

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860497

研究課題名(和文) 抗MICA抗体による抗体関連型拒絶反応を応用した肝細胞癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new therapy for the hepatocellular carcinoma by the antibody-related model rejection due to the antiMICA antibody

研究代表者

上村 博輝 (Kamimura, Hiroteru)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助手

研究者番号：40706420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肝炎由来の肝細胞癌発癌症例について、MICAの発現を確認し、保存血清を利用して抗MICA抗体の測定をLABScreen MICA Single Antigen testsを行った。また血清対応型SSOでHLAタイピング検査を行ったが自己アリルとは同一のものが存在しなかった。抗MICA抗体については抗腫瘍抗体として出現した自己抗体ではない可能性が考慮された。

抗MICA抗体測定と同時に行ったsMICAに関してはB型慢性肝炎については核酸アナログ導入前後のsMICAの濃度は多変量解析によりHCC発癌と関連する最も有意な因子であり、核酸アナログ導入後の発癌予測マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is investigating the possibility of anti-MICA antibody being self antibody as the anti cancer antibody as hepatocellular carcinoma.

We performed revelation of MICA and measured the anti-MICA antibody for LABScreen MICA Single Antigen tests from the plasma from chronic hepatitis origin, hepatocellular carcinoma. Moreover, although the HLA typing inspection was conducted by type SSO corresponding to serum, the same thing as self-allele did not exist. About the anti-MICA antibody, possibility that it was not the self-antibody which appeared as an antitumor antibody was taken into consideration. We performed the concentration of sMICA simultaneously with anti-MICA antibody measurement. It has become apparent that the concentration of sMICA would serve as a carcinogenic prediction marker after nucleotide analogue medication by multivariate studies.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：B型慢性肝炎 肝細胞癌 sMICA 抗MICA抗体

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma; HCC) は再発を繰り返して進行するため、治療の進歩にも関わらず依然として全世界の主要死因の一つであり、現在も新規治療法の開発が求められている。HCC 再発には原発巣からの転移による肝内転移と慢性肝炎・肝硬変に伴う高癌化状態に基づく多中心性発癌の2種類があるが、腫瘍細胞自体の悪性度に加えて腫瘍細胞に対する免疫応答低下が再発に関連することを申請者らは報告した<sup>1)</sup>。

Natural killer group 2 member D (NKG2D) は natural killer (NK) 細胞の活性化に中心的な役割を果たすレセプターであり、そのリガンド (NKG2DL) は感染や酸化ストレス、腫瘍化などにより発現が誘導され、NK 細胞による自己由来の異常細胞の認識と排除に大きな役割を果たしている。NKG2DL としてヒトでは MHC class I-related chain A and B (MICA/B) と UL16-binding protein (ULBP) 1~4 が同定されている(図1)<sup>2)</sup>。

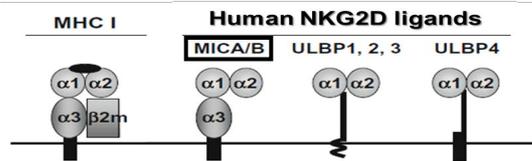


図1. ヒトNKG2Dリガンドの構造<sup>2)</sup>

NKG2DL に関しては細胞表面での発現のみでなく、細胞膜より切断された可溶性NKG2DL (soluble MICA : sMICA) が分泌され、NK 細胞におけるNKG2Dからの活性化シグナル伝達を抑制することで腫瘍免疫に抑制的に働くことが解明されている。腎移植、肝移植後に測定されることが多い、抗MICA抗体は、腫瘍細胞に対する液性免疫応答として現在注目されている natural autoantibodies (NAAs) の可能性があるが、臓器移植の分野では、移植臓器に表出したMICAに対する抗MICA抗体の産生が、ドナー特異的抗HLA抗体と同様に臓器移植後の液性拒絶反応に関与する重要な因子であることがすでに明らかにされている。しかしながら、抗MICA抗体の出現や液性免疫の作用が、自然免疫担当細胞が豊富な肝臓内における肝癌細胞に対する免疫応答、特にNK細胞機能にどのように影響するかについては未だに明らかにされていない。このような肝細胞癌に対する免疫応答、特に液性免疫応答の解明にはMICA、sMICA、抗MICA抗体の相互作用の検討が必須であるが(図2)、抗MICA抗体は肝癌細胞や腫瘍血管内皮細胞に発現しているMICAへ結合し、NK細胞やマクロファージなどのエフェクター細胞を介した抗体依存性細胞障害反応 (antibody-dependent cellular cytotoxicity:ADCC) や補体依存性細胞障害反応 (complement-dependent cellular cytotoxicity: CDC) を惹起すると予想される

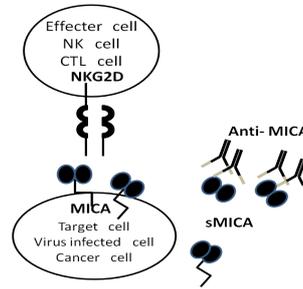


図2. MICA, sMICA, 抗MICA抗体の出現

ものの、補体関連レセプター

などを含めた抑制免疫監視機構の中心的役割を担う natural killer (NK) 細胞が肝臓には多く局在し、ウイルス感染肝細胞や腫瘍血管内皮細胞には種々のNK細胞活性化リガンド (NKG2DL) が発現しているにもかかわらず、肝細胞癌に対する免疫監視は機能せず再発を繰り返して進行する。申請者はこれまでにNKG2DLに対する肝細胞癌での発現を調べ、肝癌 cell line においてプロテアソーム阻害剤や Histone Deacetylase (HDAC) による発現調整も行っている。その後NKG2DLの代表格であるMICAはGWAS解析で肝癌のリスクのSNPの一つとして報告され、MICAリガンドは通常の肝細胞では発現しておらずウイルス感染肝細胞や肝細胞癌で表出されるため、腫瘍関連抗原 (TAA) としての要素をもつ可能性がある。肝細胞癌症例について検体を蓄積していくなかで肝癌自然消退例について液性免疫が関与している可能性がある症例を経験した。腎移植領域においてはドナー腎が移植された際にMICAに対するレシピエント側の抗MICA抗体のモニタリングを行うなど、液性免疫機序による抗体関連拒絶で抗MICA抗体が抗HLA抗体に次ぐ因子とされているため、肝細胞癌と抗MICA抗体出現による液性免疫の関与について検討を行うこととした。

2. 研究の目的

ウイルス性慢性肝炎・肝硬変と肝細胞癌におけるMICAリガンドと可溶性MICA (sMICA) と抗MICA抗体の出現頻度を明らかにし、特に肝細胞癌症例においてはsMICAや抗MICA抗体出現と肝細胞癌の生物学的悪性度や治療後再発頻度を含む予後との相関などを臨床病理学的に明らかにする。また自己免疫性肝炎の際に生じる抗HLAclass抗体と自己アレルと同一かどうかも検討中であり、肝癌症例においても抗MICA抗体が出現した際に自己アレルの同一性の確認を行う。

3. 研究の方法

- (1) 慢性肝炎と肝細胞癌症例のMICAの出現  
主にウイルス性肝炎、肝硬変、肝細胞癌症例のMICAの表出を肝生検検体、手術検体による免疫染色により観察した。
- (2) 血清中sMICAの測定  
肝細胞膜より切断され測定できるようになったsMICAはELISA法により測定した。

(3) 抗 MICA 抗体 の測定  
sMICA を測定できた症例について抗 MICA 抗体について Luminex 法により定量した。

(4) MICA allele の DNA タイピング  
抗 MICA 抗体が検出され、かつ同意が得られた患者より抽出した全血 DNA を利用して、MICA allele の DNA タイピングを実施して、Luminex 法により確認した。抗 MICA 抗体の allele が本人由来の MICA allele に対する抗体であるか、つまり自己抗体であるかどうかを検証した。

(5) 動物モデルを用いた抗体投与や薬剤投与による抗腫瘍効果増強作用の検討  
マウスへ移植可能な膵癌株として AsPC-1 を用い、癌腹膜播種モデルマウスを形成し抗腫瘍抗体の出現を確認した。  
この研究はすでに本大学の倫理委員会より承認されている。(承認番号 500)

#### 4. 研究成果

(1) 70 例の肝癌手術検体を用いて MICA リガンドの出現について免疫染色を行ったところ、12 症例に MICA の発現を認めることができた。自然消退した肝細胞癌については血管内皮細胞での染色性を強く認めた。(図3) 肝生検検体については染色性が不明瞭であったため肝炎についてはデータをまとめられなかったが、肝細胞癌の背景肝である肝硬変については 10 例について細胞質での染色を認めた。

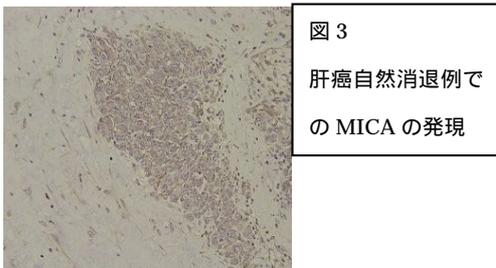


図3  
肝癌自然消退例での MICA の発現

(2) sMICA については血清(保存血清を含む)を用いて ELISA 測定を行いコントロール群 5 例(疾患なし)  $36.0 \pm 7.3$  pg/ml, 慢性肝炎 10 例(C 型肝炎)  $232.7 \pm 157$  pg/ml, 肝細胞癌 8 例(B 型肝炎由来)  $95.4 \pm 36.7$  pg/ml, 肝細胞癌 20 例(C 型肝炎由来)  $300 \pm 203$  pg/ml と control と比較して肝疾患をもつ場合に、報告通りに sMICA の上昇を認めたが今回の検討では B 型肝炎由来の肝細胞癌では C 型肝炎由来のものと比較して sMICA 血中濃度が有意に低かった。(図4)

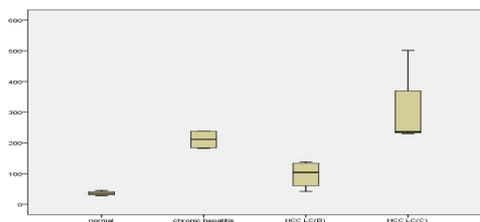


図4 各疾患毎の sMICA 濃度

(3) 抗 MICA 抗体については 60 例の検討を行い、出現を認めたものは C 型肝炎由来の肝細胞癌の 10 例であった。自然消退例を 1 例含んでおりこれは TAA として出現した MICA に対する抗体の関与による抗体依存性細胞性細胞障害(ADCC)の関与の可能性を考慮した。

(4) 抗 MICA 抗体を持つ 10 症例のうちでアレルを測定できた症例は 2014 年 5 月時点で 6 例であったが自己のアレルとは異なるアレルであった。(女性 1 名, 輸血, 輸注は 1 例)

(5) モノクローナル抗体の精製

マウスへ移植可能な膵癌株として AsPC-1 を用い、癌腹膜播種モデルマウスを形成し抗腫瘍抗体の出現を確認した。(図5) 腹水が形成された後に開腹してマウスの脾臓と腹水を採取し、腹水については癌細胞と蛋白分画を分離した。脾臓細胞とミエローマ細胞株を PEG により細胞融合させ、ハイブリドーマクローンを得た。そのハイブリドーマをモノクローナル抗体精製用培地(HAT 培地)で生育して、抽出したモノクローナル抗体を精製した腹水中癌細胞もしくは腹膜播種結節より取り出した癌細胞と IL-2 刺激後に反応させ、抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)については LDH release 活性を測定した。ハイブリドーマの選択までにかかなりの技術と時間を要した。今後は委託することも考慮している。



図5 マウスよりの抗体産生の確認

#### <引用文献>

- 1) Kamimura H, Yamagiwa S, et al. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. J Hepatol. 2012;56:381-8.
- 2) Yamagiwa S, Kamimura H, et al. Natural killer cell receptors and their ligands in liver diseases. Med Mol Morphol. 2009;42:1-8.

#### 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)

Kamimura H, Yamagiwa S, Takamura M, Iwasaki T, Hayashi K, Hirose S, Ogata N, Aoyagi Y. Efficacy of cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy

for malignant ascites. Biomed Res (in press) (査読有)

Kamimura K, Abe H, Kawai H, Kamimura H, Kobayashi Y, Nomoto M, Aoyagi Y, Terai S. Advances in understanding and treating liver diseases during pregnancy. World J Gastroenterol. 2015 May 7; 21(17):5183-90. doi:10.3748/wjg.v21.i17.5183. (査読有)

Kanefuji T, Takano T, Suda T, Akazawa K, Yokoo T, Kamimura H, Kamimura K, Tsuchiya A, Takamura M, Kawai H, Yamagiwa S, Aoyama H, Nomoto M, Terai S. Factors predicting aggressiveness of non-hypervascular hepatic nodules detected on hepatobiliary phase of gadolinium ethoxybenzyl diethylene-triamine-pentaacetic-acid magnetic resonance imaging. World J Gastroenterol. 2015 Apr 21; 21(15):4583-91. doi: 10.3748/wjg.v21.i15.4583. (査読有)

Yamagiwa S, Kamimura H, Takamura M, Genda T, Ichida T, Nomoto M, Aoyagi Y. Presence of antibodies against self human leukocyte antigen class II molecules in autoimmune hepatitis. Int J Med Sci. 2014 Jun 8; 11(9):850-6. doi:10.7150/ijms.8633. (査読有)

Yamagiwa S, Sato Y, Ichida T, Setsu T, Tominaga K, Kamimura H, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Aoyagi Y. Imbalance between CD56+bright and CD56+dim natural killer cell subsets in the liver of patients with recurrent hepatitis C after liver transplantation. Biomed Res. 2014; 35(3):177-84. PubMed PMID:24942856. (査読有)

Takamura M, Kanefuji T, Suda T, Yokoo T, Kamimura H, Tsuchiya A, Kamimura K, Tamura Y, Igarashi M, Kawai H, Yamagiwa S, Nomoto M, Aoyagi Y. Value of shear wave

velocity measurements for the risk assessment of hepatocellular carcinoma development in patients with nonalcoholic fatty liver disease : HCC risk assessment by VTTQ. Hepatol Int. 2014 Apr; 8(2):240-9. doi:10.1007/s12072-014-9517-9. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

1. 上村博輝, 山際訓, 寺井崇二. B型肝炎における核酸アナログ投与後の発癌因子とキャリアにおける水平感染リスクの評価. 第23回肝臓学会大会(2015年10月9日 グランドプリンスホテル新高輪 東京都品川区)
2. 上村博輝, 山際訓, 寺井崇二. 当科に難治性腹水症例に対する治療戦略. 第22回日本門脈圧亢進学会(2015年9月11日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市)
3. 上村博輝, 山際訓, 寺井崇二. Serial biopsy を施行した急性肝不全症例. 第41回急性肝不全研究会(2015年5月20日 ホテル日航熊本 熊本県熊本市)
4. 癌性腹水における腫瘍免疫の動態の解明. 上村博輝, 山際訓, 青柳豊. 日本消化器病学会 第54回甲信越支部例会 (2014年5月24日 新潟日報メディアシップ 新潟県新潟市)

〔図書〕計3件

上村博輝, 寺井崇二 他、メディカルレビュー社、日常診療にいかず診療ガイドライン 2016 - 2017 Up-to date, 2016, 960

上村博輝 寺井崇二 他、成人病と生活習慣病、東京医学社、2016, 140

上村博輝 寺井崇二 他、医薬ジャーナル社、肝臓癌の画像診断、2015, 56

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 博輝 (Kamimura Hiroteru)

新潟大学医歯学総合研究科 特任助手

研究者番号: 40706420