

肝発癌にみられる細胞内シグナルの活性化機構とその抑制

《研究の概要》

肝細胞癌細胞において、細胞内シグナル伝達の異常な活性化が認められており、その分子機構の解明が治療戦略に重要と考えられる。Pigment epithelial derived factor (PEDF)は、近年網膜色素上皮より分泌される神経栄養因子としてクローニングされたが、これまでに、神経細胞の成長や分化を促進させるだけでなく、nuclear factor-kappa B (NF- κ B)を介した抗アポトーシス作用、血管新生抑制作用など肝細胞癌の発症と増殖に関与する様々な細胞内シグナルの活性化に関与する事が報告されている。本研究の目的は肝細胞癌における PEDF の変化を解明するとともに、その分子機構に基づいた新たな治療ストラテジーを検討することである。

培養肝細胞株である SK-HEP1、HLF、PLC/PRF5、Huh-7、Hep3B、HepG2、OUMS-29 を実験に用いた。また、肝癌治療目的に肝切除術を施行された患者より、肝癌組織および非癌部組織を採取し、PEDF の発現を検討した。PEDF の発現は RT-PCR、免疫組織化学、免疫ブロット法、ELISA 法にて検討した。また、PEDF の機能を gene knock down 法にて検討した。

Huh-7、Hep3B、HepG2、OUMS-29 細胞において PEDF mRNA の強発現を認めた。PEDF mRNA の発現と同様に Huh-7、Hep3B、HepG2、OUMS-29 にて細胞質での PEDF の発現が認められた。また、Huh-7、Hep3B、HepG2 にて培養液中への PEDF の分泌が認められた。OUMS-29 は PEDF mRNA および細胞内 PEDF の発現がともに認められたが、培養上清中に PEDF の分泌は認められなかった。

ヒト癌組織の PEDF mRNA の発現は非癌部と比較して亢進を認めた。PEDF mRNA の発現と同様にいずれの症例においても肝癌部の PEDF 発現は非癌部と比較して亢進していた。免疫組織化学にて PEDF の細胞内分布を検討したところ、非癌部の肝細胞では核に PEDF の発現が認められた。一方、癌細胞では細胞質に PEDF の発現が認められた。肝癌患者の血清 PEDF 濃度は肝癌を合併していない肝硬変患者に比べ有意に高値であった。また、上記肝癌患者のうち根治治療が得られた患者では治療後の血清 PEDF 濃度は有意に減少していた。

PEDF の機能を gene knock down 法にて検討した。siRNA にて PEDF をノックダウンした細胞はノックダウンしていない細胞およびコントロール siRNA にて処理した細胞と比較して有意にアポトーシスを起こす細胞が増加していた。同様の条件にて肝細胞内の Basal cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) の発現は低下を認めた。

PEDF は分泌蛋白であることから標的細胞の一つであるマクロファージに及ぼす影響を検討した。PEDF をマクロファージ系細胞株である RAW 細胞の培養上清に添加すると TNF- α mRNA および TNF- α の培養上清への分泌が有意に抑制された。

本研究により肝癌細胞において PEDF は高発現していることが明らかとなった。肝癌細胞における PEDF は抗アポトーシス効果と、Kupffer 細胞の抗腫瘍効果を抑制し、肝癌細胞増殖により有利な環境をもたらすことが示唆された。以上より、PEDF は細胞内シグナルの活性化を担う分子でありその抑制は肝癌治療の新たなストラテジーとなりうると考えられる。

共同研究者

小俣政男	東京大学大学院 医学系研究科消化器内科 教授	肝細胞癌シグナル伝達解析
工藤正俊	近畿大学医学部 消化器内科学 教授	肝癌患者の臨床データ解析
山岸昌一	久留米大学医学部 糖尿病性血管合併症病態・治療学講座 准教授	PEDF の機能解析
金井文彦	東京大学医学部附属病院 22世紀医療センター 臨床薬効評価学 特任准教授	Gene knock down 法による解析
川口 巧	久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 講師	PEDF の発現解析
前田 慎	朝日生命成人病研究所 消化器科 部長	NF-Kb およびアポトーシス解析

研究報告

I. 研究目的

現在、本邦において肝細胞癌死者数は年間3万人を超えており、肝発癌阻止を目的とした新たな治療法の開発が急務である。肝細胞癌において、細胞内シグナル伝達の異常な活性化が認められており、その分子機構の解明が治療戦略に重要と考えられる。肝発癌の成因には、C型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、アルコール、非アルコール性脂肪性肝炎等が挙げられるが、いずれの成因においても肝細胞癌の発癌のステップには抗アポトーシス機構が、肝細胞癌の増殖、転移のステップには血管新生機構が深く関与している (El-Serag HB et al. *Gastroenterology*. 2007;132:2557-76)。

Pigment epithelial derived factor (PEDF) は、近年網膜色素上皮より分泌される神経栄養因子としてクローニングされた (Tombran-Tink J et al. *Exp Eye Res*. 1991;53:411-4)。これまでに、PEDF は神経細胞の成長や分化を促進させるだけでなく、nuclear factor-kappa B (NF-kB) を介して抗アポトーシス効果を有することが報告されている (Yabe T et al. *J Biol Chem*. 2001;276:43313-9)。また、PEDF は vascular endothelial growth factor (VEGF) などの血管新生に関わる因子に拮抗し、angiostatin の約2倍、endostatin の約7倍といった強力な血管新生抑制作用を有する (Tombran-Tink J. *Front Biosci*. 2005;10:2131-49)。このように、PEDF は上記の機能を有するだけでなく、その発現は肝臓で最も多いことから、肝細胞癌の発癌、増殖、転移への関与が示唆される。

これまでに、様々な腫瘍において PEDF の発現が検討されている。悪性黒色種では PEDF が高発現しており、診断への有用性が報告されているが (Tsuru M et al. *Kurume Med J*. 2005;52:81-7)、膵臓癌では PEDF の発現が低下することで、血管新生が亢進し、予後が不良となることが報告されている (Uehara H et al. *Cancer Res*. 2004;64:3533-7)。このように、癌種により PEDF の発現は異なるが、ヒト肝癌における PEDF の発現はこれまでに検討されていない。

本研究の目的は肝細胞癌において様々なシグナル伝達を調節する PEDF の変化を解明す

るとともに、その分子機構抑制による肝細胞癌の新たな治療ストラテジーを検討することである。

II. 研究計画および材料と方法

肝癌細胞株

培養肝癌細胞株である SK-HEP1、HLF、PLC/PRF5、Huh-7、Hep3B、HepG2、OUMS-29 を 10% 子牛血清とペニシリンおよびストレプトマイシンを含有する Dulbecco' s modified Eagle' s 培養液にて培養し、各種実験に用いた。

ヒト肝癌組織

久留米大学倫理委員会承認後、肝癌治療目的に外科的切除術をうける同意の得られた患者 5 名より、肝癌組織および非癌部組織を採取した。採取した組織は各種実験に用いるまで -80°C にて保存した。

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

TRIzol (インビトロジェン、Carlsbad、CA) により各肝癌細胞株もしくはヒト肝癌組織、非癌部組織より総 RNA を抽出した。500 ng の総 RNA を逆転写反応の基質として用い、SuperScript III RT-PCR system (インビトロジェン) とヒト PEDF プライマーもしくはヒト beta-actin プライマー (Promega, Madison, WI) にて PCR を行った。

免疫組織化学

各肝癌細胞株もしくはヒト肝癌組織、非癌部組織を用い PEDF に対する免疫組織化学を施行した。メタノールにて細胞もしくは組織を固定後、リン酸緩衝生理食塩水にて洗浄し、ヒト PEDF に対するモノクローナル抗体 (Chemicon、Temecula、CA) をリン酸緩衝生理食塩水にて 1:500 に希釈し、一次抗体として用いた。PEDF の発現は酵素抗体法および蛍光抗体法にて検討した。

イムノブロット法

各肝癌細胞株の培養上清もしくはヒト肝癌組織、非癌部組織を用い PEDF に対するイムノブロット法を施行した。各サンプルより蛋白量 10 μ g を 2-メルカプトエタノールを加えたドデシル硫酸ナトリウム (SDS) バッファーに溶解し、電気泳動後に分離したタンパク質を Polyvinylidenedifluoride 膜に転写した。ヒト PEDF に対する 2 種類の抗体 (Chemicon) (Transgenic、熊本、日本) を用いて PEDF の発現量を検討した。

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

ヒト血清 PEDF 濃度は、既報 (Yamagishi S et al. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91:2447-50) に従い ELISA にて測定した。

Gene knock down 法

各種肝癌細胞株の PEDF 遺伝子は short-interfering RNA (siRNA) -siPORT NeoFX

complexes (Ambion、Austin、TX) にて knockdown した。各実験ごとに PEDF 遺伝子 knock down を PCR にて確認後、50%以下に knock down 出来ている物を用いた。

アポトーシス Assay

アポトーシスは Cell Death Detection ELISA kit (Roche Diagnostics K.K.、東京、日本) を用いて検討した。

III. 研究成果

肝癌細胞株における PEDF の発現

様々な肝癌細胞株においてにおいて PEDFmRNA の発現を RT-PCR にて検討した。Huh-7、Hep3B、HepG2、OUMS-29 細胞にて PEDFmRNA の強発現を認めた。PLC/PRF/5 にも PEDFmRNA の発現を認めたが、HLF、SK-Hep1 においては PEDFmRNA の発現は他の細胞株に比較して著名に減弱していた (図 1)。

各種肝癌細胞株の細胞内での PEDF の発現を免疫組織化学にて検討した。PEDFmRNA の発現とほぼ同様に Huh-7、Hep3B、HepG2、OUMS-29、PLC/PRF/5 にて細胞質での PEDF の発現が認められた。一方、HLF、SK-Hep1 においては PEDF の発現は認められなかった (図 1)。

子牛血清非添加培養液にて各種培養細胞を 24 時間培養し、培養上清中に分泌された PEDF をイムノブロッティング法にて検討した。細胞内 PEDF の発現と同様に Huh-7、Hep3B、HepG2 にて培養液中への PEDF の分泌が認められ、HLF、SK-Hep1 においては PEDF の分泌は認められなかった。OUMS-29 は PEDFmRNA および細胞内 PEDF の発現ともに認められたが、培養上清中に PEDF の分泌は認められなかった (図 1)。

肝癌細胞株における PEDF の発現			
	mRNA	分泌	細胞内
OUMS-29	++	-	++
HepG2	++	++	++
Hep3B	++	++	++
Huh7	++	++	++
PLC/PRF/5	+	+	++
HLF	±	-	-
SK-Hep1	±	-	-

図 1. 各種肝癌細胞株における PEDF の発現

ヒト肝癌細胞株における PEDF の遺伝子変異

HepG2 細胞株の PEDF cDNA は正常ヒト PEDF cDNA の遺伝子配列と 99%以上の相同性を有していた。

肝癌患者における PEDF の発現

ヒト肝癌組織およびそれに隣接する非癌部組織を用いて PEDFmRNA の発現を RT-PCR にて検討した。いずれの症例においても癌部の PEDFmRNA の発現は非癌部の PEDFmRNA の発現と比較して亢進を認めた。

ヒト肝癌組織およびそれに隣接する非癌部組織を用いて PEDF の発現をイムノブロッテ

イング法にて検討した。PEDF mRNA の発現と同様にいずれの症例においても肝癌部の PEDF 発現は非癌部の発現と比較して亢進していた。

ヒト肝癌組織およびそれに隣接する非癌部組織を用いて免疫組織化学により PEDF の細胞内発現部位を検討した。非癌部の肝細胞では核に PEDF の発現が認められた。一方、癌細胞では細胞質に PEDF の発現が認められた。

肝癌患者の血清 PEDF 濃度を ELISA にて測定した。肝癌患者の血清 PEDF 濃度は肝癌を合併していない肝硬変患者の血清 PEDF 濃度に比べ有意に高値であった。また、肝癌の根治治療が得られた患者では治療後の血清 PEDF 濃度は有意に減少していた。

PEDF の細胞増殖の及ぼす影響

PEDF の肝癌細胞の増殖に及ぼす影響を検討するため siRNA (10 nM) により PEDF をノックダウンし、細胞数の変化を検討した。Hep3B、Huh-7、HepG2 いずれの肝癌細胞株においても PEDF ノックダウン後 48 時間もしくは 72 時間の時点において細胞数に変化は認めなかった。また、siRNA の投与量を増量 (20 nM) しても細胞数に変化は認めなかった (図 2)。

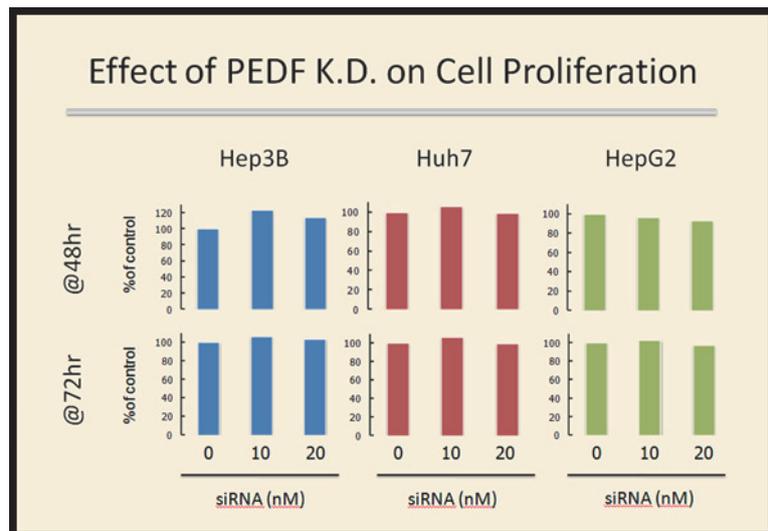


図 2 PEDF ノックダウンの細胞増殖に及ぼす影響

PEDF のアポトーシスに及ぼす影響

PEDF のアポトーシスに及ぼす影響を検討するため、カンプトテシンを培養液に添加し、HepG2 細胞にアポトーシスを誘導した。siRNA にて PEDF をノックダウンした細胞はノックダウンしていない細胞およびコントロール siRNA にて処理した細胞と比較して有意にアポトーシスを起こす細胞が多かった。

アポトーシスに関与する細胞内分子を同様の条件にて検討した。p53、リン酸化 p53、Akt、リン酸化 Akt、survivin、B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)、Bcl-2-associated X protein (Bax) に有意な変化は認めなかったが、Basal cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) は発現の低下を認めた。

PEDF のマクロファージに及ぼす影響

PEDF は分泌蛋白であることから、標的細胞の一つであるマクロファージにおよぼす影響を検討した。マクロファージ細胞株 RAW の培養液にリポポリサッカライドを添加することにより RAW 細胞は TNF- α をはじめとした種々のサイトカインを分泌することが知られている。PEDF を培養上清に添加し、tumor necrosis factor (TNF) - α , transforming growth factor (TGF) - β , interferon (IFN) - γ , interleukine (IL) -12 の遺伝子変化を RT-PCR

にて評価した。PEDF は LPS による TNF- α および TGF- β の遺伝子発現を著明に抑制した。さらに、Kupffer 細胞の TNF- α 分泌能は有意に抑制された。

IV. 考察

本研究により多くの肝癌細胞株だけでなくヒト肝癌細胞においても PEDF は高発現していることが明らかとなった。PEDF をノックダウンした細胞では Bcl-xL の発現が低下しアポトーシス感受性が高まったことから、肝癌細胞における PEDF は抗アポトーシス効果を有することが推察される。また、PEDF はマクロファージ細胞株からの TNF- α 分泌を抑制したことから、PEDF は Kupffer 細胞の抗腫瘍効果を抑制し、肝癌細胞増殖により有利な環境をもたらすと考えられる。以上の事より、PEDF は細胞内シグナルの活性化を担う分子でありその抑制は肝癌治療の新たなストラテジーとなりうる。

PEDF の発現はこれまで癌種によって異なることが報告されている (Tsuru M et al. *Kurume Med J.* 2005;52:81-7、Uehara H et al. *Cancer Res.* 2004;64:3533-7)。このため我々は様々な肝癌細胞株を用いて PEDF の発現を検討した。肝癌は多血性腫瘍であり、PEDF は強力な血管新生抑制作用を有すことから (Tombran-Tink J. *Front Biosci.* 2005;10:2131-49)、我々は、当初「肝癌細胞株では PEDF の発現は低下している。」という仮説をたてた。しかし、多くの肝癌細胞株において PEDF は高発現しており、培養液中にも分泌が認められた。肝癌細胞の PEDFcDNA を解析してみるとそのシーケンスは 99%以上ヒト PEDFcDNA と相同性を有していた。以上より、肝癌細胞株では PEDF を産生、分泌し、その PEDF はなんらかの機能を有することが示唆された。

我々は、肝癌切除目的にて採取された肝癌組織部とそれに隣接する非癌部組織を用いてイムブロットング法および免疫組織化学にて PEDF 発現を評価した。いずれの手法においても癌部にて PEDF は高発現していた。また、患者血清を用いて ELISA 法にて PEDF 濃度を測定したところ、肝癌患者では肝癌を有しない肝硬変患者に比べて血清 PEDF 濃度は有意に高値であった。肝癌治療後では血清 PEDF 濃度は有意に低下したことから肝細胞癌の分泌する PEDF は血清 PEDF 濃度に反映される事が示唆された。以上より、肝癌細胞株同様、ヒト肝癌細胞においても PEDF は高発現していることが明らかとなった。

PEDF は細胞周期に関与する分子と相互作用を示すことから (Pignolo RJ et al. *J Cell Physiol.* 2003;195:12-20)、PEDF の細胞増殖におよぼす影響を検討した。分泌蛋白の機能を検討する際、培養液にターゲット分子 (PEDF) を添加する方法が一般的であるが、今回我々の用いた肝癌細胞株は PEDF を培養液中に分泌する事が先の実験より明らかとなった。即ち、PEDF を培養液に添加する手法では PEDF が過剰となってしまう生理的濃度の PEDF の及ぼす意義についての検討が困難と考えられる。そこで、我々は siRNA を用いて PEDF 遺伝子をノックダウンすることで肝癌細胞増殖に及ぼす影響を検討した。siRNA にて PEDF をノックダウンを行った群の細胞数はノックダウンを行わなかった細胞数と比較して優位差は認めなかった。3種の肝癌細胞株で上記検討を行ったが、結果はすべて同様であった。以上より PEDF の細胞増殖における関与は乏しいと考えられる。

PEDF は多機能分子であるだけでなく、抗アポトーシス作用 (Yabe T et al. *J Biol Chem.* 2001;276:43313-9) およびアポトーシス誘導作用 (Ho TC et al. *Mol Immunol.* 2008;45:898-909) という相反する作用が報告されており、その作用は細胞種によって異な

る。そこで、我々は PEDF の肝癌細胞アポトーシスに及ぼす影響を検討した。PEDF をノックダウンした細胞では、ノックダウンを行っていない細胞と比較し、カンプトテシンによるアポトーシスの有意な増加を認めた。また、抗アポトーシス分子である Bcl-xL の発現も同時に低下を認めた。以上の結果より、肝癌細胞株における PEDF は Bcl-xL の発現に関与し、抗アポトーシス作用を有すると考えられる。

PEDF は分泌蛋白であり、標的細胞に対し抗炎症作用を含む様々な影響をもたらすことが報告されている (Wang JJ et al. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294:F1166-73)。肝類洞壁にはマクロファージ系の Kuppfer 細胞が存在し、TNF- α を始めとして様々なサイトカインを分泌し肝細胞に影響を及ぼす。そこで、我々は PEDF のマクロファージ系細胞サイトカイン産生能に及ぼす影響を検討した。PEDF をマクロファージ系 RAW 細胞の培養上清に添加すると TNF- α mRNA および TNF- α の培養上清への分泌が有意に抑制された。この結果より、肝癌細胞の分泌する PEDF は Kuppfer 細胞の抗腫瘍効果を抑制し、肝癌細胞増殖により有利な環境をもたらすことが示唆された。

本研究により肝癌細胞において PEDF は高発現していることが明らかとなった。肝癌細胞における PEDF は抗アポトーシス効果と、Kuppfer 細胞の抗腫瘍効果を抑制し、肝癌細胞増殖により有利な環境をもたらすことが示唆された。以上の事より、PEDF は細胞内シグナルの活性化を担う分子でありその抑制は肝癌治療の新たなストラテジーとなりうる事が示唆された。

V. 研究成果の発表

1. Ikeda M, Fujiyama S, Tanaka M, Sata M, Ide T, Yatsushashi H, Watanabe H. Risk factors for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C after sustained response to interferon. *Journal of Gastroenterology* 40:148-156, 2005.
2. Takedatsu H, Yoshimoto K, Okamura T, Yakushiji K, Imamura R, Hashiguchi M, Seki R, Obata Y, Harada M, Yamada A, Yamana H, Sata M, Itoh K. Immunological evaluation of vaccination of peptides derived from epithelial cancer-related antigens in two patients with hematological malignancy. *International Journal of Oncology* 26:1605-1612, 2005.
3. Kawaguchi T, Nagao Y, Tanaka K, Ide T, Harada M, Kumashiro R, Sata M. Causal relationship between hepatitis C virus core and the development of type 2 diabetes mellitus in a hepatitis C virus hyperendemic area: a pilot study. *International Journal of Molecular Medicine* 16:109-114, 2005.
4. Yano Y, Yamashita F, Kuwaki K, Fukumori K, Kato O, Kiyomatsu K, Sakai T, Yamamoto H, Yamasaki F, Ando E, Sata M. Partial spontaneous regression of hepatocellular carcinoma: a case with high concentrations of serum lens culinaris agglutinin-reactive alpha fetoprotein. *Kurume Medical Journal* 52:97-103, 2005.
5. Kudo M. Reply "Staging for hepatocellular carcinoma: treatment strategy matters." *Hepatology* 41:678-679, 2005.
6. Kim SR, Imoto S, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Matsuoka T, Maekawa Y, Ninomiya

- T, Ando K, Mita K, Fuki S, Koterazawa T, Fukuda K, Kudo M, Sakamoto H, Hayashi Y. Primary sclerosing cholangitis and hepatitis C virus infection. *Intervirology* 48:268-272, 2005.
7. Zheng RQ, Kudo M. Hepatic angiomyolipoma. identification of an efferent vessel to be hepatic vein by contrast-enhanced harmonic ultrasound. *Br J Radiol* 78:956-960, 2005.
 8. Torimura T, Ueno T, Kin M, Taniguchi E, Nakamura T, Inoue K, Sakata R, Hashimoto O, Sakamoto M, Ohira H, Kumashiro R, Sata M, Yano H, Kojiro M, Veitonmaki N, Yihai Cao. Gene transfer of kringle 1-5 suppresses tumor development and improves prognosis of mice with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 130:1301-1310, 2006.
 9. Karuppaiyah Selvendiran, Koga H, Ueno T, Yoshida T, Maeyama M, Torimura T, Yano H, Kojiro M, Sata M. Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Research* 66:4826-4834, 2006.
 10. Yano Y, Yamashita F, Kuwaki K, Fukumori K, Kato O, Yamamoto H, Ando E, Tanaka M, Sata M. Clinical features of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma and their association with alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist-II. *Liver International* 26:789-795, 2006.
 11. Ikeda M, Fujiyama S, Tanaka M, Sata M, Ide T, Yatsushashi H, Watanabe H. Clinical features of hepatocellular carcinoma that occur after sustained virological response to interferon for chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21:122-128, 2006.
 12. Nagaoka S, Itano S, Ishibashi M, Torimura T, Baba K, Akiyoshi J, Kurogi J, Matsugaki S, Inoue K, Tajiri N, Takada A, Ando E, Kuromatsu R, Kaida H, Kurogi M, Koga H, Kumashiro R, Hayabuchi N, Kojiro M, Sata M. Value of fusing PET plus CT images in hepatocellular carcinoma and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma patients with extrahepatic metastases: preliminary findings. *Liver International* 26:781-788, 2006.
 13. Aishima S, Basaki Y, Oda Y, Kuroda Y, Nishihara Y, Taguchi K, Taketomi A, Maehara Y, Hosoi F, Maruyama Y, Abbas Fotovati, Oie S, Ono M, Ueno T, Sata M, Yano H, Kojiro M, Kuwano M, Tsuneyoshi M. High expression of insulin-like growth factor binding protein-3 is correlated with lower portal invasion and better prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Science* 97:1182-1190, 2006.
 14. Torimura T, Ueno T, Sata M. Liposome-mediated gene transfer of K1-5 suppresses tumor development and improves the prognosis of hepatocellular carcinoma in mice. *Medical Molecular Morphology* 39:72-78, 2006.
 15. Ando E, Kuromatsu R, Tanaka M, Takada A, Fukushima N, Sumie S, Nagaoka S, Akiyoshi J, Inoue K, Torimura T, Kumashiro R, Ueno T, Sata M. Surveillance program for early detection of hepatocellular carcinoma in Japan: results of specialized

- department of liver disease. *Journal of Clinical Gastroenterology* 40:942-948, 2006.
16. 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. Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene* 25:6056-6066, 2006.
 17. Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T, Takeuchi M, Ueno T, Sata M. 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 Letter* 580:2788-2796, 2006.
 18. Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T, Inoue H, Ueno T, Sata M. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks the interleukin-6 signaling to C-reactive protein expression in Hep3B cells by suppressing Rac-1 activation. *Life Sciences* 79:1981-1987, 2006.
 19. Shibata W, Hirata Y, Maeda S, Ogura K, Ohmae T, Yanai A, Mitsuno Y, Yamaji Y, Okamoto M, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. CagA protein secreted by the intact type IV secretion system leads to gastric epithelial inflammation in the Mongolian gerbil model. *J Pathol* 210:306-14, 2006.
 20. Chung H, Kudo M, Haji S, Osaki Y, Oka H, Seki T, Kasugai H, Sasaki Y. A proposal of the modified liver damage classification for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 34:124-129, 2006.
 21. Hagiwara S, Kudo M, Minami Y, Chung H, Nakatani T, Fukunaga T, Osaki Y, Yamashita Y, Kajimura K. Clinical significance of the genotype and core promoter/pre-core mutations in hepatitis B virus carriers. *Intervirology* 49:200-206, 2006.
 22. Nagaoka S, Itano S, Nagamatsu H, Akiyoshi J, Kurogi J, Tajiri N, Kajiwarra M, Sata M. Temporary indwelling catheter system via the left brachial artery: evaluation in 83 patients with hepatic tumors. *American Journal of Roentgenology* 188:652-658, 2007.
 23. Sakemi R, Yano H, Ogasawara S, Akiba J, Nakashima O, Fukahori S, Sata M, Kojiro M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and XIAP-associated factor-1 expressions and their relationship to apoptosis in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous liver tissues. *Oncology Reports* 18:65-70, 2007.
 24. 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. Serum C-reactive protein levels predict survival in hepatocellular carcinoma. *Liver International*. 27:1019-1097, 2007.
 25. Sumie S, Kawaguchi T, Komuta M, Kuromatsu R, Itano S, Okuda K, Taniguchi E, Ando E, Takata A, Fukushima N, Koga H, Torimura T, Kojiro M, Sata M. Significance of glucose intolerance and SHIP2 expression in hepatocellular carcinoma patients

- with HCV infection. *Oncology Reports* 18:545-552, 2007.
26. Nakamura K, Yamagishi S, Yoshida T, Matsui T, Imaizumi T, Inoue H, Sata M. Hydrogen peroxide stimulates pigment epithelium-derived factor gene and protein expression in the human hepatocyte cell line OUMS-29. *The Journal of International Medical Research* 35:427-432, 2007.
 27. Hatanaka K, Kudo M, Fukunaga T, Ueshima K, Chung H, Minami Y, Sakaguchi Y, Hagiwara S, Orino A, Osaki Y. Clinical characteristics of nonBnonC HCC: comparison with HBV and HCV related HCC. *Intervirolgy* 50,24-31, 2007.
 28. Minami Y, Kudo M, Chung H, Kawasaki T, Yagyu Y, Shimono T, Shiozaki H. Contrast harmonic sonographic-guided radiofrequency ablation therapy Versus B-mode sonography in Hepatocellular Carcinoma: prospective randomized controlled trial. *Am J Roentgenol* 188:489-494, 2007.
 29. Bioulac-Sage P, Balabaud C, Bedossa P, Scoazec JY, Alves V, Bhathal P, Chiche L, Craig J, Dhillon AP, Ferrell L, Beller S, Goodman Z, Gouw A, Guido M, Guindi M, Hytiroglou P, Kage M, Kojiro M, Kondo F, Kudo M, Nakano M, Paradis V, Park NY, Quaglia A, Roncalli M, Roskams T, Ruebner B, Sakamoto M, Saxena R, Tiniakos D, Theise N, Thung S, Trillaud H, Vilgrain V, Wanless IR, Zucman-Rossi J. Pathological diagnosis of liver cell adenoma and focal nodular hyperplasia: Bordeaux update. *J Hepatol* 46:521-527, 2007.
 30. Ikeda K, Marusawa H, Osaki Y, Nakamura T, Kitajima N, Yamashita Y, Kudo M, Sato T, Chiba T. Antibody to hepatitis B core antigen and risk for hepatitis C-related hepatocellular carcinoma: A prospective study. *Ann Intern Med* 146:649-656, 2007.
 31. Inoue T, Kudo M, Minami Y, Chung H, Fukunaga T, Kawasaki T. Case of rapidly progressed sarcomatoid hepatocellular carcinoma in young female without risk factor. *Liver Int* 27:1428-1430, 2007.
 32. Hagiwara S, Kudo M, Nakatani T, Sakaguchi Y, Nagashima M, Fukuta N, Kimura M, Hayakawa S, Munakata H. Combination therapy with PEG-IFN-alpha and 5-FU inhibits HepG2 tumor cell growth in nude mice by apoptosis of p53. *Brit J Cancer* 97: 1532-1537, 2007.
 33. Yanai A, Maeda S, Shibata W, Hikiba Y, Sakamoto K, Nakagawa H, Ohmae T, Hirata Y, Ogura K, Muto S, Itai A, Omata M. Activation of IkappaB kinase and NF-kappaB is essential for Helicobacter pylori-induced chronic gastritis in Mongolian gerbils. *Infect Immun* 76:781-787, 2008.
 34. Maeda S, Omata M. Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci.* 99:836-842, 2008.
 35. Minami Y, Chung H, Kudo M, Kitai S, Takahashi S, Inoue T, Ueshima K, Shiozaki H. Radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: value of virtual CT sonography with magnetic navigation. *Am J Roentgenol* 190:1-W7, 2008.