

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790724

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変症の新たなバイオマーカーと免疫療法の検討

研究課題名(英文) New biomarkers of primary biliary cirrhosis

研究代表者

吉田 勝紀 (Yoshida, Katsunori)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：00411554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PBCおよび慢性C型肝炎のどちらも病期が進行するにつれて肝癌を発症する。しかし、PBCでは肝癌はまれであるがそのメカニズムは不明である。そこで、TGF $\beta$ シグナルの面から検討を行った。どの病期においても慢性C型肝炎と比較するとPBC症例では、細胞増殖・線維化に関わるSmad3リン酸化程度は低く、癌抑制に関わるpSmad3C経路は保たれており肝発癌が少ないと考えられた。しかし、発癌したPBC症例では、診断当時から高Smad3リン酸化状態を呈していた。診断時から発癌シグナルが高いPBC症例では早期に肝硬変に進行し、発癌する危険性が高く慎重な経過観察が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chronic liver inflammation and hepatic regeneration induced by host cellular immune responses can increase the risk of HCC development. To investigate the mechanisms of fibrocarcinogenesis in PBC, we studied 45 PBC not developing HCC (Stage I: 16, II:13, III:13, IV:3) and 6 PBC developing HCC. We performed immunohistochemical analysis using our phospho-Smad3 antibodies. As PBC livers progressed from chronic hepatitis through cirrhosis to HCC, hepatocytic linker phosphorylated Smad3 (pSmad3L) increased with fibrotic stage and C-terminal phosphorylated Smad3 (pSmad3C) decreased. We conclude chronic inflammation contributes directly to fibrocarcinogenesis by shifting hepatocytic Smad3-mediated signaling from tumor suppression to oncogenesis both in PBC. These data also suggest pSmad3L can be new biomarker for HCC and high pSmad3L group need careful surveillance for early detection of HCC.

研究分野：消化器内科

キーワード：PBC TGF- $\beta$  Smad

1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  は成熟肝細胞表面にある II 型受容体に結合して I 型受容体を活性化させ、Smad3 をリン酸化させる。COOH 末端がリン酸化した Smad3 (pSmad3C) は、核移行した後、p21<sup>waf1</sup> 遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を活性化させることで細胞増殖は停止し、Bcl-2 の発現を抑制することでアポトーシスを誘導すると報告されている(1)。そして、最終的に細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導などの癌抑制シグナルに関わる。

一方、リン酸化 Smad を介した 2 つ目のシグナル経路として、リンカー部がリン酸化した Smad3(pSmad3L)経路が挙げられる。我々は慢性ウイルス性肝炎において HBx タンパクなどのウイルスを構成する発癌関連分子、慢性炎症に伴い分泌される炎症性サイトカイン、ならびに変異した宿主側関連遺伝子などが細胞質に存在する c-Jun N-terminal kinase(JNK) を活性化させリンカー部がリン酸化されると報告した。そして、核に移行した pSmad3L は pSmad3C と全く異なる c-Myc 遺伝子の発現を刺激して細胞増殖を亢進させ、plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1)などの転写を活性化して細胞外マトリックスの蓄積を促すと報告してきた(2)(3)(4)(5)(6)(7)。特筆すべき事象として、pSmad3L が形成されると pSmad3C が形成されなくなることが挙げられる。したがって、pSmad3L を介する癌化シグナルと pSmad3C を介する癌抑制シグナルは、相反する関係にある。さらに、JNK 活性化の阻害やリンカー部リン酸化部位をリン酸化されないアミノ酸に置換した Smad3 でリンカー部のリン酸化を特異的にブロックすると pSmad3C を介する経路への回復が観察される。

この現象は、培養細胞のみならず、動物実験でも確認された。マウス肝癌モデルにおいて JNK inhibitor を投与すると pSmad3L 経路から pSmad3C 経路への転換が観察され、発癌が有意に抑制されると、長田らは報告した(8)。リンカー部リン酸化 Smad を介するシグナルは、TGF- $\beta$ シグナルの細胞特異性を理解する上で重要であり、我々以外にも多くの論文が報告されるようになってきている(9)(10)(11)。

肝細胞癌の多くは肝炎ウイルスやアルコール、PBC などの自己免疫性肝疾患がおこす慢性炎症が関与している。ウイルスの伴った肝発癌と比較し PBC からの発癌はまれであるが少なからず散見される。肝線維化と癌化には深い関係があると言われているが、両者をつなぐ分子メカニズムについては不明瞭な点が多く残っている。我々は、慢性 C 型肝炎の肝組織を用いて Smad のリン酸化の検討を行い、肝細胞において、C 型肝炎ウイルスの持続感染と宿主側変異遺伝子により、pSmad3C

を介する癌抑制シグナルが、中央部にある pSmad3L を介する癌化・線維化シグナルへシフトするため、線維化程度に比して発癌しやすい環境が形成されると報告した。

2. 研究の目的

ウイルスが関係しない原発性胆汁性肝硬変症(PBC)における線維化・発癌メカニズムについて、慢性 C 型肝炎症例と比較検討した。

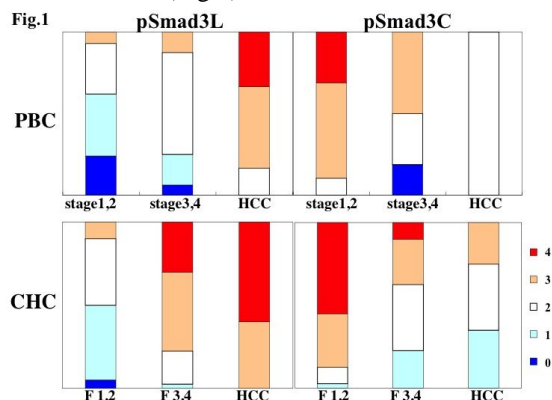
3. 研究の方法

1991 年から 2014 年までの間、関西医科大学附属病院で行った肝生検標本

非発癌PBC 45例 (stage I: 16例、II: 13例、III: 13例、IV: 3例)、発癌症例6例と慢性C型肝炎80例 (F1: 20例、F2: 20例、F3:20例、F4: 20例)、発癌症例20例を対象とした。我々が作成したリン酸化Smad抗体を用いた免疫組織染色を行った。リン酸化の度合いはリン酸化された肝細胞の割合に応じて以下のようなスコアリングを行った。0%; 0, 25%未満; 1, 25%以上50%未満; 2, 50%以上75%未満; 3, 75%以上; 4、として肝細胞におけるSmadのリン酸化状態を検討した。

4. 研究成果

非発癌 PBC および慢性 C 型肝炎のどちらも Stage が進行するにつれて pSmad3L は亢進した。しかし、どの Stage においても慢性 C 型肝炎と比較すると非発癌 PBC 症例では、細胞増殖・線維化に関わる Smad3L リン酸化程度は低く、癌抑制に関わる pSmad3C 経路は保たれていた。(Fig.1)



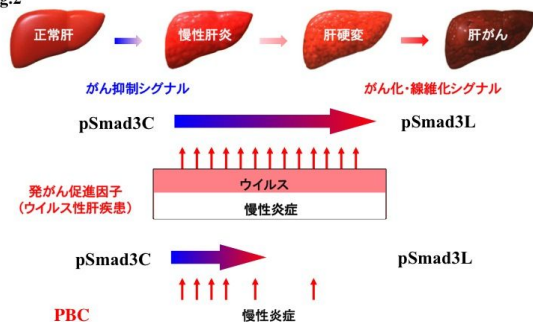
PBC、C 型肝炎からの発癌症例では、どの疾患においても、線維化進行症例に限られており、高 Smad3L リン酸化・低 Smad3C リン酸化群に属していた。しかし、発癌した PBC 症例では、診断当時から高 Smad3L リン酸化状態を呈していた。(Fig.1)

pSmad3L の標的遺伝子である c-Myc と pSmad3C の標的遺伝子である p21<sup>waf1</sup> について検討を行った。無発癌群の c-Myc 発現は、治療後有意に低下していたが、p21<sup>waf1</sup> は上昇していた。一方発癌群の c-Myc は、高い状態が維持され、p21<sup>waf1</sup> は低いままであった。

C 型肝炎ではウイルスと慢性炎症が協調して癌化線維化シグナルを促進しているも

のと報告した。PBC では慢性 C 型肝炎と比較して、発癌シグナルの亢進が進まず、癌抑制シグナルを保持しているために、肝細胞癌の発生が少ないものと考えられた。(Fig.2)

Fig.2



C型肝炎ウイルスの持続感染に伴う慢性炎症は、線維化の進展と同時に肝発癌のリスクを高める。一方で、PBC では発癌率がウイルス性肝炎と比較すると低い。PBC では慢性炎症のみで肝炎ウイルス由来発がん関連分子ならびに慢性炎症の役割が次第に宿主側遺伝子変異あるいはエピジェネティック変化が少ないためと考えられる。

PBC においても炎症や線維化が進行するとともに高発がん状態となっていた。それは、炎症局所に浸潤してくるクッパー細胞などにより産生された炎症性サイトカインは、肝細胞上の特異的受容体と結合することにより、発がん関連分子によって活性化していた JNK/pSmad3L 経路を効果的に増強するためと考えられる。pSmad3L 経路は c-Myc の転写を誘導し、肝細胞の増殖をサポートする。更に pSmad3L 分子の増加は pSmad3C 分子の減少を招き、pSmad3C を介するアポトーシスの抑制により、変異遺伝子の溜まりやすい肝細胞ができる。炎症性サイトカイン刺激に対する持続的な炎症局所肝細胞の応答は、このようにして発がんプロモーターとしての作用をもたらす。もしこの状況が長期間にわたり持続すれば、変異がん遺伝子が蓄積したがん前駆肝細胞が誕生し、その後の発がんプロセスが加速してゆくと推察される。

Smad3 には C 末部分のみならずリンカー部にもリン酸化部位がありその生物学的な検討をするために部位特異的な抗体作製を我々は行ってきた。特に pSmad3L は C 型慢性肝炎の肝線維化のみならず発癌にも非常に関係していることが判明したため今回、PBC における発癌のリスクの違いについて pSmad3L のリン酸化についての検討をおこなった。ウイルス性慢性肝炎症例と PBC を比較すると、多くの症例の pSmad3L を介する線維化・がん化シグナルは PBC で低く、pSmad3C を介するがん抑制シグナルは PBC で優位に高かった。そのため、PBC からの発がんは殆どみられなかった

と考えられる。しかし病態が進行した肝硬変症例においては、遺伝子変異あるいはエピジェネティック変化が pSmad3L 経路を恒常的に活性化してしまい、発がんリスクも高くなると考えられた。

Smad3 のシグナル伝達の変遷を検討することは、慢性肝炎患者が高発癌状態かどうかを判断する臨床基準に結びつくと期待された。診断時から発癌シグナルが高い PBC 症例では早期に肝硬変に進行し、発癌する危険性が高く慎重な経過観察が必要であると同時に発癌阻止を目指した次のアジュバント療法を行う必要があることが示唆された

引用文献)

1. Derynck R MK. The TGF- $\beta$  signaling: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2008.
2. Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yamagata H, Furukawa F, Seki T, et al. Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am J Pathol* 2005;166:1029-1039.
3. Yamagata H, Matsuzaki K, Mori S, Yoshida K, Tahashi Y, Furukawa F, Sekimoto G, et al. Acceleration of Smad2 and Smad3 phosphorylation via c-Jun NH(2)-terminal kinase during human colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 2005;65:157-165.
4. Sekimoto G, Matsuzaki K, Yoshida K, Mori S, Murata M, Seki T, Matsui H, et al. Reversible Smad-dependent signaling between tumor suppression and oncogenesis. *Cancer Res* 2007;67:5090-5096.
5. Matsuzaki K, Murata M, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Kaibori M, et al. Chronic inflammation associated with hepatitis C virus infection perturbs hepatic transforming growth factor beta signaling, promoting cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2007;46:48-57.
6. Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, Sekimoto G, Tahashi Y, Mori S, Uemura Y, et al. Hepatitis B virus X protein shifts human hepatic transforming growth factor (TGF)-beta signaling from tumor suppression to oncogenesis in early chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009;49:1203-1217.
7. Matsuzaki K, Kitano C, Murata M, Sekimoto G, Yoshida K, Uemura Y, Seki T, et al. Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-beta signal in

later stages of human colorectal cancer. *Cancer Res* 2009;69:5321-5330.

8. Nagata H, Hatano E, Tada M, Murata M, Kitamura K, Asechi H, Narita M, et al. Inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase switches Smad3 signaling from oncogenesis to tumor-suppression in rat hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;49:1944-1953.

9. Alarcon C, Zaromytidou AI, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, Barlas A, et al. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* 2009;139:757-769.

10. Millet C, Yamashita M, Heller M, Yu LR, Veenstra TD, Zhang YE. A negative feedback control of transforming growth factor-beta signaling by glycogen synthase kinase 3-mediated Smad3 linker phosphorylation at Ser-204. *J Biol Chem* 2009;284:19808-19816.

11. Sasseville M, Ritter LJ, Nguyen TM, Liu F, Mottershead DG, Russell DL, Gilchrist RB. Growth differentiation factor 9 signaling requires ERK1/2 activity in mouse granulosa and cumulus cells. *J Cell Sci*;123:3166-3176.

#### 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 8 件)

1. TGF-β/Smad signaling during hepatic fibro-carcinogenesis (Review). 査読あり Yoshida K, Murata M, Yamaguchi T, Matsuzaki K. *Int J Oncol*. 2014;45:1363-1371
2. Reversible phospho-Smad3 signaling between tumor-suppression and fibro-carcinogenesis in chronic hepatitis B infection. 査読あり Deng, Y.R., Yoshida, K., Jin, Q., Murata, M., Yamaguchi, T., Tsuneyama, K., Moritoki, Y., Niu, J., Matsuzaki, K., Lian, Z.X. 査読あり *Clinical and Experimental Immunology*. 2014 Apr;176(1):102-11. doi: 10.1111/cei.12259.
3. Smad3 phospho-isoform signaling in hepatitis C virus-related chronic liver diseases. 査読あり Yamaguchi T, Yoshida K, Murata M, Matsuzaki K. *World J Gastroenterol*. 2014 Sep 21;20(35):12381-90. doi: 10.3748/wjg.v20.i35.12381.
4. Linker phosphorylation of Smad3 promotes fibro-carcinogenesis in chronic viral hepatitis of hepatocellular carcinoma. 査読あり Murata M, Yoshida K, Yamaguchi T, Matsuzaki K. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 7;20(41):15018-27. doi: 10.3748/wjg.v20.i41.15018.
5. Perturbation of transforming growth factor-b

signaling during human hepatic fibro-carcinogenesis: from bench to bedside. 査読あり

Yoshida K, Murata M, and Matsuzaki K.

*Trend in Cancer Research*, 2013;9:73-85

6. Phosphorylated Smad2 and Smad3 signaling: Shifting between tumor suppression and fibro-carcinogenesis in chronic hepatitis C. 査読あり

Yamaguchi T, Matsuzaki K, Inokuchi R, Kawamura R, Yoshida K, Murata M, Fujisawa J, Fukushima N, Sata M, Kage M, Nakashima O, Tamori A, Kawada N, Tsuneyama K, Dooley S, Seki T, Okazaki K.

*Hepatology Res*. 2013 Dec;43(12):1327-42.

7. Differential Regulation of TGF-β/Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries. 査読あり

Yoshida K, Matsuzaki K.

*Front Physiol*. 2012 Mar 19;3:53. doi:

10.3389/fphys.2012.00053. eCollection 2012.

8. Biochemical and Immunologic Effects of Rituximab in Patients With Primary Biliary Cirrhosis and an Incomplete Response to Ursodeoxycholic Acid. 査読あり

Tsuda M, Moritoki Y, Lian ZX, Zhang W, Yoshida Y, Wakabayashi K, Yang GX, Nakatani T, Vierling J, Lindor K, Gershwin ME, Bowlus CL. *Hepatology* 2012;55:512-521. doi:

10.1002/hep.24748.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. PBC モデルマウスにおいて IL-12p40 をノックアウトすると胆管炎は改善する 吉田勝紀, 守時由起, 常山幸一, 松崎恒一, 関寿人, 岡崎和一  
第 51 回日本臨床分子医学会学術集会東京国際フォーラム (東京) 2014/04/11-12
2. IgG4 関連疾患よりみた自験自己免疫性肝疾患の検討 吉田勝紀, 小藪雅紀, 内田一茂, 池田広記, 中橋佳嗣, 廣原淳子, 山口隆志, 松崎恒一, 村田美樹, 関寿人, 岡崎和一  
第 49 回日本肝臓学会総会 京王プラザホテル (東京) 2013/6/7-8
3. 単クローン抗体を用いた E L I S A によるリン酸化 Smad 定量化の試み (癌・線維化シグナルからみた C 型慢性肝疾患の病態把握) 山口隆志, 松崎恒一, 吉田勝紀, 村田美樹, 井口亮輔, 川村梨那子, 関寿人, 岡崎和一, 横井川規巨, 柳田英佐, 北出浩章, 権雅憲  
第 49 回日本肝臓学会総会 京王プラザホテル (東京) 2013/6/6-7
4. 急性肝障害時の肝細胞ならびに肝星細胞における TGF-β シグナル伝達の検討 村田美樹, 松崎恒一, 吉田勝紀, 山口隆志, 井口亮輔, 川村梨那子, 関寿人, 岡崎和一  
第 48 回日本肝臓学会総会 ホテル日航金沢 (金沢) 2012/6/7-8

5. Reversible phospho-Smad3 signaling between tumor-suppression and fibro-carcinogenesis in Shronic hepatitis B

Yoshida K, Quin L, Lian ZX, Murata M, Yamaguchi T, Tsuneyama K, Moritoki Y, Nyu J, Matsuzaki K.

The 2nd International symposium by JSPS core-to-core program "Cooperative international framework in TGF-b family signaling" 昭和薬科大学(横浜)2012/10/29-30

6.Reversible or irreversible phospho-Smad2/3 signaling between tumor-suppression and fibro-carcinogenesis in hepatitis C virus-related chronic liver diseases

Murata M, Yamaguchi T, Inokuchi R, Yoshida K, Kawamura R, Fukushima N, Sata M, Kage M, Nakashima O, Tamori A, Kawada N, Tsuneyama K, Okazaki K, Seki T, and Matsuzaki K

The 2nd International symposium by JSPS core-to-core program "Cooperative international framework in TGF-b family signaling" 昭和薬科大学(横浜)2012/10/29-30

7. Reversible or irreversible phospho-Smad3 signaling between tumor-suppression and fibro-carcinogenesis in hepatitis C virus-related chronic liver diseases

Yoshida K, Yamaguchi T, Murata M, Inokuchi R, Kawamura R, Fukushima N, Sata M, Kage M, Nakashima O, Tamori A, Kawada N, Tsuneyama K, Okazaki K, Seki T, and Matsuzaki K

The 10th JSH Single Topic Conference 京王プラザホテル(東京)2012/11/11-12

〔図書〕(計 2件)

1. 原発性胆汁性肝硬変症におけるバイオマーカーの探索

吉田 勝紀, 守時 由起, 常山 幸一,  
最先端バイオマーカーを用いた診断薬/診断装置開発と薬事対応

技術情報協会 2015 420 (373-377)

2. Early Chronic Inflammation and Subsequent Somatic Mutations Shift Phospho-Smad3

Signaling from Tumor-Suppression to Fibro-Carcinogenesis in Human Chronic Liver Diseases

Murata M, Yoshida K and Matsuzaki K.

<http://dx.doi.org/10.5772/56739>

"Hepatocellular Carcinoma - Future Outlook", book edited by Ahmed O. Kaseb, ISBN 978-953-51-1202-0, Published: October 23, 2013 under [CC BY 3.0 license](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
吉田 勝紀 (Katsunori Yoshida)  
関西医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00411554

(2)研究分担者  
なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
なし ( )  
研究者番号: