

機関番号：14301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591609

研究課題名 (和文) 小胞体ストレス制御による肝癌治療の適応拡大

研究課題名 (英文) Modification of endoplasmic reticulum stress expands surgical indication in hepatocellular carcinoma

研究代表者

波多野 悦朗 (HATANO ETSURO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80359801

研究成果の概要 (和文)：

小胞体ストレス経路は、虚血、活性酸素など小胞体内環境変化を起こす種々の刺激により活性化されるが、肝疾患における小胞体ストレスの関与を明らかにすることが本研究の目的である。小胞体ストレスタンパクのひとつである CHOP の欠失は肝障害を軽減させることによって胆汁鬱滞による肝線維化を抑制することが明らかにされた。また、肝障害および肝発癌とともに CHOP の発現は亢進していることがヒト肝癌切除標本を用いて明らかにされた。さらに、もうひとつの小胞体ストレス経路のひとつである JNK を阻害することによりラット肝癌の発癌進展を抑制できることが明らかにされた。以上より今後は、小胞体ストレス制御による肝発癌、進展予防が期待される。

研究成果の概要 (英文)：

C/EBP homologous protein (CHOP) is one of the key components of the endoplasmic reticulum (ER) stress-mediated apoptosis. We investigated the role of CHOP in cholestatic liver injury. Liver fibrosis was attenuated in CHOP knockout mice after bile duct ligation (BDL). Both apoptotic and necrotic hepatocyte deaths were attenuated in CHOP deficient mice. Cholestasis induces CHOP-mediated ER stress and triggers hepatocyte death. CHOP deficiency attenuates hepatocyte death and subsequent liver fibrosis. CHOP expression was enhanced in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Furthermore, inhibition of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase switches Smad3 signaling from oncogenesis to tumor-suppression in rat hepatocellular carcinoma. Taken together, we expect that modification of ER stress expands surgical indication in hepatocellular carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2010年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：癌、ストレス、アポトーシス

### 1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレス経路は、小胞体内異常蛋白質蓄積や、虚血、活性酸素など小胞体内環境変化を起こす種々の刺激により活性化される。この経路では最初に小胞体ストレス応答系により小胞体機能の改善・維持をはかる。しかし、ストレスが強度で小胞体機能が回復できない場合にはアポトーシス経路が活性化される。この小胞体ストレス誘導性アポトーシスは、第3のアポトーシス経路として、最近、様々な病態に関係していることが明らかになってきた。糖尿病、血管病、神経変性疾患、虚血性疾患、炎症性疾患など多くの病気の発症や進展に小胞体を介するアポトーシスが関わっていることがわかり、これら一群の病期を「小胞体ストレス病」と提唱しているグループもある。

一方、年次にわたる肝障害は肝炎、肝硬変、肝癌を引き起こすことはいずれの病因によっても明らかである。特にC型肝炎ウイルスによる炎症の蓄積は、肝線維化をもたらす、最終的には肝細胞癌を発症する。その分子メカニズムに関する研究は広く行われているが、炎症がもたらすoxidative stressが肝障害の進行、肝発癌に関与しているとする知見が多く見られる (Maeda S et al. Cell 2005, Zender L et al. Cell 2006, Hoffmann A et al. Cancer Cell 2007)。

そこで、我々は小胞体ストレス誘導性アポトーシス経路のうちの転写因子 CHOP (C/EBP homologous protein)/GADD153 を介する経路に着目した。その理由として CHOP ノックアウト (KO) マウスを用いた実験でさまざまな疾患との関係が報告されているからであ

る。

### 2. 研究の目的

我々の研究の目的は、肝疾患の進展、肝細胞癌の発生・増殖における CHOP の役割を明らかにし、

- (1) 肝障害を軽減する
- (2) 肝線維化を抑制するとともに肝癌の発症を予防する
- (3) 肝切除における侵襲を軽減することにより肝切除の適応拡大を図る

ことである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肝障害、肝線維化における CHOP の役割

CHOP KO マウスを用いて、総胆管結紮モデルを作成し、wild type に比べて障害が軽度であることを確認する。障害度としては、細胞死 (アポトーシス・ネクローシス)、線維化を定量する。また、灌流法により肝細胞を採取し、in vitro で障害を与え (TNE, 胆汁酸など)、CHOP KO で障害が軽減されることを確かめると同時に詳細なメカニズムを明らかにする。同様に、肝星細胞を採取し、星細胞の活性化やコラーゲン産生能への影響を明らかにする。

#### (2) 肝疾患の進展、肝癌発症における CHOP の役割

ヒトの肝細胞癌手術標本を用いて癌部、非癌部の CHOP の発現を RT-PCR, Western blotting, 免疫染色を用いて検討する。肝障害の進展に応じて CHOP 発現が亢進しているか抑制されているかを確認する。一方、

CHOP KO マウスを用いて肝細胞癌発癌モデルを作成し、WT に比較して癌の発生・進展が促進されることを確かめる。

(3) 肝発癌進展における c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) の関与  
小胞体ストレスによって誘導される MAP kinase のひとつである JNK に着目し、JNK 阻害剤 (SP600125) を用いて、肝発癌抑制を誘導することとその抑制機序の解明を目的に N-diethylnitrosamine (DEN) 誘導肝癌モデルラットに対して、SP600125 を週 1 回皮下投与した。腫瘍数、生存期間を観察するとともに Smad3, c-Myc の発現を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 野生型 (WT) マウスと CHOP ノックアウト (KO) マウスに対し総胆管結さつを行い、急性期肝障害 (2 日後) と慢性期肝障害である肝線維化 (14 日後) を評価した。上記マウスより肝細胞を分離培養し、胆汁酸 glycochenodeoxycholic acid (GCDCA) に 8 時間暴露し、アポトーシスとネクローシスを評価した。WT の肝臓では総胆管結さつ後 2 日後から CHOP とその下流の因子である Bax, Bcl-2 の発現が上昇し、14 日後には肝線維化が認められた。CHOP KO マウスでは Bax, Bcl-2 の発現、肝線維化いずれも軽減されていた。また、WT では  $\alpha$ -smooth muscle actin の発現上昇と TGF  $\beta$  1 の発現上昇がみられたが、CHOP KO マウスでは抑制されていた。さらに CHOP KO マウスではアポトーシスとネクローシスの両方が抑制され、AST, ALT の上昇も抑制されていた。WT マウスから分離された肝細胞を GCDCA で処理することにより、CHOP, Bax, Bcl-2 の発現が誘導され、caspase-3 の活性化および propidium iodide 陽性細胞の割合が増加した、CHOP KO マウス肝細胞ではこれ

らの変化は抑制されていた。以上より胆汁鬱滞性肝障害において CHOP が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(2) ヒトの肝細胞癌手術標本を用いて癌部、非癌部の CHOP の発現を Western blotting にて検討した。正常肝に比べ C 型肝炎の傷害肝で CHOP の発現は亢進し、癌部ではさらに高発現であった。一方、B 型肝炎を背景とした肝細胞癌では、C 型肝炎を背景とした肝細胞癌と同様に CHOP の発現は亢進していたが、B 型肝炎の傷害肝での CHOP の発現は正常肝と同様であった。以上より、B 型肝炎および C 型肝炎を背景とした肝発癌には異なる小胞体ストレスが及んでいることが示唆された。一方、ジエチルニトロサミンを腹腔内投与し 34 週後の肝発癌を C57BL6 マウス (野生型) と CHOP ノックアウトマウスで現在比較検討中である。

(3) N-diethylnitrosamine (DEN) 誘導肝癌モデルラットにおいて、JNK 阻害剤 SP600125 を週 1 回皮下投与したところ、腫瘍数減少と生存期間延長を認めた。また、SP600125 投与後のリン酸化 Smad3 の発現については、腫瘍抑制に働く C-terminally phosphorylated Smad3 (pSmad3C) の発現が上昇するとともにその下流に位置する p21 の発現も上昇していた。その一方で、腫瘍増殖に働く linker-phosphorylated Smad3 (pSmad3L) の発現が抑制されるとともにその下流にある癌遺伝子 c-Myc の発現も抑制されていた。つまり、SP600125 投与により癌抑制に働く pSmadC/p21 経路の亢進と癌促進に働く JNK/pSmad3L/c-Myc 経路の抑制により腫瘍は抑制され、かつ生存期間の延長も得られたと考える。

今後は、小胞体ストレス制御による肝発癌、

進展予防を目的に、背景肝疾患に応じたストレス制御による肝癌予防薬の開発に着手したい。また、肝切除後の再発予防にも小胞体ストレス制御は役立つことが期待される。

#### 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 2 件)

1. Nagata, H., Hatano, E., Tada, M., Murata, M., Kitamura, K., Asechi, H., Narita, M., Yanagida, A., Tamaki, N., Yagi, S., Ikai, I., Matsuzaki, K., Uemoto, S.. Inhibition of c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase Switches Smad3 Signaling from Oncogenesis to Tumor-suppression in Rat Hepatocellular Carcinoma *Hepatology*, 査読あり、49(6):1944-53, 2009

2. Tamaki, N., Hatano, E., Taura, K., Tada, M., Kodama Y., Nitta, T., Iwaisako, K., Seo, S., Nakajima, A., Ikai, I., Uemoto, S. CHOP-deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *Am J Physiol* 査読あり、294(2):G498-505, 2008

[学会発表] (計 2 件)

1. 長田 博光, 波多野 悦朗, 阿世知 弘行, 成田 匡大, 柳田 敦子, 玉置 信行, 猪飼 伊和夫, 松崎 恒一, 上本 伸二

JNK の肝発癌過程における分子標的意義—

JNK 阻害剤による肝細胞癌治療の可能性—

第 109 回日本外科学会 2009 年 4 月 4 日 福岡

2. 長田博光、波多野悦朗、多田正晴、阿世知弘行、成田匡大、柳田敦子、玉置信行、猪飼伊和夫、松崎恒一、上本伸二

ラット肝癌モデルにおける JNK 阻害剤による抗腫瘍効果

第 63 回日本消化器外科学会定期学術総会 2008 年 7 月 17 日 札幌

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多野 悦朗 (HATANO ETSURO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80359801

(2) 研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40252449

新田 隆士 (NITTA TAKASHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40456877

安近 健太郎 (YASUCHIKA KENTARO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00378895

猪飼 伊和夫 (IKAI IWAO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：60263084