

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25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22591428

研究課題名（和文）

EGCGによるAP-1を介した肝細胞癌発生抑制に関する研究

研究課題名（英文）Prevention of hepatocellular carcinoma development through inhibition of AP-1 by EGCG

研究代表者

藤井 努 (FUJII TSUTOMU)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60566967

研究成果の概要（和文）：

EGF 遺伝子導入マウスの肝臓組織を採取したところ、c-jun の発現が増加し、AP-1 の活性が上昇していることが示された。また、同マウスに EGCG を経腹膜投与することにより、肝細胞癌発生が抑制された。これは、我々が以前に示した *in vitro* の結果を、*in vivo* で実証する結果となった。さらに、切除したヒト肝臓組織のシグナル伝達経路を検討したところ、c-jun 活性が高発現しているものは低発現群より無再発生存率が有意に低いことが示された。

研究成果の概要（英文）：

In the liver cancer tissue of EGF transgenic mice, the increased expression of c-jun and activity of AP-1 were shown to increase. In addition, the intraabdominal administration of EGCG suppressed hepatocarcinogenesis. These *in vivo* results were similar to *in vitro* ones that we revealed previously. Furthermore, when we examined the signaling pathways of human liver cancer tissue, the recurrence-free survival in patients with higher expression of c-Jun was significantly lower than that in patients with lower expression of c-jun.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：EGCG, AP-1, EGF, 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

肝細胞がんは世界で6番目に多い固形がんであり、その患者数は世界的に増加傾向にある。いくつかの集学的治療が行われているが、その長期予後は決して良いとは言

えない。近年では欧米を中心に、高危険群である患者集団に対し代替治療としての「スクリーニングと発がん予防の導入」が提唱され始めている。しかしこの分野での日本での研究は立ち遅れていると言わざる

を得ず、国内におけるこの分野の発展、特にそれが最も必要と考えられる肝細胞がんでの研究の必要性を強く感じていた。研究代表者は、米国 Harvard 大学 Massachusetts General Hospital Cancer Center, Division of Surgical Oncology に 2006 年 7 月から 2008 年 10 月まで在籍し、この分野の研究活動を行った。その研究成果の一つとして、上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor; EGF) の遺伝子多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) が、肝硬変患者の肝組織中及び血清中の EGF 量に有意に相関し、更に発がんリスクを高めることを報告した (Tanabe KK et al, JAMA 2008)。EGF とその受容体である Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) は正常上皮組織細胞の増殖・分化刺激に深く関与している。これらにおいて遺伝子増幅や遺伝子変異、構造変化が起きると、発癌、および癌の増殖、浸潤、転移などに関与するようになることは既に明らかになっている。実際、EGF を遺伝子導入したマウスには肝癌が高発現することが知られている。EGFR (c-ErbB1, HER1) は腎癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、頭頸部癌、卵巣癌、胃癌、大腸癌、乳癌などで過剰発現の報告が認められ、その過剰発現は予後不良因子であるとされる。しかし、もっともがん発生防止が生存率改善に寄与すると考えられる肝細胞がんにおいて、EGF-EGFR の果たす役割はいまだ十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

がんは非常に複雑、かつ多様なメカニズムにより発生、増殖するため、単一の遺伝子変異の解析に基づいた治療方法では治癒せしめることは極めて困難である。近年では、以前のような抗がん作用に関する研究のみならず、がんの発生と悪性形質転換の機序を解析することにより、オーダーメイド治療やがん発生予防に主眼を置いた研究も幅広く行われるようになってきた。

多くの固形がんの中でも肝細胞がんは非常に特殊なものであるといえる。抗腫瘍薬が他のがん種と同様に決して有効ではないのに加え、肝組織自体が既にかん発生母地となっていることが、治療をより困難なものとしている。その観点から、肝細胞がんは抗腫瘍治療以上に、がん発生機序の解析、発がん抑制が非常に重要であるといえる。我々の研究は、肝細胞がん発生の機序をシグナル伝達経路を中心に解析し、発がんを抑制する方法 (化学予防) の具現化を目指すものである。

具体的には、われわれは既に *in vitro* での実験系において、正常肝細胞の悪性転換

における EGF-EGFR の役割を明らかにしている (論文投稿中)。肝細胞の悪性形質転換を検討するため、寒天培地上でヒト正常肝上皮細胞株である THLE-5B を培養した。さらに、従来のような上層培地も培養細胞を含めて寒天で固める寒天培地アッセイではなく、上層培地を通常のメディウムとした実験系を開発した。これは同実験系の工夫であり、この手技により形成されたコロニーと単細胞との分離採取が可能となり、EGF による肝細胞形質転換のシグナル伝達経路の解析が可能となった。EGF 添加培地のコロニーでは、EGF 無添加のものとは比べて p-Akt と p-STAT3 の発現は変わらなかったが、p-ERK の発現は減少し、p-c-jun の発現は増加していた。この結果に合致して、c-jun 阻害薬 SP600125 は形質転換を抑制した。c-Jun は c-fos などと二量体を形成し、転写因子 Activator Protein-1 (AP-1) として細胞増殖、分化、アポトーシス、癌転移などにおいて機能することが知られている。ELISA 法による転写因子-DNA 結合アッセイでは、EGF 導入により形成されたコロニーでは、AP-1 活性が上昇していることが示された。

また、他のがん種で化学予防活性を持つとされるいくつかの物質を用いて形質転換への作用を検討したところ、Epigallocatechin Gallate (EGCG) という緑茶に含まれるカテキンの 1 種が、細胞毒性を示すことなく悪性形質転換を抑制した。EGCG を更に添加したコロニー、単細胞における Western Blot 解析では、EGCG は c-jun 活性を抑制し、更に AP-1 活性も抑制した。

以上より、*in vitro* では、EGF によるヒト正常肝細胞の悪性形質転換は c-jun を介しており、EGCG により抑制されることまでを解明していた。本研究では、さらにこの機序を *in vivo* で証明し、特にヒト肝細胞癌での発現を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) EGF 遺伝子導入マウスを用いて、EGCG 投与により発がんが抑制されることを示す。EGF 遺伝子導入マウスを購入し、EGCG を投与する。投与は、経口と経腹膜の両者を検討する予定である。通常であれば高率に肝細胞がんが発生するが、EGCG 投与群では発がんが抑制されることを示す。

(2) 肝組織を採取し、遺伝子学的な検討を行う。

それらから採取した肝組織から、c-jun や AP-1 の活性を遺伝子学的に解析する。発がん抑制効果の大小により、遺伝子学的な背景が異なることが予想される。発がん抑制が、*in vivo* でも *in vitro* と同様の機序で

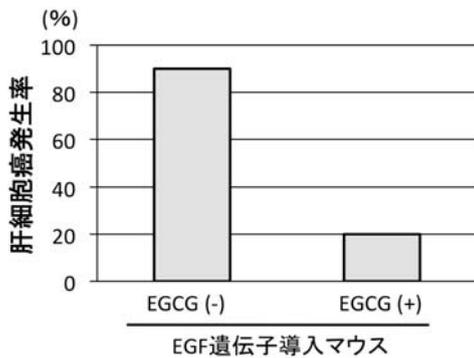
あることを確認するとともに、遺伝子学的背景による効果の差を解析する。

(3) ヒト切除肝組織におけるシグナル伝達経路の遺伝子発現と臨床病理学的因子とを比較検討する。

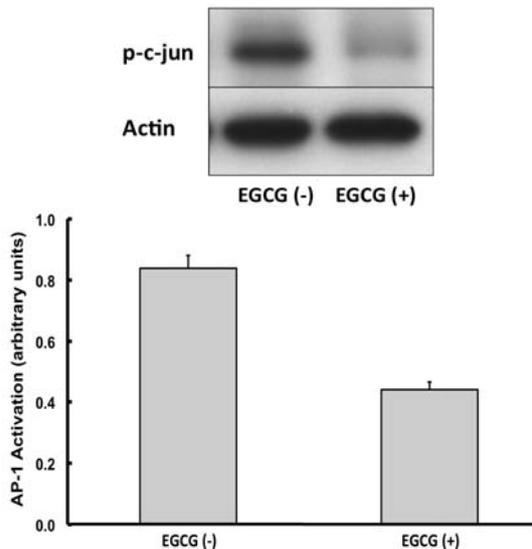
ヒト肝組織におけるシグナル伝達経路に関与する遺伝子発現を、in vitro モデル、動物モデルと同様の手法で、Western Blot 解析、定量 RT-PCR などで解析し、各患者の臨床病理学的因子との相関を統計学的に比較検討する。

4. 研究成果

EGF 遺伝子導入マウスは肝癌が高率に発生することは知られている。この肝癌組織を採取したところ、c-jun の発現が増加し、AP-1 の活性が上昇していることが示された。また、同マウスに EGCG を経腹膜投与したところ、肝細胞癌の発生が有意に抑制された。

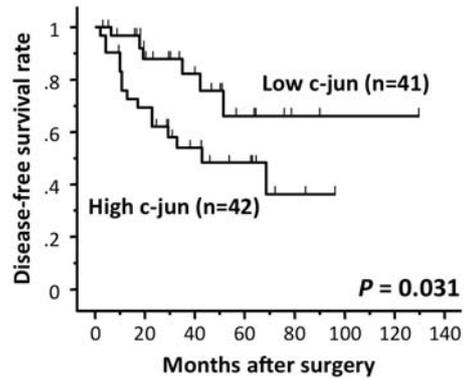


この EGCG 投与マウスに発生した肝癌組織では、非投与マウスと比較して、c-jun の発現、AP-1 の活性は低下していた。



以上の結果より、EGF による肝細胞の悪性形質転換は c-jun を介しており、EGCG により抑制されることが in vivo で証明された。

さらに、切除したヒト肝癌組織においてシグナル伝達経路を検討したところ、c-jun 活性が高発現しているものは低発現群より無再発生存率が有意に低いことが示された。



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 2 件)

① Masamichi Hayashi, Shuji Nomoto, Mitsuro Kanda, Yukiyasu Okamura, Yoko Nishikawa, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Shin Takeda, Yasuhiro Kodera. Identification of the A Kinase Anchor Protein 12 (AKAP12) Gene as a Candidate Tumor Suppressor of Hepatocellular Carcinoma. Journal of Surgical Oncology (査読有) Vol.105 No. 4 P381-386. 2012

② Tsutomu Fujii, Bryan C Fuchs, Suguru Yamada, Gregory Y Lauwers, Yakup Kulu, Jonathan M Goodwin, Michael Lanuti, Kenneth K Tanabe. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. BMC Gastroenterology (査読有) Vol.10 P79. 2010

[学会発表] (計 4 件)

① Tsutomu Fujii, Suguru Yamada, Masaya Suenaga, Norio Okumura, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Shin

Takeda, Yasuhiro Kodera. Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Pancreatic Cancer. The Joint 43rd Meeting of the American Pancreatic Association and the 17th Meeting of the International Association of Pancreatology, 2012.11.2 Miami, Florida

② Bryan C. Fuchs1, Yujin Hoshida, Tsutomu Fujii, Suguru Yamada, Gregory Y. Lauwers, Christopher M. McGinn, Lan Wei, Toshihiko Kuroda, Michael Lanuti, Supriya Gupta, Andrew Crenshaw, Robert Onofrio, Bradley Taylor, Wendy Winckler, Todd R. Golub, Kenneth K. Tanabe. EGFR Inhibition Prevents Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. AASLD (The American Association for the Study of Liver Diseases) 62nd Annual Meeting and Postgraduate CourseThe - Liver Meeting 2011, 2011.11.8 San Francisco, California

③ 山田 豪, F.C. Bryan, 藤井 努, T.K. Kenneth, 中尾 昭公. CC14 肝線維化マウスモデルに対する Erlotinib による抑制効果の検討. 第 15 回日本肝臓学会大会, 2011.10.21 福岡(マリンメッセ福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 努 (FUJII TSUTOMU)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60566967

(2) 研究分担者

杉本 博行 (SUGIMOTO HIROYUKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20437007

野本周嗣 (NOMOTO SHUJI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：40300967

粕谷 英樹 (KASUYA HIDEKI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
准教授
研究者番号：00402636

竹田 伸 (TAKEDA SHIN)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
准教授
研究者番号：20314015

中尾 昭公 (NAKAO AKIMASA)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70167542
(H22 年度)

(3) 連携研究者

連携研究者なし