

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460984

研究課題名(和文) 肝癌発症予防を目的とした肝癌関連分子MICAの小分子核酸による発現制御法の開発

研究課題名(英文) MICA expression regulation by small nucleic acids to prevent HCC occurrence

研究代表者

佐藤 雅哉 (Sato, Masaya)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：30722665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：当研究者らは、ゲノムワイドアソシエーションスタディ(GWAS)解析で、1394例のC型肝炎罹患患者と5486例の非感染者のサンプルを用いてC型肝炎感染から肝臓癌を発生しやすい宿主因子としてMICA遺伝子上流に位置するSNPを同定し報告した(Nat Genet. 2011)。本研究ではmicroRNA25-106クラスターに由来するmicroRNAがMICA遺伝子の発現量を負に制御していることを同定した。また、CRISPR-Cas9系を用いてCas9にVP16の転写活性化ドメインを融合した蛋白を用いた遺伝子編集手法の応用によってMICA遺伝子座からの転写を10倍以上高めることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The investigators identified MICA gene as a susceptible gene to hepatocellular carcinoma by GWAS analyses using 1,394 HCV-related patients and 5,486 non-infected patients. In this study, MICA expression could be regulated by microRNA25-106b. Further, using CRISPR-Cas9 and Cas9-VP16 fusion construct, transcription of MICA mRNA could be augmented about 10 times. These results may lead to the regulation of MICA gene expression, which in turn result in the prevention of hepatocellular carcinoma occurrence.

研究分野：肝疾患の研究

キーワード：MICA 免疫療法 肝癌

## 1. 研究開始当初の背景

当研究者らは、臨床的にゲノムワイドアソシエーションスタディ(GWAS)解析にも参画し、1394例のC型肝炎罹患者と5486例の非感染者のサンプルを用いてC型肝炎感染から肝臓癌を発生しやすい宿主因子としてMICA遺伝子の3' UTRに位置するSNPを同定し報告した(*Nat Genet.* 2011)。この研究では、肝臓癌発症規定遺伝子MICAのSNPのrisk alleleを持つC型肝炎感染者は血清で測定したMICA蛋白の発現量が少ないことを報告している。すなわち、MICAは本来、C型肝炎ウイルス感染細胞あるいは肝臓のfociに高度に発現し、natural killer細胞やCD8+T細胞のレセプター(NKG2D)を活性化して感染細胞あるいは癌細胞の排除に向かわせる役割を担っていると考えられているリガンドであるものの、risk alleleを持つ人はこの発現が低くなることで感染細胞あるいは肝臓癌fociの排除が不全となり、結果的に肝臓癌を発症しやすくなっていると考えられる。

そもそも、当該SNPはMICA遺伝子のプロモーター部分に存在するものの、MICAタンパクの発現自体はすべてがその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microRNA(特にmicroRNA93-106クラスター)によるmRNA分解や翻訳抑制も極めて重要であることも示されている(*Nat Immunol* 2008 9 1065)。実際、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も報告されている。そこで、今回の申請研究では、研究分担者と協力して、GWASによって明らかにした肝臓癌発症感受性遺伝子MICAの結果と、すでに研究室で確立しているmiRNAの研究の手法を融合させ、miRNAによるMICAの発現調節法とその調節による肝臓癌に与える影響、および将来的な臨床応用を見据えたMICA発現増強法が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景のもと、

- 1) miRNA libraryによるMICA遺伝子を効率的に標的とするmiRNAの探索
- 2) 当該miRNAとそのアンチセンス核酸によるMICAタンパクの発現量の制御
- 3) MICAタンパクの発現調節によるNKG2Dとの相互作用の変化・in vivo cell killingによるMICAタンパク量の調節の肝臓癌細胞に及ぼす生物学的意義の検討
- 4) 他の方法でのMICA蛋白発現増強法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) MICA発現を制御するmiRNAの探索

MICA遺伝子を標的とするmiRNAの同定のため、

定法にしたがってMICA遺伝子の3'非翻訳領域(3' UTR)をFirefly luciferase遺伝子の下流に接続したレポーターを作製し、肝臓癌で発現の多いことがデータベース上で知られている100種のmiRNAを含んだmiRNA libraryを用いてスクリーニングアッセイを行う。Overexpressionによってluciferaseの発現を抑制したmiRNAについて、MICAの3' UTRのシーケンスを直接に標的とするかをinsilicoで検討し、miRNAの直接作用か、他の遺伝子発現の制御を介した間接的な作用かを塩基配列から類推する。その結果MICAの3' UTRに直接的に作用すると考えられるmiRNAをさらにピックアップし、それらが標的とする可能性のあるMICA 3' UTR内部の配列に変異を導入した変異レポーターを作製し、変異レポーターにはこれらのmiRNAの作用がないことを検証することによって、抽出したmiRNAがMICAの3' UTRに直接作用することを確認する。

### 2) miRNAによるMICAタンパク発現量制御とその生物学的意義のin vitro/in vivoでの検証

MICAは感染細胞や癌細胞で発現すると、NK細胞など免疫担当細胞が持つNKG2Dレセプターによって認識されMICAタンパクを表出している細胞の排除に働く。そこで、1)で同定したmiRNAあるいはそのアンチセンスの生物学的な効果の検証として、それらの核酸を導入した細胞とNKG2Dとの結合能の変化、および、miRNAあるいはそのアンチセンスを導入した癌細胞の免疫学的排除能の変化をマウスへの癌細胞の静注後の肺への定着率で検証する。具体的には、上記の核酸を導入した肝臓癌細胞株をリコンビナントタンパクとして精製したNKG2Dとin vitroで結合させ洗浄の後、NKG2Dに対する抗体を用いて肝臓癌細胞に結合したNKG2D量をFACSにて定量する。また、同様に小分子核酸を導入した肝臓癌細胞株を蛍光標識し、コントロールとしてHela細胞を別の蛍光ラベルで標識した後に等量を混合しマウス尾静脈から静注して6時間後の肺から細胞成分を回収後FACSにてそれぞれの蛍光を定量することで、in vivoにおけるcell killingの変化を検討する。

### 3) 遺伝子編集手法を応用したMICA遺伝子の転写増強法の開発

さらにMICA遺伝子の転写を増強する手法として遺伝子編集手法を改変したコンストラクトを用いてMICA promoter近傍に転写活性化因子を近づけることによってMICAの転写を増やす方法を検討する。

### 4) MICA蛋白のsheddingを抑制する化合物の探索

MICA蛋白は、翻訳後の修飾によってN端が切断された後細胞外に放出され、これがMICA蛋白のレセプターを飽和して病的細胞に発

現する MICA と免疫担当細胞に発現する MICA レセプターとの相互作用を減弱させる働きがある。これにより、MICA が発現する感染・病的細胞の免疫学的排除が阻害されるため、病的細胞の効率的な排除のためには、単純に MICA 蛋白の発現を増やすだけでなく翻訳後の切断を抑える必要がある。本研究では、MICA 蛋白の切断を阻害する化合物の簡便なスクリーニング法としてレポーターアッセイで検討できる系を確立し、化合物ライブラリースクリーニングによって切断阻害化合物を同定する。具体的には 1) MICA の N 端に nano-luciferase を連結したコンストラクトを樹立する。 2) 1) のコンストラクトを恒常的に発現する細胞を作製し、MICA shedding に関わる化合物を網羅的にスクリーニングする。 3) FACS により化合物投与での shedding 抑制による細胞膜表面の MICA タンパクの量の増強を確認する。

#### 4. 研究成果

##### 1) MICA 発現を制御する miRNA の探索

MICA 遺伝子は microRNA25-106 クラスタ (microRNA25, 93, 106b から構成されるクラスタ) によって標的とされることが in silico の解析から想定される (MICA 3' UTR には 2 か所以上のこれらの microRNA の標的配列がある)。microRNA25-106 クラスタはヒト染色体 7 番長腕上に位置し、ここから転写される microRNA はその発現を共にしていると考えられる。さらに microRNA25-106 のクラスタから発現してくる複数の microRNA が、塩基配列上、MICA mRNA の 3' UTR を同時に標的としうることが想定されることから、MICA 遺伝子の発現はそれらの microRNA によって制御を受けている可能性が非常に高い。そこで実際に microRNA25-106 クラスタに由来する microRNA が、想定通り MICA 遺伝子の発現量を負に制御しうること、培養肝癌細胞での microRNA25-106 クラスタの過剰発現系によって確認した。これに並行して、野生型と変異型のレポーター系を用いて MICA 3' UTR が microRNA25-106 クラスタに由来する microRNA の直接の標的になっていることを検証した。microRNA の個々の発現を見る系は広く用いられているが、複数の microRNA、特に生理的に挙動を共にしている可能性が高い複数の microRNA を同時に発現させる系は成体に起きている現象を近似し、より良い系と考えている。逆に、それぞれの microRNA に対する antisense をクラスタ状にクローニングして一度に発現させることによって、microRNA25-106 クラスタから発現する microRNA を一度に機能的にサイレンシングする。その場合、これまで microRNA によって発現が抑制されていた MICA の発現量が逆に増えることを確認した。

##### 2) miRNA による MICA タンパク発現量制御とその生物学的意義の in vitro/in vivo での

#### 確認

MICA は、NKG2D をレセプターとするリガンドであり、NKG2D は免疫担当細胞である NK 細胞・NKT 細胞や CD8+T 細胞表面に発現していることが知られている。生理的にはこれらの相互作用を介してこれら免疫細胞を賦活化し、その結果、MICA を発現している感染細胞や癌細胞の排除につながると考えられている。そこで、細胞表面上の MICA 発現を上記のように microRNA で調節した後、引き続き生理的変化としてそれらの細胞と NKG2D との結合量が変化するかを in vitro の binding assay にて検証する。具体的には、MICA 遺伝子の発現量を microRNA で調節した細胞と recombinant で作製した NKG2D と human IgG1 Fc 領域のキメラ蛋白を反応させフローサイトメトリーで結合量を観察したところ、microRNA による MICA 発現量の制御が、物理的なりガンド・レセプター結合量も変化させることを確認した。

次に、microRNA クラスタによって MICA 遺伝子の発現量を調節した肝癌細胞株と、コントロールとして HeLa 細胞を別々の色素でラベルした後、マウスの尾静脈から同数注射し、一定時間後の肺組織からこれらの細胞を回収しフローサイトメトリーでコントロールの HeLa 細胞数に対する MICA 遺伝子発現量を調節した肝癌細胞数を検証する。これによって MICA 遺伝子の発現量調節が、in vivo で実際に免疫系を介した殺細胞効果まで帰結することを意味する。

##### 3) 遺伝子編集手法を応用した MICA 遺伝子の転写増強法の開発

CRISPR-Cas9 系を用いて Cas9 に VP16 の転写活性化ドメインを融合した蛋白を、guideRNA として MICA promoter 上流 100bp 程度のところに設計することにより、MICA の転写量は 10 倍程度増強した。この方法はデリバリーの問題がまだあるが、将来的には任意の遺伝子の発現量をコントロールできるとつながると考えられる。

##### 4) MICA 蛋白の shedding を抑制する化合物の探索

1) MICA タンパクは N 端側の細胞外ドメインが切断され soluble MICA として細胞外に分泌される。そこで MICA の N 端側に luciferase reporter 遺伝子を連結した融合蛋白を作るコンストラクトを作製した。その際、MICA 本来の高次構造や機能を損なわないように、luciferase の中でも最も小さい nano-luciferase (約 20kDa 程度) を用いた。2) 1,280 種の化合物ライブラリーを用いて、MICA の shedding 阻害剤をスクリーニングした結果、molsidomine, metergolin で軽度の shedding 抑制作用があることを見出した。3) その効果を細胞表面の MICA 蛋白量の変化で確認した。

これらの検討から、標的細胞の MICA 蛋白の発現量を増やし、さらに shedding を阻害することで細胞表面に表出する MICA 蛋白を増やすことができれば NK 細胞を介した免疫療法の効果増強につながると考えられる。

#### 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6件)

1. Sekiba K, Yamagami M, Otsuka M, Suzuki T, Kishikawa T, Ishibashi R, Ohno M, Sato M, Koike K. Transcriptional activation of the MICA gene with an engineered CRISPR-Cas9 system. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;486(2):521-525.
2. Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Sato M, Koike K. Development of a screening method to identify regulators of MICA shedding. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(4):764-8.
3. Kishikawa T, Otsuka M, Tan PS, Ohno M, Sun X, Yoshikawa T, Shibata C, Takata A, Kojima K, Takehana K, Ohishi M, Ota S, Noyama T, Kondo Y, Sato M, Soga T, Hoshida Y, Koike K. Decreased miR122 in hepatocellular carcinoma leads to chemoresistance with increased arginine. *Oncotarget.* 2015;6(10):8339-52.
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(14):5581-90.
5. 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.* 2014;44(10):E137-44.
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. 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(4):748-54.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/225kenncrna/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤雅哉 (SATO, Masaya)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：30722665

(2)研究分担者

大塚 基之 (OTSUKA, Motoyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90518945