

令和 2 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09405

研究課題名(和文) MICA蛋白の翻訳後修飾の分子機構解明による抗腫瘍免疫活性の増強

研究課題名(英文) Enhancement of anti-tumor immunity by post-translational modification of MICA

研究代表者

佐藤 雅哉 (Sato, Masaya)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30722665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：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 upstream の一塩基多型を以前に報告した。その際、肝臓癌になりやすい人はMICAの発現量が少ない(癌になっても腫瘍免疫を惹起することが出来ない)ことが推定された。しかし、MICAの発現制御は、転写レベルだけではなく、転写・翻訳語の切断による癌細胞表面からの離脱も挙げられる。本研究では、MICA蛋白の切断離脱を阻害する化合物を蛋白分解酵素阻害剤ライブラリーからFAAH阻害剤にその作用があることを同定した。FAAH阻害剤はTIMP3発現増強を介してMICA蛋白の切断を阻害した。この結果を応用すると腫瘍免疫の増強につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、肝臓癌に関与する遺伝子であることが以前に同定されている自然免疫関連分子であるMICAの癌細胞表面からの切断分泌を阻害する化合物を同定できた。MICA蛋白は癌細胞表面に表出されると "eat-me signal" として作用し、免疫応答を惹起するトリガーとなるが、癌細胞ではMICA蛋白を切断して上清に分泌させてしまう機能がある。本研究によってFAAH阻害剤がMICA蛋白の切断を阻害し、癌細胞表面に表出されたMICA蛋白の量を維持する機能があることが判明した。この知見を応用すれば、癌免疫を増強し、発がん抑制や癌治療の増強につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：A single nucleotide polymorphism at the upstream of MICA gene is associated with the susceptibility of hepatocellular carcinogenesis. The SNP is associated with the MICA transcriptional levels, which are linked with the activity of anti-tumor immunity. However, the regulation of MICA on the cancer cell surface is not only dependent on the transcriptin but on the post-trasnlational modification, that is, the cleavage of MICA from the cell surface into the supernatant. In this study, from the library scree, FAAH inhibitor was identified as an inhibitor of MICA cleavage. FAAH inhibitor enhanced TIMP3 expression, which in turn inhibited the MICA shedding. FAAH inhibitor may be useful for the enhancement of anti-tumor immunity through MICA expression on the cancer cell surface.

研究分野：肝臓

キーワード：腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

臨床的なゲノムワイドアソシエーションスタディ(GWAS)解析の結果、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遺伝子上流に位置する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癌の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た。

上記SNPはMICA遺伝子のプロモーター部分に存在しMICAの転写量を調節していると考えられるが、そもそも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、それまで代表者は、基盤研究(C)のサポートのもと、研究分担者と協力して、GWASによって明らかにした肝臓癌感受性遺伝子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てmiRNA関連核酸の肝細胞への特異的デリバリー法を開発し、それによって臨床応用可能な小分子核酸を用いた肝臓癌発症の予防法および治療法を、共同研究者と協力して創造することを目的とした検討を続けてきた(*Sci Rep.* 2013, *Oncotarget.* 2014, *Biochem Biophys Res Commun.* 2015)。

具体的には1) miRNA libraryを用いたMICA遺伝子を効率的に標的としうるmiRNAの探索(*Sci Rep.* 2013)、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(*Oncotarget.* 2014)、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(*Oncotarget.* 2014)を報告した。これらの結果を用いることで、肝臓癌細胞においてMICA蛋白の発現を増やすことにより、NKG2Dを介したNK細胞による抗腫瘍細胞効果を高めることが期待された。

しかしながら、MICA蛋白は細胞表面に表出する際にsheddingを受け、細胞外に分泌されるという翻訳後修飾の過程が存在する。細胞外に分泌されたMICAは、それ自身がNKG2Dと結合してレセプターを占拠し、癌細胞表面にとどまる本来のMICA蛋白に対するdecoyとして働き、本来のMICAの機能を阻害する結果となる。従って、MICA蛋白を介したNK細胞による殺がん細胞効果を高めるためには、MICA蛋白の発現量を増やすだけでは不十分であり、さらに、sheddingを効率的に抑制することが求められていた。

## 2. 研究の目的

上記のごとく、本申請では、1) MICA蛋白のsheddingの分子機構の解明と2) それを抑制する小分子化合物の探索、3) さらにその抗腫瘍効果の検定を行ってMICAとNKG2Dを持つリンパ球との相互作用による「抗腫瘍免疫の増強」を図ることを目的とした。

そこで、

1) MICAのshedding状態を簡便にモニターできるスクリーニング系の確立

2) 1)の系と、小分子化合物ライブラリーを用いたMICA sheddingを抑える化合物の同定

3) その化合物の作用機構の解析によるMICA sheddingの分子機構の解明

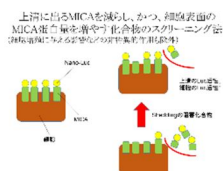
を骨子とした研究目的を定め、これらの結果に基づいた臨床応用を見据えた抗肝臓癌免疫療法の開発につながる研究を進めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MICAのshedding状況を簡便にスクリーニングする系の確立

MICAのsheddingには、細胞内のproteaseであるADAM10(A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein10)やADAM17といった切断酵素が関与し

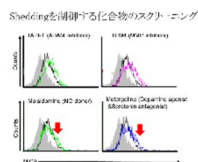
ていることが報告はされているが、明確な作用機構は不明でありかつその作用を検証するとそれほど強いとはいえない。そこで新たに、MICA の shedding 状況を簡便にスクリーニングできる系として MICA 蛋白の N 末端に nano-luciferase (nano-Luc) を融合させて発現できるコンストラクトを作製し、それを用いて、MICA の shedding 状態を変えうる状況を探る。実際には、このコンストラクト作成は既に済んでおり、系が機能することは確認済みである。この系では、刺激を添加後に、上清の luciferase 値と cell lysate の luciferase 値の両者を測定し、「上清の luciferase 値が下がり」かつ「cell lysate の luciferase 値が上がっているもの」を、「MICA の shedding が減った候補」として捉えることができる。すなわち、上清と cell lysate の両者の luciferase 値を測定することによって、例えば細胞死など非特異的な影響で luciferase の値が下がった場合を排除でき、真に shedding のみ抑える候補を抽出できるメリットがある(下図)。



左図のように、細胞内外の luciferase 活性を測定することで、非特異的な変化を除外し、真に細胞外分泌量が変化した場合をとらえることができる。

### (2) MICA の shedding を阻害する化合物の探索

この系を用いて、市販の化合物ライブラリーを用いて小規模のスクリーニングを行ったところ、約 1,000 種の化合物のうち、shedding を抑制しうる可能性のある 3 つの化合物を同定しえた。しかしながら、それぞれの作用は、もともと知られているプロテアーゼの ADAM10 の作用よりも、やや弱いものであった(下図)。



左図のように、ADAM inhibitor と同等かそれよりも弱い shedding 抑制作用を持つ化合物が 3 種取得できたが、応用のためにはもう少し強く抑制する化合物が欲しい。

### (3) その化合物の作用機構の解析による MICA shedding の分子機構の解明

(2) で同定した化合物の MICA shedding に与える機能の作用機序について、分子生物学的に検討する。その作用機序に基づいて、さらに最適な MICA shedding 抑制作用のある化合物の探索をすすめる。

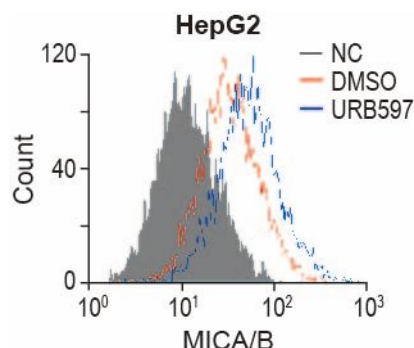
## 4. 研究成果

### (1) MICA の shedding 状況を簡便にスクリーニングする系の確立

本研究では、nano-Luc-MICA の系を用いて MICA の shedding 状態を luciferase 活性で簡便に測定できる系を確立した。すなわち、MICA 蛋白の N 端側に nano-Luc を融合させて、MICA が切断された場合に上清に nano-Luc が放出され、上清を用いた luciferase 活性の値が高く出ることによって MICA が shedding されていることが推定できる。コントロールとして、その際の細胞溶解液中の luciferase の値が低くなっていれば shedding が増えていることをさらにサポートする結果となる。

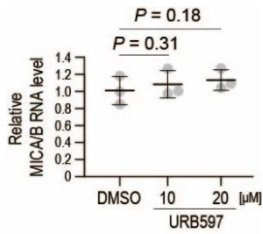
### (2) MICA の shedding を阻害する化合物の探索

(1) の系を用いて、53 種類の蛋白分解酵素阻害剤を含む化合物ライブラリーで MICA/B の shedding が減る化合物を探索した。その結果、FAAH 阻害剤である URB597 が最も再現性高く強い効果を得ることが判明した。この項からは HepG2 だけでなく、Hep3B でも認められた。URB597 添加後の FACS で細胞表面の MICA の発現量を確認すると再現性をもって増えているため、これも MICA/B の shedding を阻害していることをサポートする結果となった。



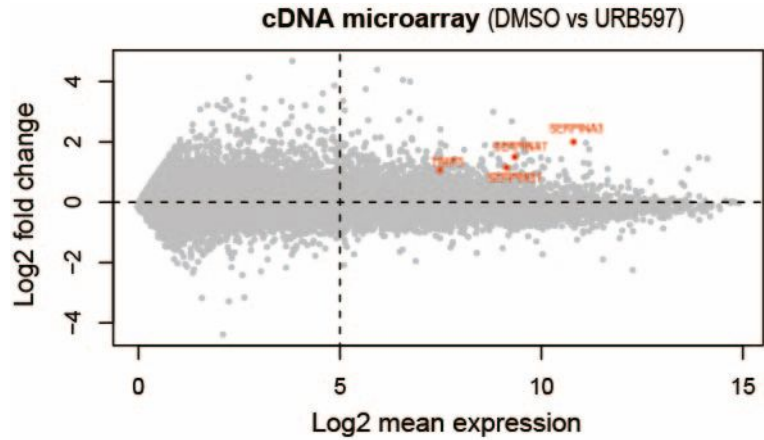
### (3) その化合物の作用機構の解析による MICA shedding の分子機構の解明

そこで、URB597 による MICA shedding の阻害作用についての分子機構を解明することとした。まず、URB597 による MICA mRNA 量の変化を RT-qPCR にて確認した。その結果、mRNA 量には変化が無く、つまり、MICA の転写に影響を与えていないのではない、ということが確認された(次頁)。次に、URB597 が MICA の shedding に直接的に作用しているのか、間接的に作用しているのかを

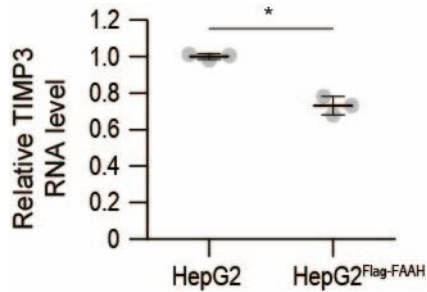


検討するため、In vitroで recombinant MICA 蛋白と細胞溶解液を混合することによる MICA の切断を見る系を立ち上げ、そこに URB597 を作用させた。その結果、MICA 蛋白は切断されていることが示唆されたため、URB597 の効果は、直接作用ではなく、転写を介することが示唆された。

そこで、URB597 が作用された後の遺伝子発現変化を検討したところ、cDNA array で TIMP3 の発現が増えていることが示された。TIMP3 を shRNA でノックダウンしたところ、URB597 の MICA shedding 阻害作用はキャンセルされたため、TIMP3 の発現を介して、その作用がもたらされていることが示唆された。



いっぽうで、URB597 は FAAH 阻害剤ではあるが、ほんとうに FAAH に依存しているかの確認のため、FAAH の過剰発現系を作成したところ、やはり MICA の shedding を増すことが示された。すなわち、FAAH は TIMP3 の発現を介して MICA の shedding を促進していることが示唆された。



FAAH はカンナビノイドレセプターのリガンドであるアナンダマイドを分解する酵素であるが、なぜこの作用が TIMP3 の発現を亢進させるのかは現時点では不明である。しかし、ここでみられた効果を鑑みると、URB597 は新たな免疫療法のサポートに用いることができる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Seimiya Takahiro, Otsuka Motoyuki, Iwata Takuma, Tanaka Eri, Suzuki Tatsunori, Sekiba Kazuma, Yamagami Mari, Ishibashi Rei, Koike Kazuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Inflammation and de-differentiation in pancreatic carcinogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Clinical Cases	6. 最初と最後の頁 882 ~ 891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12998/wjcc.v6.i15.882	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamagami Mari, Otsuka Motoyuki, Kishikawa Takahiro, Sekiba Kazuma, Seimiya Takahiro, Tanaka Eri, Suzuki Tatsunori, Ishibashi Rei, Ohno Motoko, Koike Kazuhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 ISGF3 with reduced phosphorylation is associated with constitutive expression of interferon-induced genes in aging cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 npj Aging and Mechanisms of Disease	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41514-018-0030-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sekiba Kazuma, Otsuka Motoyuki, Ohno Motoko, Yamagami Mari, Kishikawa Takahiro, Suzuki Tatsunori, Ishibashi Rei, Seimiya Takahiro, Tanaka Eri, Koike Kazuhiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Inhibition of HBV Transcription From cccDNA With Nitazoxanide by Targeting the HBx?DDB1 Interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 297 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2018.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sekiba Kazuma, Yamagami Mari, Otsuka Motoyuki, Suzuki Tatsunori, Kishikawa Takahiro, Ishibashi Rei, Ohno Motoko, Sato Masaya, Koike Kazuhiko	4. 巻 486
2. 論文標題 Transcriptional activation of the MICA gene with an engineered CRISPR-Cas9 system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 521 ~ 525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.03.076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Masaya, Tateishi Ryosuke, Yasunaga Hideo, Matsui Hiroki, Horiguchi Hiromasa, Fushimi Kiyohide, Koike Kazuhiko	4. 巻 32
2. 論文標題 Mortality and hemorrhagic complications associated with radiofrequency ablation for treatment of hepatocellular carcinoma in patients on hemodialysis for end-stage renal disease: A nationwide survey	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol	6. 最初と最後の頁 1873 ~ 1878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.13780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大塚 基之 (OTSUKA MOTOYUKI) (90518945)	東京大学・医学部附属病院・講師  (12601)	