

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701039

研究課題名(和文) B型慢性肝炎におけるTGF-βシグナル伝達機構の臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application of TGF-beta signal in chronic hepatitis B

研究代表者

村田 美樹 (MURATA, Miki)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：10533416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化Smad3シグナル伝達の視点から、B型慢性肝疾患症例に核酸アナログ療法を行い、ウイルス量が低下した後にリン酸化Smad3を介するシグナルがどのように変化したかを検討した。核酸アナログ治療によりHBVウイルスの活動性と慢性炎症が終息すると、pSmad3Lを介する線維化・癌化シグナルは減弱し、pSmad3Cを介する癌抑制シグナルに回帰した。B型慢性肝疾患では抗ウイルス療法により、線維化進展例においても線維化・癌化シグナルが著明に改善するため抗ウイルス療法が肝線維化の改善や発癌リスクの低下に寄与すると推測される。

研究成果の概要(英文)：In our recent studies, HBV clearance at an early stage by anti viral therapy restored hepatocytic TGF-beta signaling from fibro carcinogenesis toward the tumor suppression. Moreover, low pSmad3C and high pSmad3L positivity were significantly predictive of human HCC development. We conclude that pSmad3L and pSmad3C can serve as useful markers determining whether you can defend development of viral related HCC by antiviral therapy. Using an individual's phospho-Smad3 markers, clinicians may be able to achieve more effective chemoprevention and individualized therapy for HBV infected patients.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：Smad3リン酸化 B型慢性肝炎

1. 研究開始当初の背景

我が国での慢性肝炎、肝硬変、肝癌の大部分は、持続的な B 型肝炎ウイルス (HBV) ならびに C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染に起因している。C 型慢性肝炎からの肝発癌には炎症の持続による線維化の進展が重要であるが、B 型が C 型とまったく異なるのは、若年者で、炎症が微弱で線維化があまり進展していない、いわゆる非活動性慢性肝炎や無症候性キャリアからの肝癌が散見される。若年者 B 型肝炎や、早期慢性 B 型肝炎では、エビデンスに基づいた発癌予防を目的とした発癌予知因子の同定が急務である。

このような早期の B 型肝炎患者からの発癌には、炎症の持続や線維化はほとんど関与しておらず B 型肝炎ウイルスの遺伝子組み込み、特に HBV の X 遺伝子領域をコードする HBx が重要であると考えられている。この HBx 蛋白は、肝細胞の細胞増殖シグナルに関わる標的遺伝子の転写活性を刺激し、肝癌が発生すると報告された (Nature 1991, 351: 317-20) また HBx トランスジェニックマウスでは肝癌が誘発される (Hepatology 2004 19: 810-19)。

一方 Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) は、肝細胞に対して強い増殖抑制作用を示す。この効果は肝硬変から肝癌に進展するにつれて減弱する。これらは、TGF- β シグナル伝達異常が、肝病態の進展と密接に関係していることを示している。TGF- β シグナルは、リン酸化された Smad3 と呼ばれる転写因子を介して伝達されることが報告された。Smad3 は、MH1 ドメインと MH2 ドメイン、これら領域間に存在するリンカー部分から構成されている。Smad3 リンカー部は、c-Jun N-terminal kinase (JNK) や Erk などの MAPK によりリン酸化される。Smad3 の C 末端には I 型 TGF- β 受容体によってリン酸化される SXS モチーフが存在する。我々は、これまで Smad3 の部位特異的抗リン酸化抗体を作成し、C 末端がリン酸化した Smad3 (pSmad3C) を介する経路は細胞増殖抑制に関与し、リンカー部リン酸化 Smad3 (pSmad3L) を介する経路は、癌細胞の増殖・浸潤と深い関わりがあると、報告してきた (Cancer Res 2007, 67: 5090-96; Hepatology 2007, 46: 48-57; Cancer Res 2005, 65: 157-65; American Journal of Pathology 2005, 166: 1029-39; Oncogene 2004, 23: 7416-29; Hepatology 2003, 38: 879-89; Oncogene 2003, 22: 2309-21; Hepatology 2002, 35: 49-61; Cancer Res 2000, 60: 1394-402; Hepatology 2000, 32: 218-27)。

ウイルス性肝炎では癌化過程の進展に伴い pSmad3L 依存の癌化シグナルが優位になり、一方で pSmad3C 細胞増殖抑制シグナルは減弱していた (図 1)。さらに、C 型肝炎において HCV の持続的な感染に伴う宿主側の反応 (慢性炎症) が、癌抑制から癌化

シグナルへの転換を誘発する重要な因子であると報告した (Hepatology 2007, 46: 48-57)。しかし早期慢性 B 型肝炎においては B 型肝炎ウイルス自体が、癌化シグナルへの転換を直接誘導していた (Hepatology 2009, 49: 1203-17)。

2. 研究の目的

B 型肝炎においては抗ウイルス療法を行うことで癌化シグナルを抑制できる可能性が示唆される。そこで今回は B 型肝炎の治療前後での Smad3 を介するシグナル伝達の変化に着眼し研究を行った。

3. 研究の方法

インフォームドコンセントで同意の得られた B 型肝炎・肝硬変症例の中で、インターフェロン療法あるいは核酸アナログ療法を予定している 20 症例または治療中の 20 症例を選択する。治療前後で血液・生化学データ、背景肝組織 (新犬山分類による肝線維化ならびに炎症程度の評価)、および Smad3 リン酸化状態を調べ、比較検討する。さらに、HBx 導入肝細胞を作成し、in vitro での Smad3 リン酸化状態を検討する。

(1) 症例の選択

B 型肝炎・肝硬変に対しては、インフォームドコンセントの得られた核酸アナログ療法を予定している 20 症例または治療中の 20 症例を選択し、肝組織での Smad3 リン酸化状態は治療前後の 2 回の肝生検材料を用いる。治療後の肝生検は治療開始後 18 ヶ月目に行う。

(2) 抗ウイルス療法前後のヒト肝組織におけるリン酸化 Smad3 の細胞内局在

免疫組織染色によるリン酸化 Smad3 の細胞内局在の検討

パラフィン包埋後、切り出した肝生検組織を上記の部位特異的抗 Smad3 リン酸化抗体と結合させる。その後、ペルオキシダーゼでラベルした 2 次抗体を加え DAB で発色させることでリン酸化 Smad3 の細胞内局在を調べる。さらに、標的遺伝子 (p21WAF1, Bcl-2, c-Myc ならびに PAI-1) とリン酸化 Smad3 の Co-localization を免疫蛍光抗体法で解析する。

ウエスタンブロット法による Smad3 のリン酸化組織をホモゲナイズし電気泳動後、当研究室で作製した Smad リン酸化抗体にてウエスタンブロット法にて Smad2/3 のリン酸化状態を検討する。

Smad3 リン酸化酵素の検討

TGF- β 刺激により活性化される酵素として、Erk, JNK, p38 などが報告されている。これらに対する抗体を用いた免疫沈降を、大腸菌で作成したリコンビナント GST-Smad2 並びに GST-Smad3 と混合し、ATP を加えキナーゼ反応を行う。Smad2,3 のリン酸化状態は、部位特異的リン酸化抗体を用いたウエスタンブ

ロット法で検討する。

ELISA 法による検討

リン酸化抗体を用いた ELISA 法により、Smad3 のリン酸化状態を定量化する。

(3) B 型慢性肝炎における Smad3 リン酸化の推移と臨床経過との比較検討

抗ウイルス療法前後の血液・生化学データ

治療前後での末梢血液中トランスアミナーゼ値、血小板の他、肝予備能としてプロトロンビン時間、アルブミン、コリンエステラーゼ活性、線維化マーカーとして 4 型コラーゲン、ヒアルロン酸を測定する。

背景肝の評価

肝生検組織の HE 染色、渡銀染色により炎症 (Activity) 及び線維化 (Fibrosis) の程度を検討する。新犬山分類を用い、壊死・炎症所見は活動性 (A0) 軽度活動性 (A1) 中等度活動性 (A2) 高度活動性 (A3) で区別し、線維化所見は線維化なし (F0) 軽度門脈域の拡大 (F1) 線維性架橋形成 (F2) 小葉構築 (F3) 肝硬変 (F4) で評価する。

肝発癌の確認

肝発癌は、抗ウイルス療法後に血清腫瘍マーカー (AFP と PIVKA-II) を 1 ヶ月毎測定すると共に、腹部超音波検査を 6 ヶ月毎、ダイナミック CT を 1 年毎施行することで早期発見を心がける。新しい肝腫瘍が確認された場合、EOB-MRI ならびに肝生検で確定診断する。

Smad3 リン酸化の推移と臨床経過

抗ウイルス療法前後での pSmad3L 及び pSmad3C のリン酸化の推移をグラフ化し、統計学的処理をする。さらに血液検査データ、肝組織像 (炎症及び線維化) の変化、肝発癌、予後との関連性についても統計学的に検討する。

(4) HBx 導入肝細胞を用いた Smad3 リン酸化の変遷

HBx の培養幹細胞への遺伝子導入

HBx 遺伝子のラット肝細胞 (Clone9 細胞) へ導入し、TGF- β シグナル伝達を *in vitro* で解析する。

TGF- β 刺激に伴う Smad3 の部位特異的リン酸化に関する検討

・ TGF- β 添加 30 分後、細胞を抽出する。抗 Smad2,3 抗体で免疫沈降後、部位特異的抗 Smad2,3 リン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法で検討する。

・ Smad リン酸化が JNK を介しているかを確かめるために *in vitro* kinase assay を用いて Smad2,3 リン酸化を検討する。

・ 標的遺伝子 (p21WAF1, Bcl-2, c-Myc, PAI-1) の発現の検討。

・ TGF- β 刺激に伴う分子生物学的機能を検討するため 3H-Thymidine の取り込みによる DNA 合成能を解析し、細胞増殖能を確かめる。

Smad3 リンカー部リン酸化阻害によるシグナル伝達の偏向

・ HBx 導入肝細胞に Smad3 のリンカー部を特異的にブロックする変異遺伝子 (Smad3EPM) を導入した細胞を作成する。

・ 親株 HBx 導入肝細胞同様に、TGF- β 添加 30 分後、細胞を抽出する。抗 Smad2,3 抗体で免疫沈降後、部位特異的抗 Smad2,3 リン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法で検討する。

・ 標的遺伝子発現を確認する。

・ 3H-Thymidine の取り込みによる DNA 合成能を解析し、親株 HBx 導入細胞と比較検討する。

培養肝細胞における JNK 阻害剤による Smad3 リン酸化の検討

・ 培養肝細胞に JNK 阻害剤を加え、TGF- β 添加 30 分後、細胞を抽出する。抗 Smad2,3 抗体で免疫沈降後、部位特異的抗 Smad3 リン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法で検討する。

・ JNK 阻害剤存在下、または非存在下で TGF- β 添加し 24 時間後に培養肝細胞に 3H-Thymidine を添加し、3 時間の取り込みをシンチレーションカウンターにて測定する。

核酸アナログ製剤添加による Smad3 リン酸化の検討

・ HBx 導入肝細胞に核酸アナログ製剤存在下で培養し、細胞の形態変化を観察する。

・ 核酸アナログ製剤存在下、非存在下において部位特異的抗 Smad3 リン酸化抗体で TGF- β 添加前後の細胞内局在を調べ、核移行につき検討する。

・ 標的遺伝子 (p21WAF1, Bcl-2, c-Myc, PAI-1) の発現を、核酸アナログ製剤存在下、非存在下で TGF- β 添加前後の mRNA の発現で比較検討する (ノーザンブロット法)。

4. 研究成果

リン酸化 Smad3 シグナル伝達の視点から、B 型慢性肝疾患症例に核酸アナログ療法を行い、ウイルス量が低下した後にリン酸化 Smad3 を介するシグナルがどのように変化したかを検討し、さらに抗ウイルス療法後の B 型と C 型慢性肝疾患の病態を比較した。

核酸アナログ治療を施行した B 型慢性肝疾患 27 症例を対象に薬剤投与前、および投与 52 週間後に肝生検を施行した。投与前後の肝組織と Smad3 のリン酸化・標的遺伝子発現を比較検討した。

核酸アナログ投与で HBV-DNA 量の低下と炎症の改善に伴い、Smad3L リン酸化ならびに標的遺伝子である c-Myc の発現の著明な減少がみられ、抑えられていた pSmad3C を介する癌抑制シグナルの復活を認めた。C 型慢性肝疾患においても IFN 治療によってウイルスが消失した後に pSmad3L シグナルから pSmad3C へのシグナルの変遷が見られた。抗ウイルス療法による肝線維化 (F 因子) の改善について検討した結果、B 型慢性肝疾患では F4 から F1 へ改善した症例もあり、平均 1.0/年の割合で著明に改善した。一方 C 型慢性肝疾患では F 因子 0.2/年の割合で緩徐な改善であった。

さらに pSmad3L を介する線維化・癌化シグナルは治療後に B 型慢性肝疾患で 1.0/年低下を示したが、C 型慢性肝疾患では 0.5/年に留まり、肝組織での線維化の改善を反映する結果であった。

核酸アナログ治療により HBV ウイルスの活動性と慢性炎症が終息すると、pSmad3L を介する線維化・癌化シグナルは減弱し、pSmad3C を介する癌抑制シグナルに回帰した。B 型慢性肝疾患では抗ウイルス療法により、線維化進展例においても線維化・癌化シグナルが著明に改善するために C 型慢性肝疾患と比較して、より抗ウイルス療法が肝線維化の改善や発癌リスクの低下に寄与すると推測された。

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 1 件)

B 型慢性肝炎における TGF- β シグナル伝達
村田 美樹
関西医科大学雑誌 62 巻 p13-39 2011 年

[学会発表](計 6 件)

癌化・線維化シグナルからみた抗ウイルス療法後の C 型慢性肝疾患の病態について検討

村田 美樹
第 40 回日本肝臓学会西部会
2013 年 12 月 6 日 長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜)

B 型慢性肝疾患における癌化・線維化シグナルの検討

村田 美樹
第 49 回日本肝臓学会総会
2013 年 6 月 7 日 京王プラザ(東京)
Reversible or irreversible phospho-Smad2/3 signaling

Miki Murata
TGF- β シグナル国際シンポジウム
2012 年 10 月 29 日 昭和薬科大学(東京)
B 型慢性肝炎における TGF- β シグナル伝達機構の臨床応用

村田 美樹
第 48 回日本肝臓学会総会
2012 年 6 月 7 日 全日空ホテル(金沢)
B 型、C 型慢性肝疾患における抗ウイルス療法後の癌化、線維化シグナルの検討

村田 美樹
第 39 回日本肝臓学会西部会
2011 年 12 月 9 日 岡山コンベンションセンター(岡山)

B 型慢性肝疾患の線維化・癌化シグナルは、核酸アナログ治療後、癌抑制シグナルに回帰する

村田 美樹
第 47 回日本肝癌研究会
2011 年 7 月 28 日 静岡コンベンションアーツセンター(静岡)

[図書](計 1 件)

Miki Murata, Katsunori Yoshida, Koichi Matsuzaki.

Early chronic inflammation and subsequent somatic mutations shift phospho-Smad3 signaling from tumor-suppression to fibro-carcinogenesis in human chronic liver diseases. In: Ahmed O. Kaseb (ed). Hepatocellular carcinoma-future outlook. InTech,Croatia;2013. p113-142.
<http://dx.doi.org/10.5772/56739>.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
村田 美樹(MURATA Miki)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10533416

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: