

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18790483
 研究課題名（和文） サイトカインシグナル制御による肝炎、肝癌の予防
 研究課題名（英文） Prevention of hepatitis and Hepatocellular carcinoma by regulation of cytokine signaling
 研究代表者
 吉田 隆文 （ YOSHIDA TAKAFUMI ）
 久留米大学 医学部 助教
 研究者番号：30368899

研究成果の概要：

肝炎、肝癌の進行において JAK-STAT および Ras-MAPK シグナルの活性化と、これらのシグナルの抑制因子 SOCS、Spred が DNA メチル化などによる発現低下が関与していることを証明した。また、糖尿病や肥満や肝炎、肝癌の増悪に終末糖化産物（AGEs）が関与していることを証明し、さらに網膜色素上皮因子（PEDF）による抑制効果も証明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード：サイトカイン シグナル伝達 肝炎 肝癌

1. 研究開始当初の背景

肝癌は本邦における成人の癌による死因の男性で第三位、女性においても第四位と非常に高い割合を占めており、今後とも増加していくことが確実視されている。肝癌のほとんどは、C型肝炎ウイルスやB型肝炎ウイルスによる慢性肝炎、肝硬変といった肝臓における慢性の炎症を母地として発生することがわかっており、慢性肝炎、肝硬変、肝癌は炎症

を基盤とする一連の疾患として考えられ、その病態解明が肝癌の制圧につながるものと考えられる。

インターロイキンなどのサイトカインは、細胞膜の受容体に結合した後、細胞内の JAK-STAT 系、Ras-MAPK 系といった二つのシグナル伝達経路を介して細胞に情報を伝達することによって、生体の炎症反応のメディエーターとしての機

能を発揮する。また、サイトカインの細胞内シグナル伝達経路である JAK-STAT 系、Ras-MAPK 系は、多くの癌において異常な活性化が認められ、炎症や癌においてこれらのシグナル伝達経路の関連が注目をあびるようになった。

こうした背景をもとに、我々は慢性肝炎の主な原因ウイルスである C 型肝炎ウイルス (HCV) が炎症、発癌に対して及ぼす影響を検討し、C 型肝炎ウイルスの構成蛋白であるコア蛋白が直接的に STAT3 と結合し活性化することによって、炎症や細胞の癌化に寄与することを明らかにした。

SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling-1) は、我々が世界で初めて発見した JAK-STAT 系の生体内抑制因子であるが、我々はこの SOCS-1 遺伝子が肝癌のみならず肝硬変、慢性肝炎においても高頻度に遺伝子のメチル化が起き発現が低下していることを見いだした。そして、SOCS-1 遺伝子ノックアウトマウスを用いた検討により SOCS-1 遺伝子は慢性肝炎から肝硬変、肝癌への進展に対して防衛的に働き、SOCS-1 遺伝子のメチル化は病態進展の予測因子であることを発見した。

我々は、サイトカインシグナル伝達のもう一つの主要経路である Ras-MAPK 系に関しても解析を行ってきた。その中で Ras-MAPK 系の生体内抑制因子である Spred (Sprouty-related EVH-1 protein) のクローニングにも成功した。Ras-MAPK 系は、多くの癌と同様に肝癌においても重要な役割を果たしていることがわかっているが、その詳細な機序に関しては十分な解明はまだなされていない。肝癌における Spred の役割に関する検討を

行うことにより、さらなる肝癌の病態の解明につながるものと期待される。

2. 研究の目的

肝癌における Ras-MAPK 系の生体内抑制因子 Spred の役割を検討していく。ヒト肝癌組織における Spred の発現を測定し、肝癌組織型、悪性度などの臨床的な指標と比較検討する。また、Spred の肝癌細胞への作用を、培養肝癌細胞株に Spred 遺伝子を導入し増殖、転移などへの影響を検討し Spred による肝癌の治療への可能性を見いだしていく。

また近年、肝炎、肝癌の危険因子としての肥満、糖尿病の影響が注目されており、とりわけ肥満、糖尿病患者における終末糖化産物 (AGEs) による肝炎、肝癌の増悪への影響を解析していく。

さらに、AGEs による肝炎、肝癌の増悪に対して網膜色素上皮因子 (PEDF) による抑制効果を検討し治療への応用を検討する。

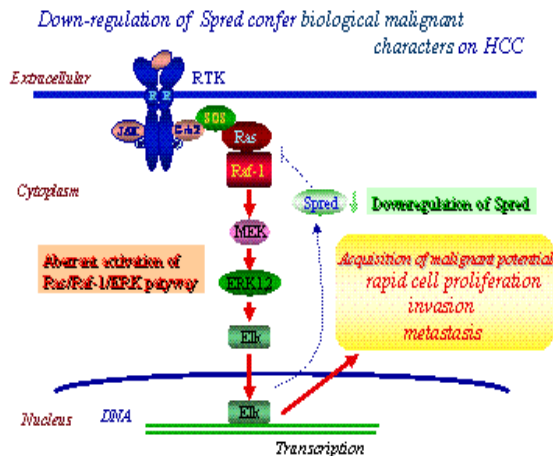
3. 研究の方法

- ① ヒト肝癌組織における Spred の役割の検討: 研究に同意を得られた患者肝癌組織および非癌組織において、Spred の発現をウエスタンブロット及び Real-time PCR 方により定量する。肝癌組織での Spred の発現量と Ras-MAPK 系の活性化度、肝癌組織の組織像を比較し関連を検討する。
- ② 肝癌細胞株に対して、Spred 遺伝子導入による増殖、転移浸潤の抑制効果を確認し、肝癌における Spred の役割を総括する。
- ③ 肝癌細胞株を用いて AGEs による影響をウエスタンブロット及び Real-time PCR 方により定量する。
- ④ マウス脂肪性肝炎モデルにおいて、アデノウイルスベクターを用い PEDF を導入し

脂肪性肝炎や肝癌の治療効果を検討する。

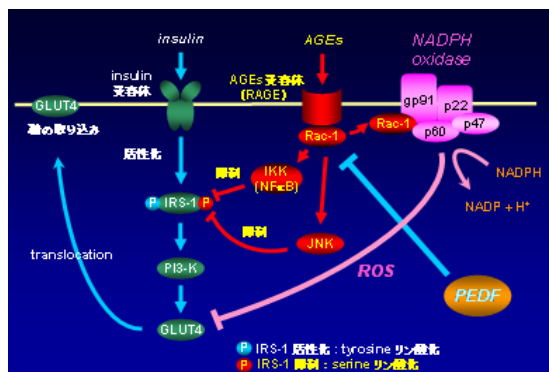
4. 研究成果

- ①肝癌において Spred の発現低下が認められ、Spred の発現量と肝癌の悪性度の関連が認められた。
 - ②さらに Spred の遺伝子導入により肝癌の増殖や転移、浸潤が著明に抑制された。
- これらのことから Spred は肝癌の予後を示す診断指標となり、Spred を標的とした治療の可能性が示された。



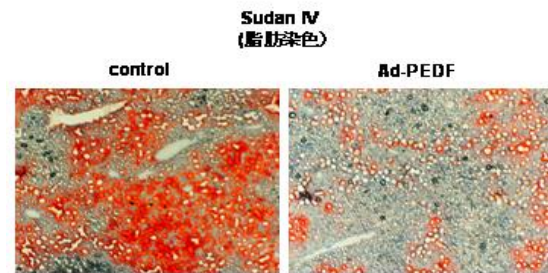
③AGEs は NF- κ B、JNK の活性化により肝におけるインスリン抵抗性を引き起こす。さらに PEDF は AGEs によるインスリン抵抗性を抑制する

肥満、糖尿病によって蓄積された AGEs は肝に対してインスリン抵抗性を惹起し、肥満、糖尿病の増悪だけでなく肝炎、肝癌の発症にも関与していることが示された。



④ PEDF はマウス脂肪性肝炎、肝発癌を抑制する。

PEDF の補充療法による脂肪性肝炎、肝発癌の治療の可能性が示された。



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 11 件)

- ① Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T, Takeuchi M, Koga H, Ueno T, Sata M. (2008). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) ameliorates advanced glycation end product (AGE)-induced hepatic insulin resistance in vitro by suppressing Rac-1 activation. *Horm Metab Res* 査読(有),40(9):620-5.
- ② Yoshida T, Yamagishi S, Matsui T, Nakamura K, Ueno T, Takeuchi M, Sata M. (2008). Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, inhibits advanced glycation end-product (AGE)-elicited hepatic insulin resistance via peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation. *J Int Med Res*. 査読(有)36(2):237-43.
- ③ Nakamura K, Yamagishi S, Matsui T, Yoshida T, Takenaka K, Jinnouchi Y, Yoshida Y, Ueda S, Adachi H, Imaizumi T. (2007). Pigment epithelium-derived factor inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury by blocking NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation. *Am J Pathol*. 査読(有)170(6):2159-70.
- ④ Nagaoka S, Yoshida T, Akiyoshi J, Akiba J, Torimura T, Adachi H, Kurogi J, Tajiri N, Inoue K, Niizeki T, Koga H, Imaizumi T, Kojiro M, Sata M.

(2007) Serum C-reactive protein levels predict survival in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 査読(有)27(8):1091-7.

⑤ Hanada S, Harada M, Kumemura H, Bishr Omary M, Koga H, Kawaguchi T, Taniguchi E, Yoshida T, Hisamoto T, Yanagimoto C, Maeyama M, Ueno T, Sata M.(2007). Oxidative stress induces the endoplasmic reticulum stress and facilitates inclusion formation in cultured cells. *J Hepatol.* 査読(有)47(1):93-102.

⑥ Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T, Takeuchi M, Koga H, Ueno T, Sata M. (2006). Telmisartan inhibits AGE-induced C-reactive protein production through downregulation of the receptor for AGE via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Diabetologia.* 査読(有)49(12):3094-9.

⑦ Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T, Inoue H, Ueno T, Sata M. (2006) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks the interleukin-6 signaling to C-reactive protein expression in Hep3B cells by suppressing Rac-1 activation. *Life Sci.* 査読(有)19;79(21):1981-7.

⑧ Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T, Takeuchi M, Ueno T, Sata M.(2006) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced C-reactive protein expression in hepatoma cells by suppressing Rac-1 activation. *FEBS Lett.* 査読(有)15;580(11):2788-96.

⑨ Selvendiran K, Koga H, Ueno T, Yoshida T, Maeyama M, Torimura T, Yano H, Kojiro M, Sata M. (2006). Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription

3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Res.* 査読(有)1;66(9):4826-34.

⑩ 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. (2006). Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene.* 査読(有)5;25(45):6056-66.

⑪ Ogata H, Chinen T, Yoshida T, Kinjyo I, Takaesu G, Shiraishi H, Iida M, Kobayashi T, Yoshimura A. (2006). Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production. *Oncogene.* 査読(有)25(17):2520-30.

[学会発表] (計 5 件)

① DDW-USA 2006

Los Angeles, USA, 22-25 May 2006

Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. Yoshida Takafumi, Hisamoto Takao, Akiba Jun, Koga Hironori, Nakamura Kazuo, Yano Hirohisa, Kojiro Masamichi, Ueno Takato, Yoshimura Akihiko, Sata Michio.

② EUGMS. 4th Congress of the European Union Geriatric Medicine Society.

Geneva, Switzerland, 23 - 26 August 2006

Telmisartan inhibits AGE-induced C-reactive protein (CRP) production through down-regulation of receptor for AGE (RAGE) via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. Yoshida Takafumi

③ EASL 2007 Barcelona
Overexpression of pigment
epithelium-derived factor (PEDF) prevents
fat storage, inflammation and neoplastic
formation in the liver of mice
steatohepatitis model. Yoshida Takafumi

④九州、北海道がんフォーラム 2007年1月
13日 肝線維化、肝癌におけるサイトカイン
シグナルとその抑制機構の役割 吉田隆文

⑤ 京都肝セルバイオロジー研究会 2008年
7月14日

肝における AGEs (Advanced end glycation
products: 終末糖化産物)によるインスリン
抵抗性と、PEDFによるその抑制効果の検討
吉田隆文

〔図書〕(計1件)

①吉田隆文, メディカルレビュー社,
糖尿病ファーマナビゲーター「NASHとイ
ンスリン抵抗性について」, 2006, 326-329 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 隆文 (YOSDHIDA TAKAFUMI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 30368899