

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17415

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎の線維化進行と肝発癌を予測する新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Novel biomarkers to predict hepatic fibro-carcinogenesis in Nonalcoholic Steatohepatitis

研究代表者

山口 隆志 (YAMAGUCHI, Takashi)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：10730202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)では、非硬変肝で発癌がみられる一方、発癌を伴わない肝硬変症例も多くみられるため、線維化とは独立した発癌のバイオマーカーが求められる。長期経過観察が可能であったNASH30症例についてpSmad3C抗体、pSmad3L抗体を用いて免疫組織染色を行い肝細胞におけるSmadのリン酸化状態と発癌や線維化との関連を検討した。NASHでは、炎症経路を共有して肝線維化と発癌が同時に進行する場合と、炎症や線維化がほとんどない状態で肝発癌に至る場合があり、そのいずれの場合も発癌過程にリン酸化Smad3Lシグナルの亢進とリン酸化Smad3Cシグナルの減弱が重要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHでは非硬変肝からの発癌をしばしば認めるが、非硬変肝からの発癌予測が困難であることが問題となっている。リン酸化Smadシグナルは炎症を介する経路の他、インスリン抵抗性、酸化ストレス、脂質毒性などによる遺伝的变化によっても変化する。そのため、慢性炎症から線維化進行に伴って起こる発癌だけでなく、炎症や線維化進行を伴わない発癌においてもリン酸化Smadシグナルは鋭敏に反応する。リン酸化Smadシグナルを評価することで、これまで予測困難であった非硬変肝からの発癌予測が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In nonalcoholic steatohepatitis (NASH), carcinogenesis is observed in non-cirrhotic livers, while there are cirrhotic livers without carcinogenesis. Therefore, a novel biomarker for hepato-carcinogenesis independent of fibrosis is needed. We investigated the relationship between phospho-Smad isoforms status in hepatocytes and carcinogenesis or fibrosis by immunohistochemistry using pSmad3C and pSmad3L antibodies in 30 patients with NASH who had been followed up for a long time. In both cases, enhancement of pSmad3L signaling and attenuation of pSmad3C signaling were important in carcinogenesis.

研究分野：消化器内科学

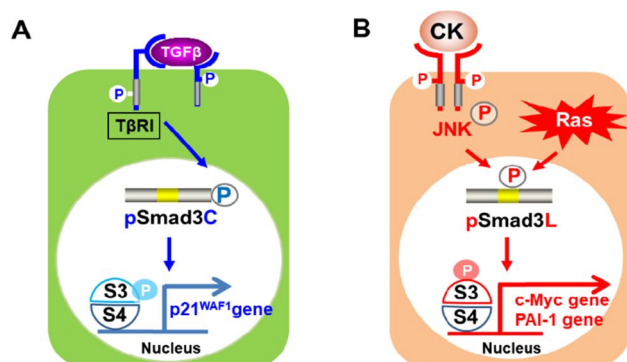
キーワード：NASH Smad3 TGF-beta hepatocellular carcinoma phospho-isoform

1. 研究開始当初の背景

近年、ウイルス性肝炎を合併しない肝細胞癌は急速に増加しており、全肝細胞癌の約 25%、年間 1 万人余りに達すると推計されている (1)。その背景には非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の増加があると考えられている。一方で、NASH 患者のうち、肝発癌がみられるのはごくわずかである (2)。NASH からの肝発癌リスク因子として、高齢、男性、高度線維化、糖尿病、肥満、遺伝子型などが知られているが、それらの因子だけでは高危険群の囲いこみは十分とはいえない。そのため、発癌リスクを有する NASH 患者を選別できる新規バイオマーカーの同定が急務である。NASH の診断には肝生検が必須である。近年、Fib4 index など簡便な方法で線維化を評価する方法が報告され、肝生検が必要な患者の絞り込みが行えるようになりつつある。組織診断により得られる情報は、炎症度、線維化、脂肪化など多岐にわたりスコアリングシステムなどを用いた評価が試みられているが、それらスコアリングシステムによる予後予測や発癌リスク評価は十分ではない。

我々はこれまで線維化と癌化に深く関わる transforming growth factor (TGF)-beta シグナル伝達に注目して研究してきた。TGF-beta シグナルは、主に Smad と呼ばれる伝達分子を介して伝達される。Smad2 ならびに Smad3 に対する部位特異的抗リン酸化抗体を作製し、リン酸化 Smad を介するシグナル伝達機構について詳細な検討を重ねてきた。型 TGF-beta 受容体によって Smad2 および Smad3 の C 末端はリン酸化される。一方、炎症性サイトカインは JNK を介して、Smad2 および Smad3 の中央部に位置するリンカー部をリン酸化する。C 末端がリン酸化した Smad3 (pSmad3C) は核移行した後、p21^{WAF1} 遺伝子のプロモーター領域に結合し転写を活性化させて細胞増殖抑制、癌抑制シグナルに関わる (下図 A)。一方、リンカー部がリン酸化した Smad3 (pSmad3L) は核移行し、pSmad3C とは全く異なる c-Myc 遺伝子の発現を刺激して細胞増殖を促進させる。一方、リンカー部と C 末端の両方がリン酸化した Smad2 (pSmad2L/C) は pSmad3L とともに PAI-1 転写を活性化して細胞外マトリックスの蓄積を促して線維化に関わる (下図 B) (3-8)。重要なことに、pSmad3L が形成されると構造が変化し、pSmad3C が形成されなくなる。さらに、JNK 活性化阻害や、リンカー部リン酸化部位をリン酸化されないアミノ酸に置換した Smad3 (Smad3EPSM) で、リンカー部リン酸化を特異的にブロックすると pSmad3C を介する経路への回復が観察される。この pSmad3L から pSmad3C 経路への可逆性は培養細胞のみならず動物実験でも立証されている (8-10)。このような可逆的な細胞内シグナルは、細胞の状態をつぶさに反映しており予後予測に有用なバイオマーカーとなる可能性を有している。

本研究では、部位特異的リン酸化 Smad シグナルの解析が、線維化進行や肝発癌リスクを有する NASH 患者を選別する有用なバイオマーカーになりうるかを検討する。



2. 研究の目的

現在の肝生検による組織診断では、生検時の炎症度や線維化の状態を評価するにとどまっている。スコアリングシステムを用いた評価も、線維化ステージに基づく予後予測に勝るものではない。本研究では、肝組織中の細胞内シグナルに着目し、解析する。細胞内シグナルはこれから組織に起こる事象が前もって反映されるため、将来の線維化進行や発癌を予測することが可能

であると考えられ、全く新しい新規のバイオマーカーとして期待される。

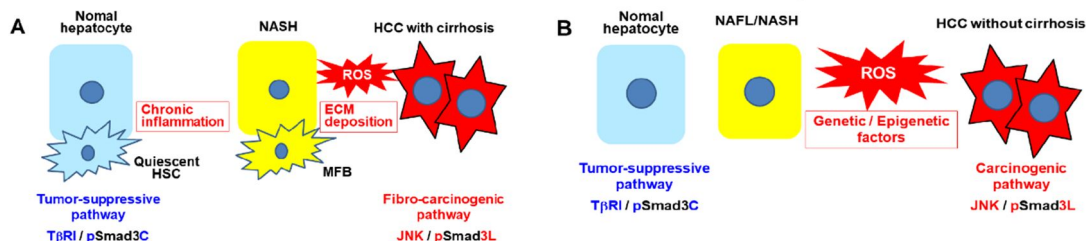
3. 研究の方法

NASH 患者の予後を評価するには長期の経過観察が必要となる。そこで、関西医科大学医学部内科学第三講座で 2008 年までに肝生検を行い組織学的に NASH と診断され、その後 10 年以上の経過観察が可能であった 30 症例について検討を行った。10 年以上の観察期間中に発癌を認めなかった 17 例を非発癌群とし、肝生検時に癌を合併していた 7 例と、肝生検後の経過観察中に発癌を認めた 6 例の 13 例を発癌群とした。非発癌群 (stage I: 7 例、II: 6 例、III: 4 例、IV: 0 例)、発癌群 (stage I: 2 例、II: 2 例、III: 1 例、IV: 8 例) について部位特異的 Smad リン酸化抗体 (pSmad3C 抗体、pSmad3L 抗体) を用いた免疫組織染色を行い、肝細胞における Smad のリン酸化状態を調べた。対照として当科で肝生検を行った C 型慢性肝炎 25 症例 (F1-4 各 5 例、肝癌合併 5 例) についても同様の方法で免疫染色を行い、比較検討した。

4. 研究成果

軽度線維化 14 症例のうち 2 症例は、生検時または経過観察中に発癌しており pSmad3L は増加し pSmad3C は減少していた。一方、高度線維化 16 症例のうち 5 症例は発癌を認めず pSmad3L は減少し pSmad3C が増加していた。次に Smad3 のリン酸化レベルと NASH 発癌リスクについて検討した。pSmad3L が豊富な 12 症例中 11 症例で発癌を認めたが、pSmad3L の乏しい 18 症例のうち発癌を認めたのは 2 症例のみであった (log-rank 0.0009)。対照的に、pSmad3C が乏しい 15 症例中 12 症例で発癌したが、pSmad3C が豊富な 15 症例のうち発癌は 1 症例のみであった (log-rank 0.0022)。多変量解析では肝線維化進行とともに pSmad3L の増加と pSmad3C の減少が独立した発癌予測因子であった。NASH 肝細胞における pSmad3L の増加と pSmad3C の減少は線維化とは独立した発癌の重要なバイオマーカーであることが分かった。

NASH の進行過程で酸化ストレスによって慢性的な炎症が引き起こされる。活性酸素がもたらすストレス、活性酸素によって悪化する脂質毒性、病原体に関連する分子パターン (PAMP)、リポポリサッカライドなどの損傷関連分子パターン (DAMP)、アディポカイン、インスリン抵抗性は、線維化を促進し肝硬変へ進行させる。その結果、肝細胞の Smad3 リン酸化シグナルを腫瘍抑制から発がんシグナルに変化させる (下図 A)。一方、慢性炎症がない場合でも、炎症に依存しない肝発癌が遺伝的あるいはエピジェネティックな変化の結果起こりうる。このような状況では、直接的な DNA 損傷は、インスリン抵抗性や脂質毒性、さらに酸化ストレスによる活性酸素などにより起こる。このような、遺伝子異常による発癌経路においても、Smad3 のリンカー部のリン酸化を持続させ、pSmad3C による増殖抑制の減弱が起こる (下図 B)。



引用文献

1. Tateishi R, Okanoue T, Fujiwara N, Okita K, Kiyosawa K, Omata M, et al. Clinical characteristics, treatment, and prognosis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a large retrospective multicenter cohort study. *J Gastroenterol.* 2015;50(3):350-60.
2. Seko Y, Sumida Y, Tanaka S, Taketani H, Kanemasa K, Ishiba H, et al. Predictors of malignancies and overall mortality in Japanese patients with biopsy-proven non-

alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2015;45(7):728-38.

3. Matsuzaki K, Date M, Furukawa F, Tahashi Y, Matsushita M, Sakitani K, et al. Autocrine stimulatory mechanism by transforming growth factor beta in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2000;60(5):1394-402.
4. Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, et al. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology.* 2002;35(1):49-61.
5. Sugano Y, Matsuzaki K, Tahashi Y, Furukawa F, Mori S, Yamagata H, et al. Distortion of autocrine transforming growth factor beta signal accelerates malignant potential by enhancing cell growth as well as PAI-1 and VEGF production in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene.* 2003;22(15):2309-21.
6. Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, Furukawa F, Tahashi Y, Yamagata H, et al. TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene.* 2004;23(44):7416-29.
7. Yamagata H, Matsuzaki K, Mori S, Yoshida K, Tahashi Y, Furukawa F, et al. Acceleration of Smad2 and Smad3 phosphorylation via c-Jun NH(2)-terminal kinase during human colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005;65(1):157-65.
8. Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, et al. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2007;46(1):48-57.
9. Matsuzaki K, Kitano C, Murata M, Sekimoto G, Yoshida K, Uemura Y, et al. Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-beta signal in later stages of human colorectal cancer. *Cancer Res.* 2009;69(13):5321-30.
10. Matsuzaki K. Smad phosphoisoform signaling specificity: the right place at the right time. *Carcinogenesis.* 2011;32(11):1578-88.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakamura Naohiro, Yoshida Katsunori, Tsuda Rinako, Murata Miki, Yamaguchi Takashi, Suwa Kanehiko, Ichimura Mayuko, Tsuneyama Koichi, Matsuzaki Koichi, Nakano Toshiaki, Hirohara Junko, Seki Toshihito, Okazaki Kazuichi, Gershwin M. Eric, Naganuma Makoto | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Phospho-Smad3 signaling is predictive biomarker for hepatocellular carcinoma risk assessment in primary biliary cholangitis patients | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Bioscience-Landmark | 6. 最初と最後の頁 1480 ~ 1492 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.52586/5042 | 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 Hori Yuichi, Ikeura Tsukasa, Yamaguchi Takashi, Yoshida Katsunori, Matsuzaki Koichi, Ishida Mitsuaki, Sato Sohei, Okazaki Kazuichi | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Role of phosphorylated Smad3 signal components in intraductal papillary mucinous neoplasm of pancreas | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International | 6. 最初と最後の頁 581 ~ 589 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hbpd.2020.05.007 | 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 Suwa Kanehiko, Yamaguchi Takashi, Yoshida Katsunori, Murata Miki, Ichimura Mayuko, Tsuneyama Koichi, Seki Toshihito, Okazaki Kazuichi | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Smad Phospho-Isoforms for Hepatocellular Carcinoma Risk Assessment in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 286 ~ 286 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12020286 | 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 Yamaguchi Takashi, Yoshida Katsunori, Murata Miki, Suwa Kanehiko, Tsuneyama Koichi, Matsuzaki Koichi, Naganuma Makoto | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Smad3 Phospho-Isoform Signaling in Nonalcoholic Steatohepatitis | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 6270 ~ 6270 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23116270 | 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 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 諏訪兼彦, 山口隆志, 吉田勝紀, 村田美紀, 清水真祐子, 常山幸一, 關壽人, 岡崎和一 |
| 2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎患者のリン酸化Smadによる肝発癌のリスク評価 |
| 3. 学会等名 第24回 日本肝臓学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kanehiko Suwa, Tskashi Yamaguchi, Katsunori Yoshida, Miki Murata, Kazuichi Okazaki |
| 2. 発表標題 Phosphorylation of Smad3 Linker Lesion Promotes Fibro-carcinogenesis in Nonalcoholic Steatohepatitis of Hepatocellular Carcinoma |
| 3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) (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 |
|---------|---------|