

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390208

研究課題名（和文） 肝癌における NK レセプターとそのリガンドの発現制御機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文） Molecular mechanism of the ectodomain shedding of the NKG2D ligand MHC class I-related chain A in hepatocellular carcinoma and its therapeutic implication

研究代表者

竹原 徹郎（TAKEHARA, TETSUO）

大阪大学・院医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

研究成果の概要（和文）：MICA は活性化 NK レセプター-NKG2D のリガンドであり、肝細胞癌の NK 細胞感受性規定因子になっている。本研究課題において、肝癌では疾患が進行すると MICA の分泌が亢進し生体の免疫監視機構は減弱するが、その分泌には ADAM ファミリー蛋白が関与しており、抗癌剤は ADAM を抑制することにより癌細胞の NK 感受性を改善するという新規の機構があることを明かにした。ADAM の発現制御は肝癌に対する新たな免疫治療の標的になることが示された。

研究成果の概要（英文）：MHC class I-related chain A (MICA), a ligand for the NKG2D activating receptor NKG2D, is expressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and determines its sensitivity to NK cells. In the present study, we have shown that 1) the serum levels of soluble form of MICA increase in chronic liver disease and HCC as disease progresses, 2) ADAM9 and ADAM 10 are critically involved in shedding of MICA from HCC and 4) anti-tumor agents including sorafenib and epirubicin inhibit expression of ADA9 and ADAM10, respectively, and shedding of MICA in HCC. These results indicate that ADAM family proteins are involved in ectodomain shedding of MICA from HCC and could be novel therapeutic targets for improving anti-tumor immune responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓、癌、免疫、NK 細胞、MICA、NKG2D、ADAM、ソラフェニブ

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は NK 細胞の NKG2D 活性化レセプターに対するリガンドである MHC class I-related chain A (MICA) を発現している。MICA は腫瘍細胞から切断を受け、可溶型 MICA として分泌されるが、その分子機序について

は Erp5 による SS ボンドの解裂が関与していること以外詳細は不明である。MICA の切断・分泌は腫瘍細胞の膜結合型 MICA の発現量を低下させるとともに、NKG2D のダウンレギュレーションを引き起こすことから、腫瘍が生体の免疫監視機構から逃避する機構になっ

ていると考えられている。

2. 研究の目的

肝癌における MICA の分泌の実態とその分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

肝疾患患者の保存血清を用いて可溶型 MICA を ELISA にて測定する。血清 MICA と肝疾患の病態との関連を解析する。

肝癌細胞株を用いて MICA の分泌に関与する分子を同定する。MICA の切断・分泌を誘導する薬剤を探索する。

4. 研究成果

ヒト肝疾患では健常者に比し、血清中の可溶型 MICA が高値であり、病態が進行するに従い可溶型 MICA は上昇した。肝癌患者にエピルピシンを用いた肝動脈塞栓術を行うと、治療後に可溶型 MICA 濃度が低下し、NK 細胞の NKG2D 発現量が増加した。以上のことから、肝癌において肝癌細胞の NK 感受性を規定する膜結合型 MICA は疾患の進行に伴い切断を受け分泌され、抗癌剤を用いた動脈塞栓術は MICA の切断・分泌を抑制することが示された (Kohga K, et al., *Cancer Sci* 2008)。

肝癌細胞株の α 5 β 1 integrin and metalloprotease (ADAM) ファミリーを siRNA でノックダウンしたところ、ADAM9 あるいは ADAM10 の siRNA の導入により、膜結合型の MICA が亢進し、培養上清中の可溶型 MICA 濃度が低下した。ソラフェニブとエピルピシンは ADAM9 と ADAM10 の発現をそれぞれ低下させ、MICA の切断・分泌を抑制し、肝癌細胞の NK 細胞感受性を亢進させた (Kohga, et al., *Cancer Res* 2009)。ADAM9 は MICA の Gln347-Val348 切断活性があり、この部位に変異を入れると、ADAM9 ノックダウンによる MICA の翻訳後修飾は阻害された。免疫染色により、ADAM9、ADAM10 のヒト肝癌組織における発現が確認された。以上のことは MICA の分泌に ADAM ファミリー蛋白が関与することを明らかにするとともに、抗癌剤に由来知られていなかった癌細胞の免疫感受性を増強する機構があることを示したものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Miyagi T, Shimizu S, Nishio K, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Differential alteration of CD56-bright and CD56-dim NK cells

in frequency, phenotype and cytokine response in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J*

Gastroenterol (in press) 査読あり

2. Tsunematsu H, Tatsumi T, Kohga K, Yamamoto M, Aketa H, Miyagi T, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer (in press)*. 査読あり
3. Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Sugiyama T, Aketa H, Sasakawa A, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. α -galactosylceramide activates antitumor immunity against liver tumor. *Hepatol Res* 41: 30-38, 2011. 査読あり
4. Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Nakazuru S, Mita E, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD8⁺ T cell responses during pegylated interferon- α and ribavirin treatment are associated with the antiviral activity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 41: 30-38, 2011. 査読あり
5. Miyagi T, Takehara T, Uemura A, Nishio K, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Li W, Sasakawa A, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Absence of invariant natural killer T cells deteriorates liver inflammation and fibrosis in mice fed high-fat diet. *J Gastroenterol* 45: 1247-1254, 2010. 査読あり
6. Miyagi T, Takehara T, Nishio K,

- Shimizu S, Kohga K, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Altered interferon- α -signaling in NK cells from the patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Hepatol** **53**: 424-430, 2010. 査読あり
7. Kohga K, Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Hayashi N. Expression of CD133 confers malignant potential via inhibiting metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** **52**: 872-879, 2010. 査読あり
 8. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. **Hepatology** **51**: 1264-1273, 2010. 査読あり
 9. Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Yamamoto M, Kohga K, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Akagi T, Akashi M, Hayashi N. EphA2-derived peptide vaccine with amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles elicits an antitumor effect against mouse liver tumor. **Cancer Immunol Immunother** **59**: 759-767, 2010. 査読あり
 10. Uemura A, Takehara T, Miyagi T, Suzuki T, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell is a major producer of interferon γ that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. **Cancer Immunol Immunother** **59**: 453-463, 2010. 査読あり
 11. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res** **69**: 8050-8057, 2009. 査読あり
 12. Sasakawa A, Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Yamamoto M, Ohkawa K, Miyagi T, Hayashi N. Activated liver dendritic cells generates strong acquired immunity in α -galactosylceramide treatment. **J Hepatol** **50**: 1155-1162, 2009. 査読あり
 13. Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Yamamoto M, Fujita Y, Miyagi T, Ohkawa K, Hayashi N. Decreased expressions of CD1d molecule on liver dendritic cells in subcutaneous tumor bearing mice. **J Hepatol** **49**: 779-786, 2008. 査読あり
 14. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble MHC class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and the changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. **Cancer Sci** **99**: 1643-1649, 2008. 査読あり
 15. Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Hikita H, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Ohkawa K, Hayashi N. Dendritic cell-based vaccines suppress metastatic liver tumor via

activation of local innate and acquired immunity. **Cancer Immunol Immunother** 57: 1861-1869, 2008. 査読あり

[学会発表] (計 21 件)

1. **The Liver Meeting 2010 Oct 29~Nov 2, 2010 Boston Hynes Convention Center**
「The role of IFN-STAT1 signal transduction on inhibition of HCC development」 Hosui A, Takehara T, et al.
2. **第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 (水) ~24 日 (金) 大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル** 「C 型肝炎からの肝発がん」(シンポジウム 2 ウイルス発がん) 竹原徹郎 「IFN-STAT1 活性化が肝癌進展に及ぼす影響の検討」 法水 淳, 竹原徹郎, 他
「Sorafenib は肝細胞癌の ADAM9 を抑制することで MICA の shedding を制御する」 甲賀啓介, 竹原徹郎, 他 「CD133 陽性肝細胞癌は metalloproteinase を制御しその生存に有利な環境を作る」 巽 智秀, 竹原徹郎, 他
3. **第 46 回日本肝臓学会総会 2010 年 5 月 27 日 (木)、28 日 (金) ホテルメトロポリタン山形、山形テルサ、山形国際ホテル** 「IFN-STAT1 活性化が肝癌進展に及ぼす影響の検討」(シンポジウム 2 肝細胞癌の分子標的探索と臨床応用) 法水 淳, 竹原徹郎, 他
「 α -fetoprotein による先天免疫活性化抑制機構の解析」 山本政司, 竹原徹郎, 他
4. **第 96 回日本消化器病学会総会 2010 年 4 月 22 日 (木) ~24 日 (金) 新潟県民会館、新潟市民芸術文化会館、新潟市音楽文化会館、朱鷺メッセ** 「肝細胞癌にける NK 活性化レセプター-NKG2D リガンドの発現と ADAM ファミリーによるその制御」(シンポジウム 7 C 型肝炎: ウイルス感染の分子免疫機構) 甲賀啓介, 竹原徹郎, 他 「NAFLD 病態における invariant NKT 細胞が果たす役割」(ワークショップ 3 NASH/NAFLD 発症のメカニズム) 宮城琢也, 竹原徹郎, 他
5. **第 23 回肝臓洞壁細胞研究会学術集会 2009 年 12 月 12 日 (土)、13 日 (日) ホテル京阪ユニバーサルタワー (大阪)**
「 α -galactosylceramide による肝樹状細胞の活性化機構の解析」 笹川 哲, 竹原徹郎, 他
6. **第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 2 日 (水) ~4 日 (金) 大阪国際会議場** 「 α -fetoprotein impairs NK activity by inhibiting dendritic cell function」 Yamamoto M, Takehara T, et al. 「Anti-cancer chemotherapy enhances NK sensitivity by inhibiting MICA ectodomain shedding in human hepatocellular carcinoma」 Kohga K, Takehara T, et al.
7. **The Liver Meeting 2009 October 31-November 3, 2009, Boston HYNES CONVENTION CENTER** 「Interferon- α -signaling in natural killer cells is impaired in chronic hepatitis C virus infection」 Miyagi T, Takehara T, et al.
「Lack of invariant natural killer T cells elicits liver inflammation and predisposes to liver fibrosis in mice fed with high-fat diet」 Nishio K, Takehara T, et al.
8. **JDDW 2009 2009 年 10 月 14 日 (水) ~17 日 (土) 国立京都国際会館、グランドプリンスホテル京都** 「非アルコール

- 性脂肪性肝炎病態進展における Invariant NKT 細胞の役割」(パネルディスカッション 11 自然免疫と消化器疾患) 宮城琢也, 竹原徹郎, 他
9. 第 45 回日本肝癌研究会 2009 年 7 月 3 日 (金)、4 日 (土) 福岡国際会議場 「 α -fetoprotein による免疫抑制—NK 細胞による細胞障害活性について」山本政司, 竹原徹郎, 他
10. 第 45 回日本肝臓学会総会 2009 年 6 月 4 日 (木)、5 日 (金) 神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 「非アルコール性脂肪性肝炎病態形成における NKT 細胞の関与」宮城琢也, 竹原徹郎, 他 「肝細胞癌における NK 活性化レセプターリガンド MICA 分泌 (shedding) の分子機構」甲賀啓介, 竹原徹郎, 他 「 α -PGA ナノ粒子を用いた癌免疫療法の基礎的検討」山口真二郎, 竹原徹郎, 他 「肝細胞特異的 STAT5 欠損マウスにおける肝線維化・発がんの分子機構」法水 淳, 竹原徹郎, 他
11. 第 95 回日本消化器病学会総会 2009 年 5 月 7 日 (木) ~ 9 日 (土) 北海道厚生年金会館、ロイトン札幌、京王プラザホテル札幌 「C 型肝炎に対する IFN 治療における免疫エフェクター細胞内シグナル伝達解析」(パネルディスカッション 6 C 型肝炎治療の最前線) 宮城琢也, 竹原徹郎, 他 「肝発癌過程における STAT5 の役割」(ワークショップ 4 肝細胞癌の予防) 法水 淳, 竹原徹郎, 他
12. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008 年 12 月 1 日 (月) ~ 3 日 (水) 京都 「NK cell expression of NKG2D is impaired in patients with chronic hepatitis C」Shimizu S, 「Immunotherapy with gamma poly-glutamic acid nanoparticles in mouse liver tumor」Yamaguchi S, Takehara T, et al.
13. The Liver Meeting 2008 October 31–November 4, 2008 San Francisco, Moscone West Convention Center 「EFFICACY OF THE IMMUNOTHERAPY WITH POLY γ -GLUTAMIC ACID NANOPARTICLES IN MOUSE LIVER TUMOR」Yamaguchi S, Takehara T, et al. 「EXPRESSION OF NKG2D ACTIVATING RECEPTOR ON NATURAL KILLER CELLS IN CHRONIC HEPATITIS C」Shimizu S, Takehara T, et al. 「ACTIVATED LIVER DENDRITIC CELLS ARE MORE IMMUNOGENIC THAN SPLEEN DENDRITIC CELLS AFTER α -GALCER TREATMENT」Sasakawa A, Takehara T, et al. 「SN38 INHIBITS SHEDDING OF MHC CLASS1-RELATED CHAIN A, A LIGAND OF NKG2D IMMUNORECEPTOR IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS」Kohga K, Takehara T, et al.
14. 肝疾患と代謝 2008 年 10 月 9 日 (木) 帝国ホテル大阪 「C 型肝炎・肝がんの自然免疫病態」(特別講演) 竹原徹郎
15. JDDW 2008 2008 年 10 月 1 日 (水) ~ 4 日 (土) グランドプリンスホテル新高輪、国際館パミール、グランドプリンスホテル高輪 「C 型肝炎に対するインターフェロン治療における免疫細胞内シグナル伝達解析による治療効果予測の可能性」(シンポジウム 14 C 型肝炎の近未来治療) 宮城琢也, 竹原徹郎, 他
16. 第 12 回九州肝不全研究会 2008 年 9 月 20 日 (土) ソラリア西鉄ホテル (博多) 「C 型肝炎における持続感染・発がん自然免疫病態」(教育講演) 竹原徹郎
17. 第 45 回日本消化器免疫学会総会 2008 年 7 月 3 日 (木) メルパルク京都 「C

型肝炎の病態と自然免疫」(イブニングセミナー) 竹原徹郎

18. 13th US-Japan GI & Liver Meeting in 21st Century June 13, 2008 Sheraton Miyako Hotel Tokyo Regulation of NKG2D immunoreceptor by soluble form of MHC class I-related chain A in hepatocellular carcinoma Takehara T
19. 第44回日本肝臓学会総会 2008年6月5日、6日 愛媛県民文化会館、愛媛看護研修センター(松山) 「SN38は肝癌細胞の可溶性NK活性リガンドの分泌を抑制しNK細胞感受性を増強させる」(ワークショップ3 肝の発癌と進展における分子代謝学的研究) 甲賀啓介, 竹原徹郎, 他 「IL-12遺伝子による肝臓NK細胞の活性化および転移性肝腫瘍の治療効果にはリンパ球からのIFN・の産生が重要である」植村彰夫, 竹原徹郎, 他 「皮下腫瘍担癌マウスにおける肝樹状細胞上CD1d分子発現低下による肝先天免疫の抑制」巽智秀, 竹原徹郎, 他 「肝先天免疫活性化による肝樹状細胞活性化機構の解析」笹川哲, 竹原徹郎, 他 「ウイルス感染モデルを用いたインターフェロンの免疫細胞内におけるシグナル伝達機構の制御メカニズムに関する基礎的検討」宮城琢也, 竹原徹郎, 他
20. 第44回日本肝癌研究会 2008年5月29日(木)、30日(金) 大阪国際会議場 「SN38は肝癌細胞のNK細胞感受性を増強させる」甲賀啓介, 竹原徹郎, 他
21. 第94回日本消化器病学会総会 2008年5月8日(木)~10日(土) 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡 「NK細胞による肝癌認識機構の分

子機序の解析と新規治療法の探索」(シンポジウム9 ウイルス肝炎・肝癌に対する生体防御) 竹原徹郎

[図書](計1件)

竹原徹郎. NK細胞による肝癌認識機構の分子機序の解析と新規治療法の探索. 消化器病学の進歩—原点から未来への情報発信—II. 肝胆膵領域. Pp88-92 編集 飯田三雄 発行 日本消化器病学会 (東京) 2009年7月1日

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹原徹郎 (TAKEHARA, TETSUO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 70335355

(2) 研究分担者

巽智秀 (TATSUMI, TOMOHIDE)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 20397699

(3) 連携研究者

なし