

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014069

研究課題名（和文） がん細胞の分化異常とチロシンキナーゼ制御

研究課題名（英文） Abnormal differentiation of tumor cells and tyrosine kinase regulation

研究代表者

吉村 昭彦（YOSHIMURA AKIHIKO）

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90182815

研究成果の概要（和文）：

がん組織内に浸潤する炎症細胞はさまざまなメディエーターを介してがんの増殖や増悪化に寄与する。このなかで炎症性サイトカインはがん細胞において NF- κ B や JAK-STAT 経路を活性化する。我々はサイトカインの抑制因子である SOCS と Spred について癌との関連について研究を行った。モデルマウスでは SOCS1 や SOCS3 の欠損によってがん化が促進され、またヒト肝臓がんにおいて SOCS 遺伝子のサイレンシングが寄与することが明らかとなってきた。さらに我々は癌と関連の深い Ras/ERK 経路の抑制因子である Spred1 の変異を神経繊維腫 I 型に見いだした。

研究成果の概要（英文）：

Inflammatory cells are involved in tumor growth and development through various inflammatory mediators. Inflammatory cytokines activate the NF- κ B and JAK/STAT pathways. We have investigated the function of SOCS family and Spred family proteins which regulate cytokine signaling, on tumorigenesis. In model mice lacking SOCS1 or SOCS3 genes, we found that carcinogen-induced tumorigenesis was promoted. In human hepatocellular carcinoma, SOCS1 and SOCS3 gene expression was silenced. We also found that human *SPRED1* is responsible for neurofibromatosis type I like disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	11,300,000	0	11,300,000
2006 年度	11,400,000	0	11,400,000
2007 年度	11,400,000	0	11,400,000
2008 年度	12,900,000	0	12,900,000
2009 年度	12,900,000	0	12,900,000
総計	59,900,000	0	59,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：

サイトカイン, シグナル伝達, チロシンキナーゼ, 転写因子, STAT, 炎症, Ras, ERK

1. 研究開始当初の背景

申請者らは世界にさきがけてサイトカインによって誘導される遺伝子CISを発見し、さらにJAK2のキナーゼドメインと直接結合しそのキナーゼ活性を抑制しうる分子SOCS1/JAB (JAK binding protein)をクローニングした(*Nature*, 1997)。またこれらが新しい遺伝子ファミリー(CIS/SOCSファミリー)を形成することを見いだした。2001年にはサイトカイン、増殖因子によるERK活性化を選択的に抑制する分子Spredを発見した(*Nature*, 2001)。

SOCS1とSOCS3はサイトカインシグナルの重要な負の制御因子である。SOCS1, SOCS3はSH2ドメインを有し、SOCS1はJAKに直接結合し、SOCS3はチロシンリン酸化された受容体に結合する。特にSOCS3はIL-6受容体のgp130に類似した受容体(gp130, G-CSF受容体、レプチン受容体など)に親和性が高い。SOCS1のサイトカイン特異性は主に発現誘導、SOCS3は受容体との結合で規定される。SOCS1はIL-6ではあまり誘導されないが造血因子やIFNで強く誘導される。よってSOCS1はSTAT1抑制に特異性が高い。SOCS3は広範なサイトカインで誘導されるが主にgp130に類似した受容体に会合するためにSTAT3抑制に特異性が高い。

近年、遺伝子の変異だけではなく、がん細胞を取り囲む微小環境や間質における血管新生や炎症などの変化ががんの発生、増悪化に大いに寄与することが明らかにされている。例えばまたピロリ菌は胃潰瘍の主因であるが一部胃がんへと進行することが知られている。このとき炎症ががん化を促進する因子であり、完全に除菌すると炎症が起きず発がんも抑制される。したがってマクロファージなどの炎症細胞ががんの進展に重要であることは明らかであるが、では炎症細胞はどのようにがん化に寄与し、形質転換する細胞内ではどのようなシグナルが働いているかは不明であった。

一方Ras/MAPキナーゼ(MAPK)経路は細胞外刺激に応じて細胞増殖、分化を調節する細胞内シグナル伝達経路としてよく知られている。またRasの恒常的活性型変異は約30%の癌で見られる。さらにこの経路のシグナル分子や制御因子の家族性の変異が神経繊維腫やヌーナン症候群で発見されている。しか

し、Ras/MAPキナーゼ経路の負の制御メカニズムについては未だ不明な点が多い。このなかで我々はあたらなRas/ERK経路の抑制因子としてSpredファミリーを発見した(*Nature*, 2001)。本研究ではSpredと癌の関係も解明する。

2. 研究の目的

- (1)SOCSと炎症性発がんの関係性を明らかにする。
- (2)Spred-1とヒト遺伝性疾患の関係性を明らかにする。
- (3)Sproutyの血管新生抑制機能を解明する。

3. 研究の方法

研究方法

(1)SOCS1コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの作製と解析

SOCS1-cKOマウスは常法に従いSOCS1遺伝子のcoding領域の両側にfloxed配列を挿入したベクターを構築し、ES細胞に相同組み替えによって本来のSOCS1遺伝子と入れ替える。薬剤耐性マーカーであるneo遺伝子を除いた後にブラストシストにインジェクションを行いキメラマウスを得る。さらにこのキメラマウスから野生型マウスとの交配によってgerm-lineにSOCS1-floxed遺伝子が導入されたヘテロマウスを得る。Cre-トランスジェニック(Tg)マウスもしくはノックインマウスとの交配によりcKOマウスを得る。T細胞特異的cKOにはIck-Cre、肝臓特異的cKOにはAlb-Cre、マクロファージ特異的cKOにはLysM-Cre、樹状細胞特異的cKOにはCD11c-Cre、Treg特異的CreにはFoxp3-Creなどを用いて各種臓器特異的、細胞特異的SOCS1欠損マウスを得る。

(2)SOCS3cKOマウスの作製と解析

SOCS3-floxedマウスに関してはすでに報告している(*Nature immunology*, 2003)。肝臓特異的Cre、T細胞特異的CreなどについてはSOCS1と同様のCreマウスとの交配によって得る。

(3)マウス急性下肢虚血モデル

C57BL/6マウス(male, 20-25g)を麻酔後、右鼠径部を切開、右大腿動脈を露出した。大腿動脈起始部を6-0絹糸を用いて結紮、

さらに膝窩動脈と伏在動脈の分岐部直前で同様に結紮した。結紮後、右大腿動脈を切除・除去した。切開創を縫合閉鎖し手術を終了した。shRNA plasmid は3ヶ所に分けて筋肉注射した。1. 非投与群、2. pSUPER shGFP (コントロール) 投与群、3. pSUPER shSpry2 と shSpry4 の混合投与群の3群において虚血下肢の骨格筋内へ1肢あたり40 μ g 筋注射し、14日後の血流をレーザードブラー血流像にて評価を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト肝がん と SOCS のサイレンシング

肝がん (HCC) では非がん部で STAT1 が、がん部で STAT3 が高度に活性化されていることを見いだした (Oncogene 2007)。HCC のほとんどは C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染による肝炎に由来することを考えるとこのような STAT の活性化は持続感染による炎症のためと考えられる。

Johns Hopkins 医科大学の研究によって、肝臓がん細胞において SOCS1 遺伝子が高頻度でメチル化をうけ発現が低下していることが明らかにされた。その後も数多くの報告が続き、肝がんの65%以上で SOCS1 遺伝子のメチル化が起こっていることが確かめられている。SOCS1 が IL-6 のシグナルを抑制することから SOCS1 の発現が低下すれば IL-6 によるがん細胞、前がん細胞の増殖が促進されるものと考えられた。しかし SOCS1 が抑制するのは STAT1 であり、STAT3 にはあまり効かない。STAT1 は非がん部で高い。そこで我々は SOCS1 遺伝子のメチル化を前がん状態で調べた。その結果 SOCS1 の遺伝子メチル化は肝がん発症前の肝炎の段階ですでに50%程度の高頻度で起こっていることを見いだした。しかも肝線維化の程度が進行するほどメチル化の頻度は高かった (J. Exp. Med. 2004)。これらの結果から SOCS1 遺伝子の発現低下によって肝炎が起こりやすくなり肝がんが発症する可能性が考えられる。

STAT3 ががん部で高いのは SOCS3 が原因と考えられる。実際に SOCS3 を定量してみるとがん部の方が非がん部より発現が低下している (Gastroenterology 2006)。その原因は今のところ不明であり何らかの分解機構などが存在する可能性がある。

(2) SOCS と肝がん-動物モデルでの検証

では実際に SOCS の発現が減ることでもがん化が促進されるのかを化学発がん剤 DEN を投与することで検討した。その結果、SOCS1 も

SOCS3 もヘテロマウスや肝臓特異的な SOCS 欠損マウスでは DEN による肝がん発症率が高かった。したがって SOCS1, SOCS3 の肝臓での発現の低下は確かに肝がんを促進させると言える (J. Exp. Med. 2004, Gastroenterology 2006)。

また我々は T 細胞と B 細胞にのみ SOCS1 遺伝子を発現させそれ以外の臓器では SOCS1 の発現のないマウス (SOCS1^{-/-} Tg マウス) を作成した。このマウスは長期生存可能であるが、2ヶ月齢程度で大腸炎を発症し、6ヶ月齢以上を経過した SOCS1^{-/-} Tg マウスにおいて7割以上の確率で大腸がんが発症することを見出した。このことから SOCS1 はがん抑制遺伝子と考えられる (J. Exp. Med. 2006)。

(3) SOCS1, SOCS3 と肝炎

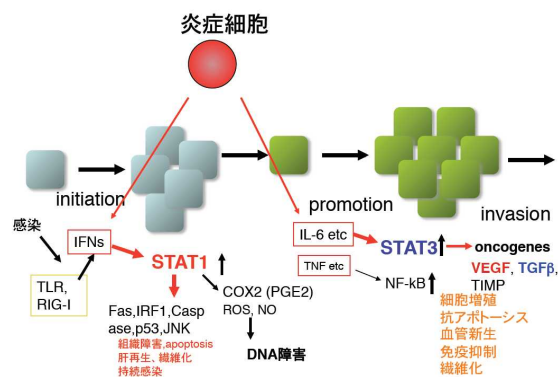
ウイルス感染による肝炎を模倣するモデルとして NKT 細胞を活性化するコンカナバリン ConA による肝傷害モデルがよく用いられる。肝臓特異的 SOCS1 欠損マウスは ConA 肝炎に著しく感受性が高く、肝障害も肝細胞のアポトーシスも促進されていた (Hepatology 2009)。STAT1 の活性化、Caspase の活性化、Fas の上昇、Bcl- χ L の低下は肝臓特異的 SOCS1 cKO マウスで促進されていた。これらの遺伝子は肝障害を促進するものの、肝再生を促し、絶えず新たな肝細胞の再生を誘導するものと考えられる。さらに炎症細胞からの活性酸素 (ROS) や一酸化窒素 (NO) は DNA 損傷を促進するであろう。すなわち SOCS1 は正常細胞において STAT1 を抑制することで、炎症から発展する発がんを抑える全く新しいがん遺伝子と言える。

一方肝臓特異的 SOCS3cKO マウスは ConA 肝炎に抵抗性が高く、STAT3 の活性化、IRF1 の低下、Bcl- χ L の発現上昇のほか、増殖を促進させる c-myc, cyclinD1, cyclinE1 などの細胞周期関連遺伝子の発現が上昇していた (Gastroenterology 2006)。さらに VEGF などの血管新生因子、TIMP-1 などの組織再編因子の発現も上昇していた。これらはすべてがん細胞の増殖にプラスに作用する因子と考えられる。また最近我々は STAT3 の新たな標的遺伝子として TGF- β 1 を同定した (J. Exp. Med. 2006)。TGF- β 1 は組織繊維化を促進する他、免疫抑制作用を有する。

(3) STAT/SOCS と肝がん-2ステップモデル

これらの結果から下図のような炎症と発がんに関する 2 step model を発表した (Nature Rev. Immunol.2007)。

我々の結果より正常細胞における STAT1 が炎症を促進し、その結果形質転換した細胞の出現を促進することを示している。また炎症性細胞から放出される IL-6 はがん細胞の成長を促進させる。このステップをがん細胞内の STAT3 が促進していると考えられる。同時に STAT3 の下流で VEGF や TIMP, TGF が誘導され腫瘍の増大に寄与する。SOCS1 と SOCS3 はこれらの過程をそれぞれ抑制しているが、遺伝子サイレンシングなどで発現が低下するとこれらの過程が加速される。



(4) Spred1 が家族性神経細胞腫の原因遺伝子であることの発見

ベルギー、フランス、アメリカとの国際共同研究において、カフェオレ斑を持つが、NF1 遺伝子に変異を認めない家族性優性遺伝の神経線維腫症 1 型様患者での解析を行った。その結果ヒト SPRED1 に多数の変異を発見し報告した。SPRED1 は neuro-cardio-facial-cutaneous (NCFC) 症候群の原因遺伝子の一つであり、Ras 経路を抑制する新しい癌抑制遺伝子の候補であることが示唆された (Nature Genetics 2007, JAMA 2009)。

また Spred1 および Spred2 が肝がんでは発現が減少していることも発見した (Oncogene 2006)。

(5) Sprouty4 欠損マウスにおける血管新生の亢進

次に Sprouty4 の個体での機能を明らかにするために、Sprouty4 KO マウスの血管新生を調べた。Sprouty4 KO マウス由来の血管内皮細胞では VEGF A シグナルが過剰に入り、血管密度の増加、血管新生の亢進を認めた。また腫瘍血管の数や虚血モデルにおける新生血管の数も Sprouty4 KO マウスで多く、Sprouty4 が生理的にも血管形成を負に制御

していることが明らかになった。

次に下肢結紮による虚血モデルを施行した。Sprouty4 KO マウスは WT マウスに比べて結紮による血流低下が優位に少なく、下肢の壊死も少なかった。また結紮後の血管新生も多く、このことが Sprouty4 KO マウスが虚血に抵抗性を示す原因と思われた。また Sprouty2/4 のダブルノックダウンは下肢虚血による血流の低下、下肢の壊死を有為に抑制した。Sprouty の抑制が虚血性疾患の治療法となりうることが示された。

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 45 件)以下は代表的な論文

(1) Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, Iwaki T, Okada Y, Iida M, Cua DJ, Iwakura Y, Yoshimura A. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nature Med.* 2009 Aug;15(8):946-950.

(2) Nakaya M, Hashimoto M, Nakagawa R, Wakabayashi Y, Ishizaki T, Takada I, Komai K, Yoshida H, Yoshimura A. SOCS3 in T and NKT cells negatively regulates cytokine production and ameliorates ConA-induced hepatitis. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7047-7053.

(3) Messiaen L, Yao S, (他 30 名) Taniguchi K, Ayada T, Okamoto F, Yoshimura A, Parret A, Korf B, Legius E. Clinical and mutational spectrum of Legius syndrome. *JAMA* 2009 Nov 18;302(19):2111-2118.

(4) Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, Van Snick J, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med.* 2009 Sep 28;206(10):2067-2077.

(5) Taniguchi K, Sasaki K, Watari K, Yasukawa H, Imaizumi T, Ayada T, Okamoto F, Ishizaki T, Kato R, Kohno R, Kimura H, Sato Y, Ono M, Yonemitsu Y, Yoshimura A. Suppression of Sproutys has a therapeutic effect for a mouse model of ischemia by enhancing angiogenesis. *PLoS ONE.* 2009;4(5):e5467. doi:

(6) Koga K, Takaesu G, Yoshida R, Nakaya M, Kobayashi T, Kinjyo I,

Yoshimura A. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the c-Fos protein phosphorylated by IKKbeta *Immunity* 2009 30(3): 372-383

(7) Hashimoto M, Ayada T, Kinjyo I, Hiwatashi K, Yoshida H, Okada Y, Kobayashi T, Yoshimura A. Silencing of *SOCS1* in macrophages suppresses tumor development by enhancing antitumor inflammation *Cancer Sci* 2009 Apr;100(4):730-736.

(8) Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, Loeb GB, Lee H, Yoshimura A, Rajewsky K, Rudensky AY. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity*. 2009 30(1):80-91.

(9) Ayada T, Taniguchi K, Okamoto F, Kato R, Komune S, Takaesu G, Yoshimura A. Sprouty4 negatively regulates protein kinase C activation by inhibiting phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis. *Oncogene*. 2009 Feb 26;28(8):1076-88.

(10) Takaki H, Ichiyama K, Koga K, Chinen T, Takaesu G, Sugiyama Y, Kato S, Yoshimura A, Kobayashi T. STAT6 inhibits TGF-beta 1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J Biol Chem*. 2008 283(22):14955-14962

(11) Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, Choi Y, Akira S, Kawai T, Yoshimura A, Kobayashi T. TRAF6 and MEKK1 Play a Pivotal Role in the RIG-I-like Helicase Antiviral Pathway. *J Biol Chem*. 2008 Dec 26;283(52):36211-36220.

(12) Sanada T, Takaesu G, Mashima R, Yoshida R, Kobayashi T, Yoshimura A. FLN29 deficiency reveals its negative regulatory role in the Toll-like receptor (TLR) and retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicases signaling pathway. *J Biol Chem*. 2008 Dec 5;. 283(49):33858-33864.

(13) Torisu T, Nakaya M, Watanabe S, Hashimoto M, Yoshida H, Chinen T, Yoshida R, Okamoto F, Hanada T, Torisu K, Takaesu G, Kobayashi T, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressor of cytokine signaling 1 protects mice against concanavalin A-induced

hepatitis by inhibiting apoptosis. *Hepatology*. 2008 Jan 14;47(5):1644-1654

(14) Tanaka K, Ichiyama K, Hashimoto M, Yoshida H, Takimoto T, Takaesu G, Torisu T, Hanada T, Yasukawa H, Fukuyama S, Inoue H, Nakanishi Y, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Helper T Cells Leads to Defective Th17 Differentiation by Enhancing Antagonistic Effects of IFN- γ on STAT3 and Smads. *J Immunol*. 2008 15;180(6):3746-3756.

(15) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N. SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 8;105(1):294-299.

(16) Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):454-465.

(17) Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, Somers R, Messiaen L, De Schepper S, Fryns JP, Cools J, Marynen P, Thomas G, Yoshimura A, Legius E. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nature Genet*. 2007 39(9):1120-1126.

(18) Taniguchi K, Kohno R, Ayada T, Kato R, Ichiyama K, Morisada T, Oike Y, Yonemitsu Y, Maehara Y, Yoshimura A. Spreds are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *Mol Cell Biol*. 2007 Jun;27(12):4541-4550.

(19) Hanada T, Kobayashi T, Chinen T, Saeki K, Takaki H, Koga K, Minoda Y, Sanada T, Yoshioka T, Mimata H, Kato S, Yoshimura A. IFN γ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *J Exp Med*. 2006 Jun 12;203(6):1391-1397.

(20) Ogata H, Kobayashi T, Chinen T,

Takaki H, Sanada T, Minoda Y, Koga K, Takaesu G, Maehara Y, Iida M, Yoshimura A. Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. 2006 Jul;131(1):179-193.

(21) Yoshida T, Hisamoto T, Akiba J, Koga H, Nakamura K, Tokunaga Y, Hanada S, Kumemura H, Maeyama M, Harada M, Ogata H, Yano H, Kojiro M, Ueno T, Yoshimura A, Sata M. Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene*. 2006 Oct 5;25(45):6056-6066.

(22) Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, Yamane J, Yoshimura A, Iwamoto Y, Toyama Y, Okano H. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nature Med*. 2006 Jul;12(7):829-834.

(23) Kinjyo I, Inoue H, Hamano S, Fukuyama S, Yoshimura T, Koga K, Takaki H, Himeno K, Takaesu G, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of SOCS3 in T helper cells resulted in reduced immune responses and hyperproduction of interleukin 10 and transforming growth factor-beta 1. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):1021-1031.

(24) Ogata H, Chinen T, Yoshida T, Kinjyo I, Takaesu G, Shiraishi H, Iida M, Kobayashi T, Yoshimura A. Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production. *Oncogene*. 2006 Apr 20;25(17):2520-2530.

〔学会発表〕(計 15 件)
国際学会招待講演のみ記載

(1) Akihiko Yoshimura SOCS is a molecular link between inflammation and cancer development. International symposium of infection-associated cancers Conference Hall of Hokkaido University in Sapporo, Hokkaido, Japan, March 3 to 4, 2010.

(2) Akihiko Yoshimura Role of SOCS1 in innate and adaptive immune tolerance World Immune Regulation Meeting IV 2010/3/29-4/1 Davos Switzerland

(3) Akihiko Yoshimura Molecular basis for

immune suppression by TGFb/Smad2/3 5th Leukocyte Signal Transduction Workshop, sponsored by *Aegean Conferences* Aldeamar Knossos Royal Village in Hersonissos, Crete, Greece, June 13 -18, 2009.

(4) Akihiko Yoshimura SOCS1 and SOCS3 are Critical Regulators of Cytokine Signaling; Implication for Helper T Cell Differentiation and Tumor Development. KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology Keystone USA2007/1/5-10

(5) Akihiko Yoshimura SOCS1 is a link between inflammation and inflammation-mediated carcinogenesis. 5th International Aachen Symposium on Cytokine Signalling, Aachen Germany 2007/3/29-31

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 昭彦 (YOSHIMURA AKIHIKO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 90182815

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし