

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590845

研究課題名（和文）癌化過程における STAT 分子の役割—STAT 相互の活性化シフトを介して

研究課題名（英文）The role of STATs molecule through cancer development

研究代表者

法水 淳（Hosui Atsushi）

大阪大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：10536882

研究成果の概要（和文）：STAT1 や VEGF は腫瘍の増殖の際に重要な役割を果たすことが知られている。最近、肝細胞癌の再発予防に対して IFN が有効であることを示唆する報告が散見されるが、その作用機序に関しては不明な点が多い。

培養細胞及びマウスを使用した皮下腫瘍モデルにおいて IFN α 投与-STAT1 活性化は腫瘍増殖抑制作用があり、これは VEGF の promoter 部分に対して活性化 STAT1 が結合、レプレッサー様に働くことにより VEGF 産生が抑制されていることに起因することが示された。

ヒト肝細胞癌サンプルを用いた検討によると、非腫瘍部に比し腫瘍部において STAT1 の活性化が抑制されている人は高率に局所再発をきたすこと、更には STAT1 の発現と VEGF の発現が逆相関の関係にあることが示された。

以上のことより、肝細胞癌の再発予防には STAT1 の活性化が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Signal transducers and activators of transcription (STAT) 1 plays a pivotal role in cell-cycle and cell-fate determination, and vascular endothelial growth factor (VEGF) also contributes tumor growth. Recently interferon (IFN) α has been reported to be effective for prevention of hepatocellular carcinomas (HCCs) recurrence, but the detailed mechanisms remain elusive. *In vitro*, cobalt chloride-treated VEGF induction and hypoxia responsive element (HRE) promoter activity were inhibited by IFNs and this abrogation was cancelled by introduction of small interfering RNA for STAT1. Immunoprecipitation /Chromatin Immunoprecipitation analyses showed STAT1 bound to hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and dissociated HIF-complex from HRE promoter lesion. In a xenograft model using Balb/c nude mice, tumor growth was suppressed by IFN α through inhibition of VEGF expression and it was oppositely enhanced when STAT1-deleted cells were injected. This augmentation was due to upregulation of VEGF and hyaluronan synthase 2. In human samples, 29 HCCs were resected, divided into two groups based on STAT1 activation in tumor and the clinical features were investigated. Patients with suppressed STAT1 activity had a shorter recurrence-free survival. Histological and RT-PCR analyses showed portal vein microinvasion and increased VEGF levels in tumors from suppressed STAT1 group. These human samples also showed a reverse correlation between VEGF and STAT1-regulated genes expression. These results *in vitro* and *in vivo* suggested that IFN α are potential candidates for prevention of vessel invasion acting through inhibition of VEGF expression and need to be properly used when STAT1 expression is suppressed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：腫瘍増殖のメカニズム

キーワード：STAT1, HCC, VEGF, IFN, HIF-1, STAT3

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国において肝細胞癌 (HCC) 患者の発生は増加しており、肝癌死亡者は年間 3 万人を超え、癌死亡の男性で 3 位、女性で 4 位である。多くの場合、肝炎ウイルスの持続感染の結果、慢性肝炎から肝硬変と至り、効率的に肝細胞癌を発症する。我々は肝炎、肝硬変から何故肝細胞癌へと発展するのかという根本的な疑問を様々なノックアウト (KO) マウスを用いて分子生物学的機序に解明しようと試みている。この進行過程において、様々なサイトカインがその関与に深くかかわっていることは多数の論文により報告されているが、多くのサイトカインたとえば IFN やインターロイキン (IL) などは細胞受容体に結合し JAK-STAT 経路を活性化させ、その細胞に対し様々な効果を発現させる。サイトカイン及びその受容体は現在 100 個以上存在すると考えられているが、その細胞内情報伝達を担う JAK-STAT に関しては JAK が JAK1-3, Tyk2 の 4 個、STAT が STAT1-6 までの 6 個を数えるのみであり、それぞれが共同して様々な遺伝子発現を調節している。特に STAT3, STAT5, STAT1 は細胞の増殖やアポトーシスなどに深く関与しており、癌発生にとくに重要であると考えられる。我々は以前、肝特異的 STAT5KO マウスを用いて肝線維化亢進及び肝発癌が生じることを報告した (JEM 2009, Hosui A.)。概ね STAT3, STAT5 は細胞増殖、抗アポトーシスに、STAT1 は細胞死の方向に働くと考えられている。また、これまでは特有のサイトカインが決まった STAT の活性化をひきおこすと考えられていたが、最近では細胞の状態によって活性化される STAT が異なり、結果として異なった作用を及ぼすことが報告されている。更に、これらの STAT のバランスが重要な役割を果たしており、このバランスの破たんが様々な病的

状態を引き起こしていることも報告されている。

2. 研究の目的

癌化過程における STAT 活性化の役割 (特に今回は STAT1 に焦点をあてて) 及び STAT のバランスの重要性を検討する。慢性肝炎、肝硬変から HCC への発展の機序を解明することにより、人の肝癌に対する予防、治療に役立てたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 手術により得た肝癌症例 29 症例を対象に検討を行った。まず非癌部及び癌部における STAT1 の活性化を検討、次にその STAT1 の活性化の違いにより HCC 進展、再発、予後などの違いを評価した。
 (2) in vitro における IFN-STAT1 活性化による VEGF 発現に及ぼす影響を検討した。更に STAT1 活性化がどのような機序で VEGF 発現に影響を及ぼすかを、VEGF の promoter 領域にある HRE (hypoxia responsive element) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入した plasmid を作成し、検討を加えた。更に、ChIP assay、免疫沈降反応等により STAT1 分子がどのような分子に働きかけて機能するかを評価した。
 (3) 最後に肝癌細胞株のマウスに対する皮下移植モデルを利用して、IFN α が腫瘍増殖に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝癌 29 症例を STAT1 活性化著明低下群 (以下 S1 低下群) とコントロール群に分け、腫瘍の形態、臨床像を検討したところ、S1 低下群において 2 年以内の再発の有意な増加を認めた。また肝癌組織の詳細な検討により、S1 低下群において肝癌の微小な門脈浸潤症例が有意に増加していた。この原因を検索するため癌部非癌部における転移浸潤関連分

子 (FGF、MMP、TIMP、VEGF 等) の発現を網羅的に解析したところ、VEGF が mRNA、蛋白レベルのいずれにおいても、S1 低下群においてコントロール群に比し有意に発現の上昇が認められた。また、腫瘍部における STAT1 と VEGF の発現量には負の相関関係が認められた。

(2) 肝癌細胞株を使用した in vitro の検討において、IFN α 刺激による STAT1 の活性化により VEGF の発現の低下が認められ、これは IFN α 濃度依存性であった。更に塩化コバルトを使用した低酸素モデルにおいても、誘導された VEGF は IFN α 刺激により発現抑制が認められ、STAT1 の siRNA を導入することによりこの発現抑制が解除された。更に HRE を上流に持つシフェラーゼプラスミドを用い検討したところ、IFN α によるプロモーター活性の抑制効果が認められた。そのメカニズムに関して実験したところ、VEGF 発現調節をつかさどる HIF-1 α と STAT1 との結合が免疫沈降反応により示された。更に、この STAT1 との結合によって HIF-1 α と VEGF のプロモーター領域に存在する HRE との結合を阻害し、結果として VEGF の発現低下を引き起こすことを ChIP assay にて示した。

(3) 5 週齢のヌードマウスに対して、ヒト肝癌細胞株を皮下に移植し約 1 カ月間腫瘍のサイズを測定した。(A 群) 肝癌細胞株コントロール群、PBS 投与、(B 群) 肝癌細胞株コントロール群、IFN α 投与群、(C 群) 肝癌細胞株 STAT1KO 群、PBS 投与、(D 群) 肝癌細胞株 STAT1KO 群、IFN α 投与群 の 4 群に分け検討を行った。STAT1KO は siRNA を用い、in vitro、in vivo において発現が低下していることを確認した。(A 群) に比し (B 群) において IFN α 投与による腫瘍増殖抑制効果が認められたが、(C 群) に比し (D 群) において予想に反し、IFN α 投与による腫瘍増殖増強効果を認めた。腫瘍移植後 1 ヶ月後に腫瘍を摘出し、VEGF の mRNA および蛋白を抽出、検討したところ、(B 群) では発現の低下を (D 群) においては他の群に比し発現の増強を認めた。また、新生血管の発現を CD31 抗体にて検討したところ、VEGF 発現と同様の結果を得た。更に 4 群に対して腫瘍移植後よりベバシズマブ (抗 VEGF 抗体) を週 2 回投与したところ、IFN α による腫瘍増殖抑制効果 (B 群) 及び増強効果 (D 群) が消失した。これらの結果より、通常の STAT1 発現下では IFN α による腫瘍抑制効果が期待されるが、STAT1 非発現下では IFN α は逆に腫瘍増殖を促進させる。その機序として、VEGF の発現調節を介して新生血管の出現を抑制もしくは増強していると考えられた。

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 4 件) すべて査読あり

1. Hosui A (1 番目), Takehara T (12 番目), 他 10 名. Suppression of signal transducers and activators of transcription 1 (STAT1) in hepatocellular carcinoma is associated with tumor progression. Int J Cancer 2012 in press

2. Shigekawa M, Takehara T (2 番目), Hosui A (8 番目), 他 10 名. Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011, 406(4):614-20

3. Kodama T, Takehara T (2 番目), Hosui A (9 番目), 他 18 名. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. J. Clin. Invest. 2011, 121(8):3343-56.

4. Hosui A (1 番目), 他 5 名. Loss of STAT5 causes liver fibrosis and cancer development through increased TGF- β and STAT3 activation. J. Exp. Medicine. 2009, 206:819-831

[学会発表] (計 10 件)

1. Hosui A, STAT5 plays a crucial role in hepatic lipid metabolism through regulation of CD36 expression, American Association for the Study of Liver Diseases, 2011 年 11 月 2 日、米国サンフランシスコ

2. 法水 淳, DNA メチル化による STAT5a 発現低下が肝発癌に及ぼす影響、DDW (日本肝臓学会大会)、2011 年 10 月 22 日、福岡

3. 法水 淳, STAT5 発現低下を介した肝脂肪化の機序の検討、日本肝臓学会総会 2011 年 6 月 2 日、東京

4. Hosui A, The role of IFN-STAT1 signal transduction on inhibition of HCC development, American Association for the Study of Liver Diseases, 2010 年 10 月 30 日、米国ボストン

5. 法水 淳, 肝癌進展抑制に対する IFN-STAT1 活性化、抗 VEGF 抗体の役割に

関する検討、JDDW、2010年10月14日、
横浜

6. Hosui A、The role of IFN-STAT1 signal transduction on inhibition of HCC development、日本癌学会、2010年9月22日、大阪

7. 法水 淳、肝癌進展抑制に対するIFN-STAT1活性化の役割、日本肝癌研究会、2010年7月9日、大阪

8. 法水 淳、IFN-STAT1活性化が肝癌進展に及ぼす影響の検討、日本肝臓学会総会、2010年5月28日、山形

9. 法水 淳、肝細胞特異的STAT5欠損マウスにおける肝線維化・発癌の分子機構、日本肝臓学会総会、2009年6月4日、神戸

10. 法水 淳、肝発癌過程におけるSTAT5の役割、日本消化器病学会総会、2009年5月9日、札幌

[図書] (計 2 件)

1. 法水 淳 他、メディカルレビュー社、The GI FOREFRONT、2009、3ページ

2. 法水 淳 他、科学評論社、月刊 消化器科、2009、5ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

法水 淳 (HOSUI ATSUSHI)
大阪大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号：10536882

(2) 研究分担者

竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70335355

(3) 連携研究者

()

研究者番号：