingに関する研究	23
小池 和彦	
4 . B 型肝炎に関連する遺伝因子の解析	27
松田 浩一	
5 . B型肝炎発癌の治療標的	31
地主 将久	

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	33
----------------------------	----

IV . 研究成果の刊行物・別刷	41
------------------------	----

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を明らかにした。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。また、ヒト化マウスの系を用いて、SAHAによる抗腫瘍効果がNKG2D系免疫応答に依存することを前臨床試験系で証明した。3) 新たなB型肝炎発症に関わる遺伝因子を同定する目的で、HBV陽性肝癌患者237名、非癌コントロール15,060名を用いて、全ゲノム関連解析を行なった。その結果、HLA-DP領域に有意な関連を認め、さらにHLA領域以外において強い関連を示す6領域を同定した。またこれまでB型肝炎以外の悪性腫瘍との関連が報告されている288 SNPについてB型肝炎との関連を検討し、CDKN2AやPHLDB1が有意な関連を示すことを明らかにした。4) 細胞外分泌MICAはNKG2D陽性細胞からの攻撃を回避している可能性が示唆されており、MICA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、複数のMICAの細胞外分泌を阻害する物質を同定した。5) ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞にHBVを感染させMICA発現を検討した結果、MICAはHBV感染とともに発現が増強し、HBsAgの排除前から発現が減弱することが明らかになった。6) 腫瘍マクロファージにおけるNKG2D発現は正常と比較して高値であり、腫瘍細胞貪食を介して抗腫瘍免疫活性の誘導に寄与し、さらにI型IFNと相乗的な抗癌効果を発揮することを明らかにした。

これら研究を推し進め、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であり、肝臓こそ肝炎ウイルスキャリアが最も避けたい合併症である。肝臓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)

MICAプロモーター上のSNP (single nucleotide polymorphism) により血中MICA濃度が異なる。そこで、MICAの転写活性を変化させるプロモーター領域のSNPの同定を試みた。具体的には、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。今までの検討で、MICAの転写活性を変化させる2つの候補SNPを見出していたため、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。さらに肝臓癌患者における候補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. B型肝炎感受性遺伝子MICA発現誘導剤のNK細胞抗腫瘍効果 (加藤)

培養細胞系は、肝臓癌細胞株である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、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。

3. 新規 B 型肝炎関連遺伝因子の探索 (松田)

HBV 陽性肝癌患者 237 名、非癌コントロール 15,060 名を用いて、イルミナ Human Hap610 BeadsChip により、約 60 万か所の SNP タイピングを行なった。解析にあたり、年齢性別を交絡因子とした。また、癌発症と関連が報告されている 483 SNP を抽出し、これらの SNP について、GWAS の結果を用いて、発癌リスクとの関連を検討した。

4. MICA の翻訳後修飾 (特に shedding による分泌) を制御する化合物の探索 (小池)

1) MICA 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 端に nano-luc (小分子ルシフェラーゼ蛋白) を有する MICA を発現するコンストラクトを作製し、それを HepG2.2.15 細胞に恒常的に発現させたうえで化合物を作用させ、細胞上清中のルシフェラーゼ活性により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、ルシフェラーゼの発現、発光強度は GloMax を用いて測定した。

2) スクリーニングの結果、得られた候補化合物について、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。

5. HBV 感染による自然免疫関連分子発現の解析 (横須賀)

ヒト肝細胞キメラマウスから分離された PXB 細胞に Genotype C HBV を感染させ、4~5 日に 1 度 cell culture medium を交換した。HBV DNA および HBsAg はそれぞれ TaqMan PCR および CLIA にて測定した。Day 7、day 27、day 62、day 90 に細胞蛋白を SDS lysis buffer にて回収し、Western blot にて MICA および RIPK2 の発現状態を HBV 非感染肝細胞と比較検討した。

6. 腫瘍内マクロファージの B 型肝炎発症におよぼすインパクトについての検討 (地主)

マウス・ヒト腫瘍マクロファージを対象に、自然免疫分子 (NKG2D、TIM-3、TIM-4

等) 発現やその腫瘍制御能を検討した。さらに HBV 発癌モデル (HBx-TG) を対象にこれら免疫因子の自然発癌に対する影響を検討する。

(倫理面への配慮)

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。

組み換え DNA、レンチウイルスの取扱いについては機関承認を得て、拡散防止措置を施したうえで研究を進めている。

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 型肝炎関連遺伝子 MICA の発現調節機構の解明 (加藤)

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. B 型肝炎感受性遺伝子 MICA 発現誘導剤の NK 細胞抗腫瘍効果 (加藤)

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。

3. 新規 B 型肝炎関連遺伝因子の探索 (松田)

全ゲノム関連解析の結果、480,702 SNP についてのデータが取得された。

B 型肝炎ともっとも強い関連を示したのは HLA-DP 領域であった ($P=3.5 \times 10^{-12}$)。この領域は、慢性 B 型肝炎との関連が既に報告済みであることから、この SNP は癌化ではなく、HBV 感染の慢性化に関与すると考えられた。また HLA 領域以外では、ITPR1、LOC389141、KIAA0319、ZNF804B、FCHO1、POP4 の 6 領域が 10^{-6} 位の強い関連を示した。

さらに様々な悪性腫瘍の罹患性と関連が知られている 483 SNP について、B 型肝炎との関連を検討した。この内、288 SNP について関連解析結果が得られた。相関解析の結果、CDKN2A や PHLDB1 が 0.01 以下の強い関連を示した。しかしながら多重検定の補正後も有意な関連を示す SNP は同定されなかった。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. MICA の翻訳後修飾 (特に shedding による分泌) を制御する化合物の探索 (小池)

1) MICA 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、想定通りに上清のルシフェラーゼ値が減少する一方で、細胞溶解液でのルシフェラーゼ値が増加する傾向が認

められた。そこで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 1,280 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 におけるルシフェラーゼ (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 が増える一方で、細胞外に分泌される MICA 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。

2) これらの候補化合物を用いて、実際に細胞表面の MICA 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 発現量を増やすことが確認できた。

5. HBV 感染による自然免疫関連分子発現の解析 (横須賀)

ヒト肝細胞キメラマウスから分離された PXB 細胞に Genotype C HBV を感染させたところ、condition medium 中 HBV DNA は day 2 で 3.9/4.7 log copies/mL、day 7 で 3.8/4.5 log copies/mL、day 27 で 5.5/5.1 log copies/mL、day 62 で 4.5/5.5 log copies/mL、day 90 で 3.3/3.3 log copies/mL と検出可能であった。同様に condition medium 中 HBsAg は day 2 で $< 0.05/0.06$ IU/mL、day 7 で $< 0.05/0.24$ IU/mL、day 27 で 2.38/0.76 IU/mL、day 62 で 1.41/1.57 IU/mL であったが以後急速に検出感度以下となった。

肝細胞 MICA は day 27 で感染 HBV 量依存的に非感染肝細胞と比較し発現が増加していた。day 62 では非感染肝細胞と比較し発現が減少し、day 90 では発現のさらなる減弱がみられた。肝細胞 RIPK2 は HBV 感染により発現の減弱がみられた。

6. 腫瘍内マクロファージの B 型肝炎発癌に

およぼすインパクトについての検討(地主)

- 1) NKG2D は正常マクロファージと比して腫瘍内マクロファージに高発現していた。
- 2) NKG2D 陽性マクロファージは、IFN- α/β を介して抗がん剤による抗腫瘍効果を高める効果を発揮した。
- 3) HBx-TG マウスと NKG2D-KO マウスを対象に HBV 発癌に対するマクロファージ、NK 細胞を介した NKG2D 免疫システムの役割を検証する実験系を立ち上げた。
- 4) ヒト化マウスの系を用いて、HDAC 阻害剤 SAHA による抗腫瘍効果が NKG2D 系免疫応答に依存することを、ヒト化マウスを対象にした前臨床試験の系で証明した。

D. 考察

B 型肝炎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 型肝炎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。

FDA 承認薬ライブラリーを用いたスクリーニングにより同定した 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。

新規 B 型肝炎癌関連遺伝因子の解析では、既報の領域以外には強い関連を示す領域は

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

これまでの検討によって、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。そこで、創薬実用化の観点から MICA 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 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 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 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期待される。

ヒト肝細胞キメラマウスから分離された PXB 細胞中のヒト肝細胞の割合は約 70% 以上と報告されている。PXB 細胞に HBV を感染させ、Western blot を用いて MICA および RIPK2 発現を解析した。HBV 粒子の半減期は HBe 抗原陰性者および陽性者

ではそれぞれ中央値 2.5 min および 46 min であり、Dandri ら (Hepatology 2008) は免疫不全 uPA mice では半減期が 44 min から 4 時間と延長していることを報告している。今回研究に用いた HBV は HBe 抗原産生株であるが、約 90 日間 condition medium 中で HBV DNA が検出可能であり、今後の解析に有用であると考えられた。

肝発癌モデルにおいて、腫瘍マクロファージにおける NKG2D、TIM-3、TIM-4 が発癌制御に重要な役割を果たすことが明らかになった。今後は HBV 感染、発癌プロセスにどのように影響を及ぼすか、さらなる検証が必要である。さらに、NKG2D 欠損 HBx-TG マウスにおける肝、腫瘍マクロファージの機能解析と発癌活性、HBV 発癌予防、治療薬としての NKG2D、TIM-3 阻害剤の可能性の *in vivo* モデルにおける検証が重要である。

E. 結論

- ・ 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。
- ・ 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。
- ・ B 型肝炎の疾患関連遺伝子を網羅的に解析した結果、HLA 領域が強い関連を示した。また他にも複数の候補領域が同定された。
- ・ MICA の shedding 制御法の開発を開始した。本法はこれまでの知見と合わせることで効果的な免疫学的治療法につながると期待される。
- ・ ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞では少なくとも 90 日間の HBV 感染状態の観察が可能であった。MICA は HBV 感染とともに発現が増強し、

HBsAg の排除前から減弱した。HBV 感染および HBsAg 排除との関連から非常に興味深い。

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

F. 健康危険情報

特になし

G. 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 Res** 2014; 44: E137-44
- 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
- 8) Kashiwama T, Oda K, Ikeda Y, Shiose Y, Hirota Y, Inaba K, Makii C, Kurikawa R, Miyasaka A, Koso T, Fukuda T, Tanikawa M, Shoji H, Sone K, Arimoto T, Wada-Hiraike O, Kawana K, Nakagawa S, Matsuda K, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Osuga Y, Fujii T. Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR inhibitor DS-7423. **PLoS One** 2014; 9: e87220
- 9) Lin J, Deng Z, Tanikawa C, Shuin T, Miki T, Matsuda K, Nakamura Y. Downregulation of the tumor suppressor HSPB7, involved in the p53 pathway, in renal cell carcinoma by hypermethylation. **Int J Oncol** 2014; 44: 1490-1498
- 10) Yamamoto Y, Miyamoto M, Tatsuda D, Kubo M, Nakagama H, Nakamura Y, Satoh H, Matsuda K, Watanabe T, Ohta T. A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability. **Cancer Res** 2014; 74: 3707-3715
- 11) Zhang B, Jia WH, Matsuda K, Kweon SS, Matsuo K, Xiang YB, Shin A, Jee SH, Kim DH, Cai Q, Long J, Shi J, Wen W, Yang G, Zhang Y, Li C, Li B, Guo Y, Ren Z, Ji BT, Pan ZZ, Takahashi A, Shin MH, Matsuda F, Gao YT, Oh JH, Kim S, Ahn YO, Chan AT, Chang-Claude J, Slattery ML, Gruber SB, Schumacher FR, Stenzel SL, Casey G, Kim HR, Jeong JY, Park JW, Li HL, Hosono S, Cho SH, Kubo M, Shu XO, Zeng YX, Zheng W. Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk. **Nat Genet** 2014; 46: 533-542
- 12) Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, Nakamura Y. Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis. **Int J Oncol** 2014; 45: 147-156.
- 13) Cai Q, Zhang B, Sung H, Low SK, Kweon SS, Lu W, Shi J, Long J, Wen W, Choi JY, Noh DY, Shen CY, Matsuo K, Teo SH, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Hartman M, Takahashi A, Ashikawa K, Matsuda K, Shin MH, Park MH, Zheng Y, Xiang YB, Ji BT, Park SK, Wu PE, Hsiung CN, Ito H, Kasuga Y, Kang P, Mariapun S, Ahn SH, Kang HS, Chan KY, Man EP, Iwata H, Tsugane S, Miao H, Liao J, Nakamura Y, Kubo M, Delahanty RJ, Zhang Y, Li B, Li C, Gao YT, Shu XO, Kang D, Zheng W. Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1. **Nat Genet** 2014; 46: 886-890
- 14) Deng Z, Matsuda K, Tanikawa C, Lin J, Furukawa Y, Hamamoto R, Nakamura Y. Late Cornified Envelope Group I, a novel target of p53, regulates PRMT5 Activity. **Neoplasia** 2014; 16: 656-664
- 15) Matsuda K, Takahashi A, Middlebrooks CD, Obara W, Nasu Y, Inoue K, Tamura K, Yamasaki I, Naya Y, Tanikawa C, Cui R, Figueroa JD, Silverman DT, Rothman N,

- Namiki M, Tomita Y, Nishiyama H, Kohri K, Deguchi T, Nakagawa M, Yokoyama M, Miki T, Kumon H, Fujioka T, Prokunina-Olsson L, Kubo M, Nakamura Y, Shuin T. Genome-wide association study identified SNP on 15q24 associated with bladder cancer risk in Japanese population. **Hum Mol Genet** 2015; 24: 1177-1184
- 16) Lo PH, Tanikawa C, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of novel epigenetically inactivated gene PAMR1 in breast carcinoma. **Oncol Rep** 2015; 33: 267-273
- 17) 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
- 18) 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
- 19) Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arai 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
- 20) Nakamoto S, Kanda T, Nakaseko C, Sakaida E, Ohwada C, Takeuchi M, Takeda Y, Mimura N, Iseki T, Wu S, Arai M, Imazeki F, Saito K, Shirasawa H, Yokosuka O. Reactivation of hepatitis B virus in hematopoietic stem cell transplant recipients in Japan: efficacy of nucleos(t)ide analogues for prevention and treatment. **Int J Mol Sci** 2014; 15: 21455-21467
- 21) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamura M, Miyamura T, Nakamoto S, Banerjee A, Yokosuka O. Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity. **World J Gastroenterol** 2014; 20: 7197-7206
- 22) Kanda T, Jiang X, Yokosuka O. Androgen receptor signaling in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers. **World J Gastroenterol** 2014; 20: 9229-9236
- 23) Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Nakamura M, Wu S, Mikata R, Yokosuka O. Knockdown of glucose-regulated protein 78 enhances poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in human pancreatic cancer cells exposed to endoplasmic reticulum stress. **Oncol Rep** 2014; 32: 2343-2348
- 24) Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Miyamura T, Wu S, Yokosuka O. Involvement of androgen receptor and glucose-regulated protein 78 kDa in human hepatocarcinogenesis. **Exp Cell Res** 2014; 323: 326-336
- 25) Yasui S, Fujiwara K, Nakamura M, Miyamura T, Yonemitsu Y, Mikata R, Arai M, Kanda T, Imazeki F, Oda S, Yokosuka O. Virological efficacy of combination therapy with corticosteroid and nucleoside analogue for severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. **J Viral Hepat** 2015; 22: 94-102
- 26) Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Yasui S, Arai M, Yokosuka O. Reappearance of serum HBV DNA in patients with hepatitis B surface antigen seroclearance. **Hepatology** 2015 (Epub ahead of print)
- 27) Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. **Cancer Sci** 2014; 105: 1-8
- 28) Jinushi M. Immune regulation of

therapy-resistant niches: Emerging targets for improving anticancer drug responses. **Cancer Metastasis Rev** 2014; 33: 737-745

- 29) Yamashina T, Baghdadi M, Yoneda A, Kinoshita I, Suzu S, Dosaka-Akita H, Jinushi M. Cancer stem-like cells derived from chemoresistant tumors have a unique capacity to prime tumorigenic myeloid cells. **Cancer Res** 2014; 74: 2698-2709
- 30) Jinushi T, Shibayama Y, Kinoshita I, Oizumi S, Jinushi M, Aota T, Takahashi T, Horita S, Dosaka-Akita H, Iseki K. Low expression levels of microRNA-124-5p correlated with poor prognosis in colorectal cancer via targeting of SMC4. **Cancer Med** 2014; 3: 1544-1552
- 31) Jinushi M, Komohara Y. Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1855: 123-130

2. 学会発表

- 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
- 19) Matsuda K, Tanikawa C, Nakamura Y. PSCA as a potential therapeutic and prognostic biomarker for common cancer. American Association for cancer Research Annual meeting 2014. California, USA. 5-9 April, 2014
- 20) 松田浩一。バイオバンクジャパンについて。第103回日本病理学会。広島。2014年4月24-25日
- 21) Matsuda K. Impact of genetic variations on chronic viral infection and prognosis. 4th International Kyoto Liver Cancer Symposium. Kyoto, Japan. 7-8 June, 2014
- 22) 松田浩一。膀胱癌 GWAS の進捗について。泌尿器疾患ゲノム解析研究会。横浜。2014年8月29日
- 23) Matsuda K. BioBank Japan Project for personalize medicine. 第73回日本癌学会学術総会。横浜。2014年9月25-27日
- 24) 松田浩一。遺伝子多型解析による疾患感受性遺伝子探索。がんゲノム・エピゲノム、数理統計解析についての勉強会。大分。2014年12月20日
- 25) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T,

Yoshikawa T, Takata A, 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

- 26) 神田達郎、中村昌人、呉霜、中本晋吾、姜霞、宮村達雄、白澤浩、横須賀收 . ヒト肝細胞キメラマウスから分離された初代新鮮肝細胞を用いた HBV 感染と MICA 発現状態の解析 . 第 18 回日本肝臓学会大会 . 2014 年 10 月 23 日
- 27) Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Haga Y, Sasaki R, Jiang X, Nakamura M, Yokosuka O. HBV up-regulates IGFBP1 and MCA expressions in

hepatocytes from humanized SCID Alb-uPA mouse model. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B – Recent Progress in Basic and Clinical Research –. Hiroshima, Japan. 20 November, 2014

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

出願番号: P2014-089806

発明者: 地主将久、八木田秀雄、秋葉久弥

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B 型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

分担研究者：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、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 型肝炎感受性を決定する 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 型肝炎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 型肝炎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

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

分担研究者：横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学・教授
研究協力者：神田 達郎 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学・講師
中本 晋吾 千葉大学大学院医学研究院分子ウイルス学・助教

分担研究課題：肝発癌における自然免疫関与の解析

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

(倫理面への配慮)

血清の解析に関しては千葉大学医学部倫

理委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。また、一般論として弱者、女性、少数民族の疫学調査等を行う場合は倫理上十分配慮している。

C. 研究結果

1) Condition medium 中HBV DNAはDay 2で3.9, 4.7 log copies/mL, Day 7で3.8, 4.5 log copies/mL, Day 27で5.5, 5.1 log copies/mL, Day 62で4.5, 5.5 log copies/mL, およびDay 90で3.3, 3.3 log copies/mLと検出可能であった。

2) Condition medium 中HBsAgはDay 2で<0.05, 0.06 IU/mL, Day 7で<0.05, 0.24 IU/mL, Day 27で2.38, 0.76 IU/mL, Day 62で1.41, 1.57 IU/mLであったが以後急速に検出感度以下となった。

3) 肝細胞MICAは、Day 27で感染HBV量依存的に非感染肝細胞と比較し発現が増加していた。Day 62では非感染肝細胞と比較し発現が減少し、Day 90ではHBV感染肝細胞では発現のさらなる減弱がみられた。

4) 肝細胞 RIPK2 は HBV 感染により発現の減弱がみられた.

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

2. 学会発表

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

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

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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遺伝子の上流に存在し、SNP依存的なMICA蛋白の発現量の多寡が肝臓癌発生と相関していることを報告した。この結果に基づいて、本研究は、MICA蛋白発現制御を応用した肝臓癌予防法・治療法の開発を目的としている。これまで、特定のmicroRNAの機能を阻害するオリゴ核酸の肝細胞への導入で、MICA蛋白の発現量を調節できることを示してきた。さらに肝細胞指向性をもつB型肝炎ウイルスLarge S蛋白を応用したbionanoparticleにオリゴ核酸を封入することで、肝細胞特異的にオリゴ核酸を導入できる系を確立し、感染肝細胞のMICA蛋白の発現量をこの系を用いて調節しうることを示してきた。今回は、さらにMICA蛋白の細胞外分泌を制御する化合物をレポーター細胞を構築してスクリーニングし、実際に複数のMICA蛋白の細胞外分泌を阻害する物質を同定した。今後これらの結果を統合し、分子機構・生理的意義の解明を加えることによって、オリゴ核酸のB型肝炎ウイルス感染肝細胞への導入によるMICA蛋白の発現量調節と同定した化合物によるMICA蛋白のshedding制御が、ウイルス感染細胞の排除やウイルス感染による肝臓癌の予防法のひとつになる可能性が考えられた。

A. 研究目的

我々はこれまでに、ゲノムワイドアソシエーションスタディ解析(GWAS)によって、B型肝炎・C型肝炎ウイルス感染から肝臓癌の発生に関わる疾患感受性因子として同定したMHC class I polypeptide-related sequence A gene(MICA 遺伝子)(*Nat Genet* 2011, *PLoS ONE* 2012)の発現制御を転写後調節の観点から、microRNAを用いて検討してきた。MICAは本来、ウイルス感染肝細胞に高度に発現しnatural killer細胞やCD8+T細胞を活性化して感染細胞の排除に向かわせる役割を担っている遺伝子である。癌細胞やウイルス感染細胞ではMICAを標的とするmicroRNAが過剰発現する結果、MICAの発現が低いままに抑えられ、免疫担当細胞による癌細胞の排除機構を回避し

ている可能性が指摘されている。さらに、逆にMICAが高発現しても、その後の翻訳後修飾(shedding)の変化によってsoluble formのMICAの量が増える結果、末梢部位でMICAの受容体であるNKG2D陽性細胞がtrapされ、本来排除されるべきMICA発現肝細胞がMKG2D陽性細胞からの攻撃を回避している可能性も示唆されている。

いずれにしてもMICA遺伝子の発現量の調節機構を解明しそれを制御する方法を開発することは、感染肝細胞の排除あるいは癌化細胞の免疫学的排除を介して、肝炎ウイルス感染からの肝臓癌発生を制御するためにも極めて重要と考えられる。そこで、MICAの遺伝子発現量の調節によるB型肝炎ウイルス感染からの肝臓癌予防法・治療法の開発のために、昨年度に引き続きmicroRNAによるMICA蛋白発現の制御方

法の開発を進め、創薬の観点から効果的な肝細胞デリバリー法を検証した。さらに、発現制御をした MICA 蛋白の翻訳後修飾（特に shedding による分泌）を制御する化合物を網羅的にスクリーニングするために適した reporter を構築し、化合物スクリーニングを行った。これらの MICA 蛋白の発現量調節および shedding 調節を組み合わせることによって、MICA 蛋白を感染肝細胞の表面への発現を制御することができ、劇的な HBV 増殖抑制、排除、病態改善が可能となると考えられる。

B. 研究方法

- 1) MICA 蛋白は C 端寄りで切断され、その N 端側が細胞外に分泌される。そこで、N 端の最初に Halo-tag を発現する融合蛋白を発現するコンストラクトを作製し、それをゲノムに組み込まれた遺伝子由来の B 型肝炎ウイルスが複製する HepG2.2.15 細胞に発現させたうえで化合物を作用させ、細胞上清中に出てくる Halo-tag 融合 MICA 蛋白を Halo-tag への結合蛍光物質で定量しスクリーニングを行った。蛍光強度の測定は 48well-plate で蛍光リーダーを用いて検討した。
- 2) さらに高感度にするために、Halo-tag を nano-luc（小分子ルシフェラーゼ蛋白）に置き換えたレポーターコンストラクトを作製し、これを HepG2.2.15 細胞で恒常的に発現するレポーター細胞を作製し、同様のスクリーニングを行った。化合物スクリーニングは商業的に入手可能な 1,000 種以上の化合物を用いて、luciferase の発現、発光強度は 96well-plate ベースで GloMax を用いて測定した。
- 3) スクリーニングの結果、得られた候補化合物について、個別に検討し、そのうえで細胞表面発現 MICA 蛋白の量が変化するかを FACS によって検討した。

（倫理面への配慮）

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

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

C. 研究結果

- 1) Halo-tag 融合 MICA 蛋白を発現するコンストラクトを用いたスクリーニングを行った。蛍光強度の dynamic range が狭いためか、ポジティブコントロールとして用いた pan ADAM 阻害剤や MMP 阻害剤でも有意な変化が得られず、この系でのスクリーニングは困難であると考え、次の luciferase ベースの検討に移行した。
- 2) MICA 蛋白の N 端に nano-luc 蛋白を融合させたレポーター蛋白では、ポジティブコントロールとして用いた panADAM 阻害剤を作用させると、想定通りに、上清の luciferase の値が減少するいっぽうで、細胞溶解液中の luciferase の値が増加する傾向が認められた。そこでこの系を用いてレンチウイルスによって HepG2.2.15 細胞にこのコンストラクトを組み込み恒常的にレポーター蛋白が発現するレポーター細胞を確立した。この細胞と商業的に入手した 1280 種の化合物についてスクリーニングを行った。その結果、negative control における luciferase の(上清中/細胞溶解液中)の値が通常では 0.02 程度のものが、Molsidomine, Metergoline, などの化合物によって、0.009 程度にまで下がり、かつ、細胞溶解液中の絶対値が増えていた。すなわちこれらの化合物を作用させると、細胞内 MICA 蛋白量が増える一方で、細胞外 MICA 蛋白量は減少し、その結果、shedding が抑制されていることが示唆された。
- 3) そこでこれらの候補化合物を用いて、実際に細胞表面の MICA 蛋白量変化を FACS にて確認した。その結果、ポジティブコントロールとして検討した ADAM 阻害剤・MMP 阻害剤と同程度の強さで、細胞表面の MICA 蛋白の発現量を増やすことが確認できた。

D. 考察

我々は以前行った GWAS 解析 によって、B 型肝炎・C 型肝炎ウイルス感染からの肝臓癌感受性を規定する SNP として MICA のプロモーター領域の SNP を同定した。C 型肝炎ウイルス感染からの肝発癌においては MICA 遺伝子発現を抑える方向に働く SNP が肝発癌に關与 (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

FCH01, POP4 の 6 領域が 10-6 位の強い関連を示した。

表. HLA 以外の領域の解析結果

SNP	Chr.pos.	OR	P	gene	location	
rs4147799	1	94357047	1.62	7.06E-05	ABCA4	0
rs3789450	1	94358890	1.63	6.83E-05	ABCA4	0
rs6546024	2	63775279	1.60	6.18E-05	LOC647112	9926
rs7589857	2	70271843	0.62	1.70E-05	C2orf42	-188
rs2706768	2	70310090	0.65	8.95E-05	TIA1	0
rs1382457	2	70396890	0.64	6.35E-05	FAM136A	-14185
rs9808069	2	123392154	1.55	9.60E-05	LOC728241	713248
rs6747870	2	135186239	2.30	3.75E-05	TMEM163	0
rs10932384	2	212118093	1.56	2.99E-05	ERBB4	0
rs16863738	2	223045043	1.69	7.36E-05	SGPP2	0
rs17041369	3	4769980	2.13	8.08E-06	ITPR1	0
rs2600174	3	9264086	1.56	1.45E-05	SRGAP3	0
rs4974120	3	56196033	1.69	9.87E-05	ERC2	0
rs4974176	3	56196647	1.69	9.87E-05	ERC2	0
rs1462307	3	111984538	1.92	3.51E-06	LOC389141	-99786
rs10934067	3	111990953	1.88	9.02E-06	LOC151760	102614
rs9838303	3	163137089	1.97	4.04E-05	LOC100132484	-382355
rs6443429	3	178352192	0.62	6.68E-05	TBL1XR1	0
rs7611092	3	178395228	0.61	3.57E-05	TBL1XR1	0
rs1157531	4	13491883	1.68	1.17E-05	LOC381636	-96005
rs1399249	4	71029223	1.53	4.82E-05	CSN1S2B	4687
rs12649554	4	102115699	0.65	5.34E-05	PPP3CA	47911
rs4524412	4	122160349	1.56	9.05E-05	C4orf31	15883
rs6836062	4	181345504	1.52	6.85E-05	LOC728081	876732
rs7665398	4	181350686	1.64	9.40E-05	LOC728081	871550
rs16882451	5	53542995	1.60	1.30E-05	ARL15	0
rs3985087	5	110100555	2.58	5.89E-05	SLC25A46	-2098
rs1205918	6	22473741	0.58	1.48E-05	PRL	-68032
rs7765678	6	24438523	2.75	1.19E-06	DCDC2	0
rs2760181	6	24656540	2.54	4.24E-06	KIAA0319	0
rs6928412	6	43624206	2.33	8.19E-05	XPO5	0
rs7764616	6	45653953	1.61	2.19E-05	RUNX2	27156
rs7773293	6	114070787	1.54	2.10E-05	LOC728590	60880
rs2301677	7	17292583	0.63	3.30E-05	LOC100131512	0
rs1557917	7	88388864	1.67	9.39E-06	ZNF804B	0
rs2158499	7	88396705	1.58	6.02E-05	ZNF804B	0
rs10091962	8	40482035	2.30	3.22E-05	ZMAT4	25235
rs7018220	8	40502000	2.30	4.21E-05	ZMAT4	5270
rs1249744	9	116083173	0.64	8.57E-05	COL27A1	0
rs4917418	10	106285577	1.55	7.00E-05	CCDC147	80739
rs1028918	10	106291065	1.55	6.80E-05	CCDC147	86227
rs12252509	10	106291589	1.55	6.90E-05	CCDC147	86751
rs11192121	10	106313791	1.58	2.64E-05	SORCS3	-77058
rs6487679	12	9282599	1.74	4.51E-05	PZP	-10366
rs12229800	12	13697499	2.10	6.80E-05	GRIN2B	0
rs7301344	12	15186200	1.60	1.47E-05	RERG	0
rs12889177	14	22561169	2.24	9.90E-05	PSMB5	3731
rs3112614	16	51190534	1.51	6.91E-05	LOC643714	0
rs12597685	16	51195281	0.65	4.35E-05	LOC643714	0
rs3104811	16	51221448	1.53	3.62E-05	LOC643714	-23050
rs4940181	18	48264629	2.30	7.48E-05	DCC	0
rs8095066	18	72016459	1.67	1.74E-05	ZNF516	184148
rs2927261	18	74731402	1.63	3.96E-06	LOC645321	107937
rs265555	19	17756874	3.28	2.83E-06	FCH01	0
rs265552	19	17761158	2.77	1.92E-05	FCH01	792
rs8112048	19	19878749	1.49	7.31E-05	ZNF14	3532
rs7246866	19	19683049	1.50	6.12E-05	ZNF14	0
rs8110890	19	19709485	1.50	5.98E-05	ZNF14	-4564
rs7256487	19	19718654	1.54	1.86E-05	LOC100130292	-5772
rs12978630	19	34784968	1.91	1.62E-05	POP4	-4073
rs7247377	19	34788403	1.91	1.66E-05	POP4	-638
rs12983160	19	34804197	1.98	3.64E-06	POP4	5650
rs4239875	22	33668995	2.14	7.31E-05	ISX	-123135

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

D. 考察

今回の解析では、既報の領域以外には強

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

Wen W, Yang G, Zhang Y, Li C, Li B, Guo Y, Ren Z, Ji BT, Pan ZZ, Takahashi A, Shin MH, Matsuda F, Gao YT, Oh JH, Kim S, Ahn YO, Chan AT, Chang-Claude J, Slattery ML, Gruber SB, Schumacher FR, Stenzel SL, Casey G, Kim HR, Jeong JY, Park JW, Li HL, Hosono S, Cho SH, Kubo M, Shu XO, Zeng YX, Zheng W. Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk. **Nat Genet** 2014; 46: 533-542

- 5) Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, Nakamura Y. Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis. **Int J Oncol** 2014; 45: 147-156.
- 6) Cai Q, Zhang B, Sung H, Low SK, Kweon SS, Lu W, Shi J, Long J, Wen W, Choi JY, Noh DY, Shen CY, Matsuo K, Teo SH, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Hartman M, Takahashi A, Ashikawa K, Matsuda K, Shin MH, Park MH, Zheng Y, Xiang YB, Ji BT, Park SK, Wu PE, Hsiung CN, Ito H, Kasuga Y, Kang P, Mariapun S, Ahn SH, Kang HS, Chan KY, Man EP, Iwata H, Tsugane S, Miao H, Liao J, Nakamura Y, Kubo M, Delahanty RJ, Zhang Y, Li B, Li C, Gao YT, Shu XO, Kang D, Zheng W. Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1. **Nat Genet** 2014; 46: 886-890
- 7) Deng Z, Matsuda K, Tanikawa C, Lin J, Furukawa Y, Hamamoto R, Nakamura Y. Late Cornified Envelope Group I, a Novel Target of p53, Regulates PRMT5 Activity. **Neoplasia** 2014; 16: 656-664
- 8) Matsuda K, Takahashi A, Middlebrooks CD, Obara W, Nasu Y, Inoue K, Tamura K, Yamasaki I, Naya Y, Tanikawa C, Cui R, Figueroa JD, Silverman DT, Rothman N,

Namiki M, Tomita Y, Nishiyama H, Kohri K, Deguchi T, Nakagawa M, Yokoyama M, Miki T, Kumon H, Fujioka T, Prokunina-Olsson L, Kubo M, Nakamura Y, Shuin T. Genome-wide association study identified SNP on 15q24 associated with bladder cancer risk in Japanese population. **Hum Mol Genet** 2015; 24: 1177-1184

- 9) Lo PH, Tanikawa C, Katagiri T, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of novel epigenetically inactivated gene PAMR1 in breast carcinoma. **Oncol Rep** 2015; 33: 267-273

2. 学会発表

- 1) Matsuda K, Tanikawa C, Nakamura Y. PSCA as a potential therapeutic and prognostic biomarker for common cancer. American Association for cancer Research Annual meeting 2014. California, USA. 5-9 April, 2014
- 2) 松田浩一 . バイオバンクジャパンについて . 第 103 回日本病理学会 . 広島 . 2014 年 4 月 24-25 日
- 3) Matsuda K. Impact of genetic variations on chronic viral infection and prognosis. 4th International Kyoto Liver Cancer Symposium. Kyoto, Japan. 7-8 June, 2014
- 4) 松田浩一 . 膀胱癌 GWAS の進捗について . 泌尿器疾患ゲノム解析研究会 . 横浜 . 2014 年 8 月 29 日
- 5) Matsuda K. BioBank Japan Project for personalize medicine. 第 73 回日本癌学会学術総会 . 横浜 . 2014 年 9 月 25-27 日
- 6) 松田浩一 . 遺伝子多型解析による疾患感受性遺伝子探索 . がんゲノム・エピゲノム、数理統計解析についての勉強会 . 大分 . 2014 年 12 月 20 日

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

B型肝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

研究協力者：山階維騎、森田智子、Byron Baron

分担研究課題：B型肝発癌の治療標的

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

A. 研究目的

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

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

B. 研究方法

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

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

- ・ NKG2D は正常マクロファージと比して腫瘍内マクロファージに高発現していた。
- ・ NKG2D 陽性マクロファージは、IFN- α / β を介して抗がん剤による抗腫瘍効果を高める効果を発揮した。
- ・ HBx-TG マウスと NKG2D-KO マウスを対象に HBV 発癌に対するマクロファージ、NK 細胞を介した NKG2D 免疫システムの役割を検証する実験系を立ち上げた。
- ・ ヒト化マウスの系を用いて、HDAC 阻害剤 SAHA による抗腫瘍効果が NKG2D 系免疫応答に依存することを、ヒト化マウスを対象にした前臨床試験の系で証明した。

D. 考察

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

Res 2014; 74: 2698-2709

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

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明者：地主将久、八木田秀雄、秋葉久弥

特許出願人：北海道大学

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

出願番号 P2014-089806

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

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

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

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

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

Zhang B, Jia WH, <u>Matsuda K</u> , Kweon SS, Matsuo K, Xiang YB, Shin A, Jee SH, Kim DH, Cai Q, Long J, Shi J, Wen W, Yang G, Zhang Y, Li C, Li B, Guo Y, Ren Z, Ji BT, Pan ZZ, Takahashi A, Shin MH, Matsuda F, Gao YT, Oh JH, Kim S, Ahn YO, Chan AT, Chang-Claude J, Slattery ML, Gruber SB, Schumacher FR, Stenzel SL, Casey G, Kim HR, Jeong JY, Park JW, Li HL, Hosono S, Cho SH, Kubo M, Shu XO, Zeng YX, Zheng W.	Large-scale genetic study in East Asians identifies six new loci associated with colorectal cancer risk.	Nat Genet	46(6)	533-542	2014
Fujitomo T, Daigo Y, <u>Matsuda K</u> , Ueda K, Nakamura Y.	Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis.	Int J Oncol	45(1)	147-156	2014

<p>Cai Q, Zhang B, Sung H, Low SK, Kweon SS, Lu W, Shi J, Long J, Wen W, Choi JY, Noh DY, Shen CY, Matsuo K, Teo SH, Kim MK, Khoo US, Iwasaki M, Hartman M, Takahashi A, Ashikawa K, <u>Matsuda K</u>, Shin MH, Park MH, Zheng Y, Xiang YB, Ji BT, Park SK, Wu PE, Hsiung CN, Ito H, Kasuga Y, Kang P, Mariapun S, Ahn SH, Kang HS, Chan KY, Man EP, Iwata H, Tsugane S, Miao H, Liao J, Nakamura Y, Kubo M, Delahanty RJ, Zhang Y, Li B, Li C, Gao YT, Shu XO, Kang D, Zheng W.</p>	<p>Genome-wide association analysis in East Asians identifies breast cancer susceptibility loci at 1q32.1, 5q14.3 and 15q26.1.</p>	<p>Nat Genet</p>	<p>46(8)</p>	<p>886-890</p>	<p>2014</p>
<p>Deng Z, <u>Matsuda K</u>, Tanikawa C, Lin J, Furukawa Y, Hamamoto R, Nakamura Y.</p>	<p>Late cornified envelope group I, a novel target of p53, regulates PRMT5 activity.</p>	<p>Neoplasia</p>	<p>16(8)</p>	<p>656-664</p>	<p>2014</p>

<u>Matsuda K</u> , Takahashi A, Middlebrooks CD, Obara W, Nasu Y, Inoue K, Tamura K, Yamasaki I, Naya Y, Tanikawa C, Cui R, Figueroa JD, Silverman DT, Rothman N, Namiki M, Tomita Y, Nishiyama H, Kohri K, Deguchi T, Nakagawa M, Yokoyama M, Miki T, Kumon H, Fujioka T, Prokunina-Olssoon L, Kubo M, Nakamura Y, Shuin T.	Genome-wide association study identified SNP on 15q24 associated with bladder cancer risk in Japanese population.	Hum Mol Genet	24(4)	1177-1184	2015
Lo PH, Tanikawa C, Katagiri T, Nakamura Y, <u>Matsuda K</u> .	Identification of novel epigenetically inactivated gene PAMR1 in breast carcinoma.	Oncol Rep	33(1)	267-273	2015
Komohara Y, <u>Jinushi M</u> , Takeya M.	Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors.	Cancer Sci	105(1)	1-8	2014
<u>Jinushi M</u>	Immune regulation of therapy-resistant niches: Emerging targets for improving anticancer drug responses.	Cancer Metastasis Rev	33(2-3)	737-745	2014
Yamashina T, Baghdadi M, Yoneda A, Kinoshita I, Suzu S, Dosaka-Akita H, <u>Jinushi M</u> .	Cancer stem-like cells derived from chemoresistant tumors have a unique capacity to prime tumorigenic myeloid cells.	Cancer Res	74(10)	2698-2709	2014
Jinushi T, Shibayama Y, Kinoshita I, Oizumi S, <u>Jinushi M</u> , Aota T, Takahashi T, Horita S, Dosaka-Akita H, Iseki K.	Low expression levels of microRNA-124-5p correlated with poor prognosis in colorectal cancer via targeting of SMC4.	Cancer Med	3(6)	1544-1552	2014

Jinushi M, Komohara Y.	Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside.	Biochim Biophys Acta	1855(2)	123-130	2015
---------------------------	--	-------------------------	---------	---------	------