

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07996

研究課題名(和文) B型肝炎制御におけるNKG2Dリガンドの役割とHBVによる回避機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of NKG2D ligands in HBV-related hepatocellular carcinoma

研究代表者

室山 良介 (Ryosuke, MUROYAMA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50549459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎組織のRNA-seqデータを用いて、遺伝子発現変動について網羅的解析を行ったところ、癌部にてMICA、MICBの発現上昇が認められた。また、肝癌組織ではプロモーター領域の脱メチル化が多く認められ、immune responseに関連する遺伝子に対するDNAメチル化異常が肝癌に関与していることが示唆された。次に、完全長、N端欠如のMICAを肝癌細胞株内で発現させ、培養上清中のMICAを定量したところ、N端欠如のMICAはほとんど検出されず、完全長のMICAとは細胞中の動態が異なっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルス(HBV)感染による肝発癌、すなわちB型肝炎に対する有効な治療法の開発は、肝臓病学において、克服すべき最重要課題の1つである。本研究により、B型肝炎組織において、NKG2Dリガンドに属するMICA、MICBの発現上昇が認められ、「NKG2Dリガンド-NK細胞」を含む自然免疫システムに属する遺伝子群の発現変動が起こっていることが明らかとなった。このことは、「NKG2Dリガンド-NK細胞」という自然免疫システムを強化することでB型肝炎を制御する、すなわちB型肝炎に対する新規の免疫療法の開発につながる重要な知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using RNA-seq data from in HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC) tissue, we investigated differentially expressed genes, and found that MICA and MICB expression level is up-regulated. In DNA methylation analysis, the promoter region of genes was generally hypo-methylated in HCC tissue, and the abnormal DNA methylation in genes associated with immune response was suggested to be hepatocarcinogenesis. We constructed vectors expressing full-length MICA and N-MICA (MICA with with a truncation at the N-terminus). After introducing them into hepatoma cell line, we measured the expression level of soluble full-length MICA and N-MICA in supernatant of cell culture using ELISA, and found that the N-MICA expression was almost undetected. This results was suggested that the dynamics in liver cells between them was completely different.

研究分野：消化器内科学

キーワード：B型肝炎ウイルス 肝細胞癌 自然免疫システム NKG2Dリガンド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) 感染者は、世界で2億4千万人以上にも及び、慢性肝炎・肝硬変・肝癌の主要な病原因子の1つである。肝癌は我が国の癌死の第4位に位置し、年間3万人を超える人々が肝癌で死亡しており、そのうちの約20%にHBVが関与しているとされる。現在、B型肝炎の治療において、臨床では核酸アナログ製剤が広く用いられており、肝炎の沈静化において良好な成績を上げている。しかしながら、核酸アナログ製剤の投与だけでは、肝癌の発生を1/2から1/4程度にしか抑えることができず、我が国において未だに多くの発現を認めるのが現状である。

近年、一塩基多型を足がかりとするゲノムワイド関連解析 (GWAS) が世界中で行われ、種々の疾患における感受性遺伝子が報告されてきた。実際に、我々もC型肝炎を対象としたGWASを行い、MICA (MHC class polypeptide-related sequence A) 遺伝子を疾患感受性遺伝子として世界で初めて同定し、報告した<sup>1</sup>。また、MICAはC型肝炎のみならず、B型肝炎の感受性遺伝子でもあった<sup>2</sup>。

MICAは「NKG2Dリガンド・ファミリー」に属し、細胞にウイルス感染やDNA損傷、癌化などのストレスが生じた際に、細胞表面に発現が誘導され、それを認識するNatural killer細胞 (NK細胞) によって体内から排除されるという自然免疫システムの一部を担っている分子である。実際に、我々はB型肝炎由来の細胞株を用いた検討にて、膜型のMICA発現を誘導することにより、NK細胞の細胞傷害活性が上昇することを確認している<sup>3</sup>。また、膜型のNKG2Dリガンドの一部はADAM9/10、MMP9などのシェダーゼにより切断され、可溶型のNKG2Dリガンドとして血中に放出されることが知られており、種々の癌細胞は膜型のNKG2Dリガンドを積極的に切断することによって、NK細胞からの攻撃を回避しているものと考えられている。

以上のように、B型肝炎において「NKG2Dリガンド-NK細胞」という自然免疫システムの役割は非常に重要であり、加えてHBVはNKG2Dリガンドの発現変化を介して、その自然免疫システムを回避する能力を有しているものと考えられる。しかしながら現時点では、B型肝炎において自然免疫システムが果たす詳細な役割や、その回避機構が十分に解明されているとは言い難い。

### 2. 研究の目的

本研究では、B型肝炎におけるNKG2Dリガンドを介した自然免疫システムの役割を検討し、かつHBVが有する回避機構を解明することを目的とする。

本研究は、「NKG2Dリガンド-NK細胞」という自然免疫システムを強化することでB型肝炎を制御する、すなわちB型肝炎に対する新規の免疫療法の開発につながる重要な知見が得られる研究であると考えられる。

### 3. 研究の方法

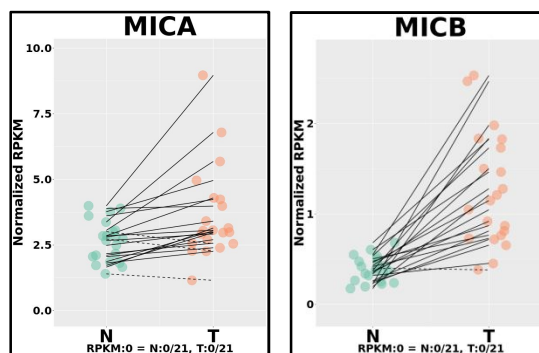
RNA-seqデータを用いて、B型肝炎組織における遺伝子発現変化を網羅的に検討し、B型肝炎における自然免疫システムの役割の解明を試みる。また、NKG2Dリガンドの発現量を検討することにより、NKG2Dリガンド・ファミリーに属する分子のうち、どの分子がB型肝炎に対する自然免疫システムにおいて重要な役割を果たしているのかを明らかにする。

MICAにはいくつかのVariantが存在しているため、それらを発現する発現ベクターを構築して肝癌細胞株に導入し、翻訳後修飾や細胞内動態につき、ウェスタンブロットやELISAを用いて検討する。

### 4. 研究成果

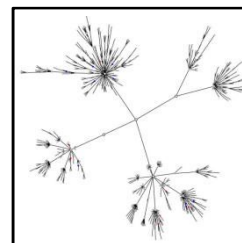
(1) B型肝炎における自然免疫システムの役割を解明すべく、B型肝炎組織における遺伝子発現変動について網羅的解析を行った。公共のデータベースより、21症例のB型肝炎患者の癌部・非癌部のRNA-seqデータを入手し、両者における遺伝子発現を比較したところ、9375/19571遺伝子において発現変化が認められた。NKG2Dリガンド・ファミリーに属する遺伝子 (MICA, MICB, ULBP1-6) に関しては、肝組織ではMICA, MICB以外のNKG2Dリガンドはほとんど発現しておらず、かつ癌部においてMICA, MICBの発現上昇が認められた。また、MICAに関しては、N端が欠如したMICAを発現している症例が存在することが判明した。

細胞膜上に発現したNKG2Dリガンドを切断するシェダーゼの発現に関しては、癌部においてADAM9/10, MMP9の発現上昇が認められた。次に、Gene ontologyを用いたenrichment解析を行



ったところ、NKG2D リガンドが属する「innate immune response」に関連する遺伝子群は、癌部において有意に低下しており、B 型肝炎では自然免疫システムが減弱化していることが示唆された。

(2)癌部において発現変動を認めた遺伝子を用いて co-expression network を構築したところ、癌化との関連が示唆される 16 個の module が同定され、その中には 54 個の hub gene が含まれていた。さらなる解析を行ったところ、up-regulate された module には cell cycle に属する遺伝子が、down-regulate された module には immune response, inflammatory response, catabolic process に属する遺伝子が関連することが判明した。



(3)TCGA データベースに登録されている肝組織のデータを用いて、肝癌細胞における DNA メチル化異常と遺伝子発現レベルとの関連性を検討したところ、肝癌組織ではプロモーター領域の脱メチル化が多く認められ、特に cell cycle, telomere, immune response に対する DNA メチル化以上が肝発癌に関与していることが示唆された。

(4)RNA-seq の解析により、N 端が欠如した MICA を発現している症例が存在していたため、完全長、N 端欠如の MICA を個別に定量可能な real-time PCR の実験系を構築し、肝癌細胞株を用いて検討したところ、実際に N 端欠如の MICA が発現していることが確認された。次に、完全長、N 端欠如の MICA を発現するベクターを構築して肝癌細胞株に導入し、ウェスタンブロットを施行したところ、両者の間でバンドのパターンが異なっており、翻訳後修飾に差異が生じていることが示唆された。

(5)完全長、N 端欠如の MICA を肝癌細胞株に導入し、ELISA にて培養細胞中の MICA を定量したところ、N 端欠如の MICA はほとんど検出されず、完全長の MICA とは細胞中の動態が異なっていることが示唆された。

#### < 引用文献 >

1. Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nature genetics* 2011; 43(5): 455-458. (査読有)
2. Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS one* 2012; 7(9): e44743. (査読有)
3. Goto K, Annan DA, Morita T, Li W, Muroyama R, Matsubara Y, Ito S, Nakagawa R, Tanoue Y, Jinushi M, Kato N. Novel chemoimmunotherapeutic strategy for hepatocellular carcinoma based on a genome-wide association study. *Scientific reports* 2016; 6: 38407. (査読有)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 室山良介、神崎洋彰、加藤直也
2. 発表標題 NGSデータを用いた網羅的ゲノム解析による肝癌関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Muroyama, Hiroaki Kanzaki, Tetsuhiro Chiba, Masato Nakamura, Shingo Nakamoto, Hiroshi Shirasawa, Naoya Kato
2. 発表標題 Identification of modules and hub genes associated with HBV-HCC by gene co-expression analysis
3. 学会等名 International HBV meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室山良介、神崎洋彰、加藤直也
2. 発表標題 NGSデータを用いたゲノム異常解析に基づく肝癌関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第42回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryosuke Muroyama, Hiroaki Kanzaki, Tetsuhiro Chiba, Ryo Nakagawa, Masato Nakamura, Shingo Nakamoto, Shin Yasui, Hiroshi Shirasawa, Naoya Kato
2. 発表標題 2.The exploration of cancer-related gene alterations using whole-genome sequencing data in HBV-related hepatoma cell line
3. 学会等名 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------