

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03633

研究課題名(和文) 癌の自然免疫回避機構を標的とした肝癌の包括的マネジメント

研究課題名(英文) Comprehensive Management of Hepatocellular Carcinoma Targeting Innate Immunological Escape of the Cancer

研究代表者

加藤 直也 (Kato, Naoya)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90313220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：MICAは肝癌細胞表面に発現され、NK細胞の標的となるが、肝癌細胞はMICAを切断しNK細胞攻撃から回避している。1) MICA切断酵素として、ADAM9/10/17を同定した。2) 肝癌組織でMICA発現は上昇していたが、MICA切断によりNK細胞の肝癌組織への浸潤度は低かった。3) ADAM9を阻害する薬剤スクリーニングにより、2種類のロイコトリエン拮抗薬と非環式retinoidを同定した。4) ADAM9は膜型PD-L1も切断し、獲得免疫機構からも逃避していた。以上から、ADAM9阻害により肝癌に対する自然免疫、獲得免疫を賦活化し、肝発癌抑止、肝癌治療に応用しうると期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほとんどのC型肝炎例でウイルス排除が可能となったが発癌は十分に抑止できていない。C型肝炎に対する薬物療法は複合免疫療法が第一選択となったがその効果はいまだ満足するレベルに達していない。したがって、新たな発癌抑止法、肝癌治療法の開発が急務である。肝癌細胞に表出している自然および獲得免疫の標的となる分子であるMICA、PD-L1のADAM9/10/17による切断が肝癌細胞の免疫逃避機構の一翼を担っており、それらの切断阻害は自然免疫賦活による新たな発癌抑止法となる可能性、また、肝癌細胞に対する自然免疫賦活+獲得免疫賦活による新たな肝癌治療法となる可能性がある」と期待される。

研究成果の概要(英文)：MICA is expressed on the surface of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and is a target of NK cells, but HCC cells cleave MICA to evade NK cell attack. 1) We identified ADAM9/10/17 as MICA cleaving enzymes. 2) MICA expression was upregulated in HCC tissues, but MICA cleavage resulted in low NK cell invasion into the tissues. 3) Screening of ADAM9 inhibitors identified two leukotriene antagonists and an acyclic retinoid. 4) ADAM9 also cleaved membrane PD-L1 and evaded the acquired immunity mechanism. These findings suggest that ADAM9 inhibition may be useful for the treatment of HCC and prevention of hepatocarcinogenesis by stimulating innate and acquired immunity against HCC.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝癌 自然免疫 発癌抑止 MICA NK細胞 PD-L1 ADAM 細胞傷害性T細胞

1. 研究開始当初の背景

背景肝の炎症と線維化を母地とする肝癌は、他癌種と異なり多中心性発癌/再発を特徴とし、独自の対策が望まれる。ウイルス性慢性肝炎の治療が確立した今、肝発癌抑止は肝臓病学の最重要アンメット・ニーズである。われわれはゲノムワイド関連解析により肝癌感受性遺伝子として自然免疫分子 MICA を同定した (Nat Genet 2011)。“kill me シグナル”である MICA を発現する肝細胞を NK 細胞が排除することこそが肝発癌抑止に重要であり、肝癌治療への応用が可能である。しかし、肝癌細胞は MICA 切断酵素を発現し自然免疫機構から逃避している。あたかも癌細胞が PD-L1 を発現し、細胞障害性 T 細胞による攻撃から逃避するのに酷似している。免疫チェックポイント阻害薬の成功から、肝癌細胞による自然免疫逃避機構を標的とした包括的肝癌マネジメントこそがアンメット・ニーズ解決のブレイクスルーになると確信し、新たな肝発癌抑止法、肝癌再発抑止法、肝癌治療法の確立を目指す。

2. 研究の目的

ゲノムワイド関連解析 (genome wide association study: GWAS) により、疾病と関連する遺伝子多型が数多く同定されつつある。GWAS は、従来の癌部・非癌部の単純な比較による発癌メカニズムの解明からのパラダイムシフトを起こした。実際に、われわれは C 型肝炎の GWAS を行い、C 型肝炎に関連する遺伝子多型として、MICA (MHC class I polypeptide-related sequence A) 遺伝子の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を初めて同定し報告した (Nat Genet 2011)。MICA SNP の遺伝子型により、血中可溶性 MICA の血中濃度は異なり、肝癌のリスクアレルを有する症例では血中可溶性 MICA 濃度が低下していた。すなわち、MICA の SNP は単に高肝発癌リスク群囲い込みの良い指標となるのみならず、MICA 自体が C 型肝炎における肝発癌に密接に関連していることを示した。MICA は“kill me シグナル”と呼ばれ、ウイルス感染や細胞の癌化により細胞表面に発現され、その MICA をリガンドとする NKG2D を発現する自然免疫担当細胞である NK 細胞の標的となる。すなわち、MICA を中心とする細胞性自然免疫機構が肝癌細胞の排除に重要な役割を担っていることが示された。C 型肝炎のみならず、B 型肝炎からの発癌においても MICA が重要な役割を担っていることも明らかにした (PLoS One 2012)。トランスフォームしつつある肝細胞で MICA 発現が低いことは肝発癌の大きなリスクである。それに加え、肝癌細胞は細胞表面に発現された MICA を切断し、自然免疫機構から逃避していることが明らかになっている。自然免疫は癌の初期過程において特に機能し、NK 細胞による細胞傷害性により癌細胞は排除されるが、肝癌細胞においては、MICA 切断酵素である ADAM ファミリー分子を誘導し、膜型 MICA の切断を行うことで、自然免疫機構による細胞破壊を回避している。

このように、肝癌においては、他癌種にも増して MICA を中心とする細胞性自然免疫機構が重要なキープレイヤーであることが示された。特に MICA の切断による自然免疫機構からの逃避は、あたかも癌細胞が PD-L1 を発現し細胞障害性 T 細胞による攻撃から逃避するのに酷似している。そこで、今年のノーベル賞に輝いた抗 PD-1 抗体を始めとする免疫チェックポイント阻害薬の成功を踏まえ、本研究では、肝発癌における MICA を中心とした細胞性自然免疫機構の機能解析を行うと共に、MICA の切断阻害を中心とした細胞性自然免疫機構の賦活化による肝発癌抑止法、また同様に肝癌再発抑止法の開発、ひいては新たな肝癌治療法につなげる、すなわち肝癌の包括的なマネジメントを行うことを目的とする。癌の獲得免疫療法のアナロジーとしての自然免疫療法版を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、MICA を中心とした細胞性自然免疫機構が肝発癌に重要な役割を担っていること、また肝癌細胞は膜型 MICA の切断により NK 細胞によるサーベイランスを回避しているという知見を踏まえ、MICA を中心とする細胞性自然免疫機構の肝発癌における役割を明らかにするとともに、MICA の切断阻害を中心とした細胞性自然免疫機構の賦活化により、1) 肝発癌抑止法開発、2) 肝癌再発抑止法開発、3) 肝癌治療法開発、すなわち肝癌の包括的マネジメントを目指すものである。特に免疫チェックポイント阻害薬の成功から、肝癌細胞が自然免疫機構から回避するメカニズムである MICA 切断阻害を中心に検討を行う。具体的には、i) 肝癌細胞株での MICA 発現および切断の検討、ii) 可溶性 MICA 濃度の安定的測定法の確立、iii) 膜型 MICA の安定的検出法の確立、iv) 肝癌細胞における MICA 切断酵素発現の検討、v) 肝癌細胞における MICA 切断を担う責任酵素の同定、vi) 肝癌 MICA 切断酵素に対する阻害薬のスクリーニング、vii) 肝炎ウイルス感染が膜型 MICA/可溶性 MICA 発現に及ぼす影響の解析、viii) スクリーニングにて得られた MICA 切断酵素阻害薬が肝癌細胞と NK 細胞との関連に与える影響の解析、ix) MICA 切断酵素阻害薬の特性と特異性の検定、x) MICA 切断酵素阻害薬ミディアム～ラージスケールスクリーニング系の確立、xi) 新たな MICA 切断酵素阻害薬の NK 細胞による肝癌細胞傷害性に及ぼす影響の解析、を行っていく。

スクリーニングにより得られた MICA 切断阻害薬の臨床展開を模索すると共に、MICA を中心と

する細胞性自然免疫機構の賦活化法として、MICA 切断阻、MICA 発現増強、に加えて、高活性 NK 細胞、NKG2D アゴニスト抗体による NK 細胞の細胞傷害性の増強、NK 細胞を攪乱する可溶性 MICA の中和抗体による排除、を試みる。高活性 NK 細胞については、現在までに共同研究にてその樹立法を確立しつつある。また、NKG2D アゴニストについても、EB ウイルス発癌マウスモデルにおいて NK 細胞を活性化することが報告されており (Cell 2011) また、可溶性 MICA 中和抗体についても、免疫チェックポイント阻害薬である抗 CTLA-4 抗体により誘導されることが報告されており (Immunol Rev 2008) 必要に応じて共同研究を行う。

4. 研究成果

MICA は NKG2D リガンド・ファミリーに属し、肝炎ウイルス感染によって血中分泌型 MICA が上昇することが報告されている。MICA は kill me signal として癌化した肝細胞などの表面に発現され、NK 細胞の標的となる。癌化した肝細胞は、膜型 MICA を表出することで NK 細胞に排除されるが、この細胞性自然免疫システムこそが、癌サーベイランスシステムとして発癌抑制に働いている。ところが肝癌細胞はこの膜型 MICA を切断し、分泌型 MICA を生成、分泌型 MICA により NK 細胞を攪乱し、細胞性自然免疫による排除を回避している。

1) そこで、TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースより C 型肝炎・肝癌患者の RNA-seq データを入手し、HCV 感染による NKG2D リガンド・ファミリーの発現変化を mRNA レベルで検討した。その結果、MICA、MICB、ULBP3 以外の NKG2D リガンド・ファミリーはほとんど発現しておらず、MICA の発現量が最も多いことが判明した。C 型肝炎では MICA が自然免疫賦活化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、mRNA レベルにおいて、HCV 感染による MICA の発現変化は認められなかった。このことより、HCV 感染によって血中分泌型 MICA が上昇するのは、膜型 MICA 切断酵素の活性化が原因となっている可能性が示唆された。

2) 肝癌における腫瘍内免疫応答につき、癌免疫サイクルに基づいた immunogram の作成に用いる gene set を用いて解析を行った。その結果、肝癌組織における MICA の発現は上昇していたが、NK 細胞の肝癌組織への浸潤度は低いことより、MICA の発現増強に加え、肝癌組織への NK 細胞の誘導を行うことで、より効率的な肝癌細胞排除・肝発癌予防が可能になると考えられた。

3) 膜型 MICA 切断酵素の候補として、ADAM9、ADAM10、ADAM17、ADAM19、ADAM21、MT1-MMP、MMP2、MMP9 を選定し、ヒト肝癌細胞株 (HepG2 細胞、PLC/PRF/5 細胞) 中の各遺伝子の発現を siRNA にてノックダウンした。ノックダウン後の膜型 MICA 発現量、上清中分泌型 MICA 量の変化を検討したところ、ADAM9、ADAM10、ADAM17 が膜型 MICA の切断に有意に寄与していることが判明した。中でも ADAM9 が中心的な役割を担っていることを明らかにした。

4) ADAM9 の酵素活性を抑制する薬剤のスクリーニングを行うため、in vitro ADAM9 assay system を確立し、740 種類の FDA 承認薬ライブラリー、1,300 種の千葉化合物ライブラリー、を対象として、スクリーニングを行った。その結果、2 種類のロイコトリエン拮抗薬 (モンテルカスト、プラナルカスト) が ADAM9 の酵素活性を抑制することを明らかにした。また、肝細胞癌再発を抑止することが報告された非環式 retinoid にも ADAM9 の酵素活性を抑制する効果があることを見出した。非環式レチノイドによる肝細胞癌再発抑制効果は、MICA の切断阻害による可能性がある。加えて、千葉化合物ライブラリーから複数の候補薬剤を見出しており、さらなる検討を行っている。

5) ADAM9 が膜型 PD-L1 を切断し、細胞傷害性 T 細胞の活性化を阻害し、獲得免疫機構からの逃避に寄与している可能性を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arai J, Goto K, Otoyama Y, Nakajima Y, Sugiura I, Kajiwara A, Tojo M, Ichikawa Y, Uozumi S, Shimozuma Y, Uchikoshi M, Sakaki M, Nozawa H, Nakagawa R, Muroyama R, Kato N, Yoshida H.	4. 巻 70
2. 論文標題 Leukotriene receptor antagonists enhance HCC treatment efficacy by inhibiting ADAMs and suppressing MICA shedding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother	6. 最初と最後の頁 203-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02660-2	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 Otoyama Y, Arai J, Goto K, Nozawa H, Nakagawa R, Muroyama R, Sugiura I, Nakajima Y, Kajiwara A, Tojo M, Ichikawa Y, Uozumi S, Shimozuma Y, Uchikoshi M, Sakaki M, Kato N, Yoshida H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Retinoids decrease soluble MICA concentration by inhibiting the enzymatic activity of ADAM9 and ADAM10	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 2307-2320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15006	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 肝癌のHot Topics
3. 学会等名 第106回消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 C型肝炎の残された課題～急性肝不全を含めて～
3. 学会等名 第46回日本急性肝不全研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 Withコロナ時代に目指すべきC型肝炎治療
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 内科医が知っておくべき肝臓病の最新情報
3. 学会等名 令和2年度千葉県内科医会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 C型肝炎のアンメット・メディカルニーズに挑む
3. 学会等名 第28回日本消化器病関連学会週間 (JDDW2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 パラダイムシフトを迎える肝癌薬物治療ースチバーガの治療意義ー
3. 学会等名 第56回日本肝癌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 肝がんにおける免疫療法について
3. 学会等名 第23回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 生存期間延長を目指した進行肝癌治療戦略
3. 学会等名 第22回日本肝がん分子標的治療研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒井潤、吉田仁、加藤直也
2. 発表標題 ロイコトリエン拮抗薬によるADAM9制御を介した肝癌自然免疫療法の開発
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤直也
2. 発表標題 B型肝炎と肝がん治療のアンメット・ニーズに挑む
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 荒井潤、吉田仁、加藤直也
2. 発表標題 肝細胞癌に対する分子標的療法がGWAS感受性遺伝子MICAに与える影響の検討
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 Naoya Kato
2. 発表標題 HCC:View in Host Genetics
3. 学会等名 Achievement and New Challenge of LiverDiseases 2019 Kaohsiung Liver Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoya Kato
2. 発表標題 HCV-associated HCC-Basics and clinics
3. 学会等名 HEPATITIS CLINICAL FORUM (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------