

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19349

研究課題名(和文) in vivoイメージングを用いたPKR阻害剤の肝細胞癌増殖抑制効果の解明

研究課題名(英文) The study to clarify the tumor suppressive effect of PKR inhibitor in hepatocellular carcinoma using in vivo imaging

研究代表者

渡辺 崇夫 (Watanabe, Takao)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90650458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝癌細胞株Huh7を用いて、既存のprotein kinase R (PKR) 阻害剤がin vitroにおいて用量依存性に細胞増殖抑制作用をもつことを確認した。次にPKRの腫瘍増殖抑制効果をin vivoで確認するために、肝細胞癌株Huh7をヌードマウスに皮下移植し、PKR阻害剤を投与により腫瘍の増殖が抑制されるかどうかを検討した。PKR阻害剤の連日腹腔内投与により腫瘍の増殖が有意に抑制され、さらにその効果には用量依存性がみられた。また、PKRIはHCV感染細胞に、エピジェネティックな変化をもたらし、複数の肝細胞癌内遺伝子のメチル化を変化させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) is upregulated by hepatitis C virus (HCV), and also overexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC) with HCV infection. In HCC cell line Huh 7, we elucidated PKR inhibitor administration significantly decrease tumor cell proliferation in a dose dependent manner by in vitro proliferation assay. To evaluate the tumor suppressive effect of PKR inhibitor in vivo, we inoculated Huh 7 cells subcutaneously into BALB/c-nu/nu mice. The mice were then injected i.p. every day with or without PKR inhibitor. Then PKR inhibitor suppressed the proliferation of HCC cells in a dose dependent manner. Moreover we identified DNA methylation level of several cancer related genes were changed by PKR-knockdown in HCV infected HCC cells using the human Methylation450 BeadChip™. PKR promotes the proliferation of HCC cells, and PKR inhibitor could serve as an attractive therapeutic approach.

研究分野：Gastroenterology

キーワード：PKR hepatocellular carcinoma DNA methylation PKR inhibitor proliferation HCV

1. 研究開始当初の背景

現在、悪性腫瘍の中で肝細胞癌の発生数は肺癌、胃癌、大腸癌に次いで4位であり高い頻度を維持している。他の固形癌と異なり肝細胞癌はその発生背景に慢性肝障害が存在することをほぼ必須とする。原因としてC型肝炎ウイルス(HCV)感染による慢性肝炎、肝硬変から発症する頻度が約60%と最も高い。Protein kinase R (PKR)はHCVの複製で見られる2本鎖RNAやインターフェロンにより誘導される宿主蛋白で、RNAの蛋白翻訳に関わるeIF2-をリン酸化させることで、RNAウイルスの蛋白合成を阻害して、HCVなどに対して抗ウイルス作用をもつ宿主蛋白として認識されている。一方、申請者らはPKRが、HCVが関与する肝細胞癌において非癌部の肝組織に比べて強発現していること、さらに強発現したPKRは、Erk1/2、JNK1などMAPKの活性化により、c-Fosおよびc-Junを活性化し、それに伴う細胞増殖促進作用を示すことを報告してきた。つまり、PKRはHCVに対する抗ウイルス作用を持つ善玉としての役割とともに、肝細胞癌の進展に寄与する悪玉として作用しており、HCV排除後においてもPKR阻害薬は肝細胞癌の新しい治療薬となり得る可能性がある。

近年、癌とエピジェネティクスの関係が注目されている。肝細胞癌についても複数の癌抑制遺伝子のDNAメチル化による発現抑制が、癌化の過程で重要であり、予後規定因子となることが報告されている。また肝細胞癌においてJNKの持続的な活性化がDNAのメチル化を引き起こしているとされている。申請者らが報告したように肝細胞癌においてPKRはJNKのシグナルを活性化する。そのため肝細胞癌においてPKRはJNKを介したDNAメチル化に関与し、癌の進展に寄与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究ではPKRのキナーゼとしての蛋白リ

ン酸化修飾やJNKを介したDNAメチル化などエピジェネティックな作用に注目し肝細胞癌におけるPKR増加の意味を明らかにしたい。またPKRが肝細胞癌の治療標的となりえるかを検討するため既存のPKR阻害剤の*in vitro*での腫瘍増殖抑制効果、また肝細胞癌株のマウス移植モデルを作成し、*in vivo*でのPKR阻害剤の腫瘍形成・増殖・転移に対する効果を定量的に解析し明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 既存のPKR阻害剤(C13H8N4O5)が、肝細胞癌に対して腫瘍増殖抑制効果をもつかどうかを検討するため、肝細胞癌株Huh7を用いて、細胞増殖アッセイ(MTSアッセイ)を行った。PKR阻害剤の腫瘍増殖抑制効果に容量依存性があるかを明らかにするため阻害剤濃度を500nmol/Lから3000nmol/Lの間で設定しcontrolと比較した。

(2)PKR阻害剤の*in vivo*での腫瘍増殖抑制効果を明らかにするためHuh7をヌードマウスに 3.0×10^6 個/bodyで皮下移植したモデルを作成し、PKR阻害剤を連日腹腔内投与し腫瘍の増殖をcontrol群と比較した。腫瘍の容積は以下の式で算出した。

$$\text{Volume (mm}^3\text{)} = L \times W^2 / 2$$
 (L:腫瘍の長径、W:腫瘍の短径)

PKR阻害剤の腫瘍増殖抑制効果に容量依存性があるかどうかを明らかにするため阻害剤の投与量を30, 100, 300 $\mu\text{g/kg}$ で設定した。

(3)PKR阻害剤の連日腹腔内投与3週目にマウスをsacrificeし皮下腫瘍から採取した組織でPKR、リン酸化PKR(p-PKR)のウエスタンブロット解析、リン酸化PKRの免疫組織染色を行い、コントロールとの比較を行った。

(4)肝細胞癌株におけるPKR阻害剤の標的分子を明らかとするため質量分析の手法を用

いて網羅的解析を行った。PKR のキナーゼとしての作用に注目し、Huh7 細胞に PKR inhibitor を添加、24 時間後に Pierce Phosphoprotein Enrichment Kit (Thermo scientific) を用いてリン酸化蛋白のみを抽出した。そして PKR inhibitor 投与群と非投与群でのリン酸化蛋白の発現を iTRAQ® 試薬を用いた網羅的比較定量解析を行い比較した。

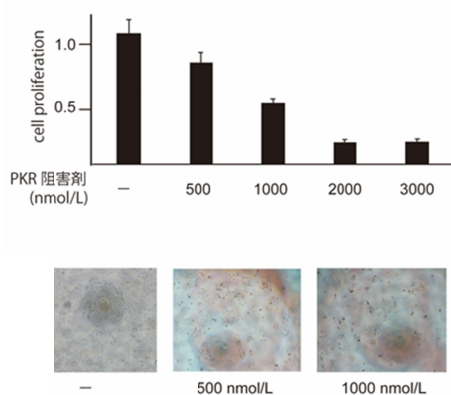
(5) HCV 複製肝癌細胞株において PKR ノックダウンによる DNA メチル化酵素 (DNMT1, 3a, 3b) の発現変化を real time RT-PCR, Western blotting で検討した。Human Methylation 450 BeadChip (Illumina 社) 用いて網羅的解析により同定した PKR 発現により DNA メチル化に変化のあった遺伝子について、その発現と PKR との関係を検討した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞癌株における PKR 阻害剤の細胞増殖抑制効果

細胞増殖アッセイ (MTS アッセイ) を行った。その結果既存の PKR 阻害剤 (C13H8N4OS) の添加により細胞増殖能が低下した。PKR 阻害剤による細胞増殖抑制効果は 500, 1000, 2000 nmol/L と濃度上昇に伴い増加し容量依存性を認めた。3000 nmol/L では 2000 nmol/L と変わらず頭打ちとなった。(図 1)

図 1. PKR 阻害剤による肝細胞癌株の増殖抑制効果 (in vitro)



(2) in vitro における PKR 阻害剤の腫瘍増殖抑制効果

Huh7 のヌードマウスへの皮下移植モデルにおいて PKR 阻害剤の連日腹腔内投与より細胞増殖能は容量依存性に低下する傾向が見られた (図 2A)。阻害剤濃度を 300 μg/kg に設定し、有意な細胞増殖の低下を確認した (図 2B)。PKR 阻害剤投与によりマウスの体重はコントロールと変わりなかった。

(3) in vitro における PKR 阻害剤のリン酸化 PKR の抑制効果

PKR 阻害剤の連日腹腔内投与 3 週目にマウスを sacrifice し皮下腫瘍から採取した組織で PKR, p-PKR のウエスタンブロット解析を行った。阻害剤の PKR リン酸化抑制には個体差がみられ全体では明らかな低下を確認できなかった (図 3)。p-PKR の面積染色を行ったが p-PKR の抑制には部位差がみられ、効果が一様ではなかった。既存の阻害剤では PKR シグナルの阻害が十分ではないと考えられた。

図2A. 肝細胞癌細胞株の皮下移植モデルにおけるPKR阻害剤の腫瘍増殖抑制効果①

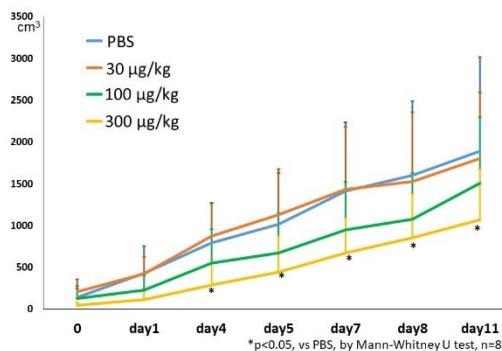
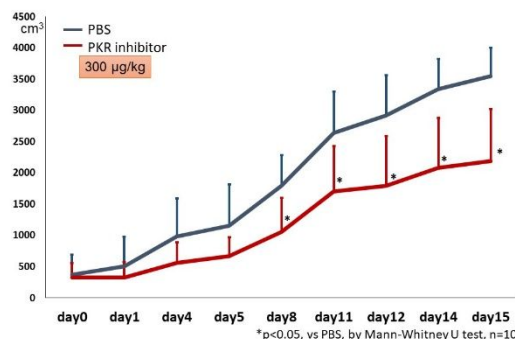
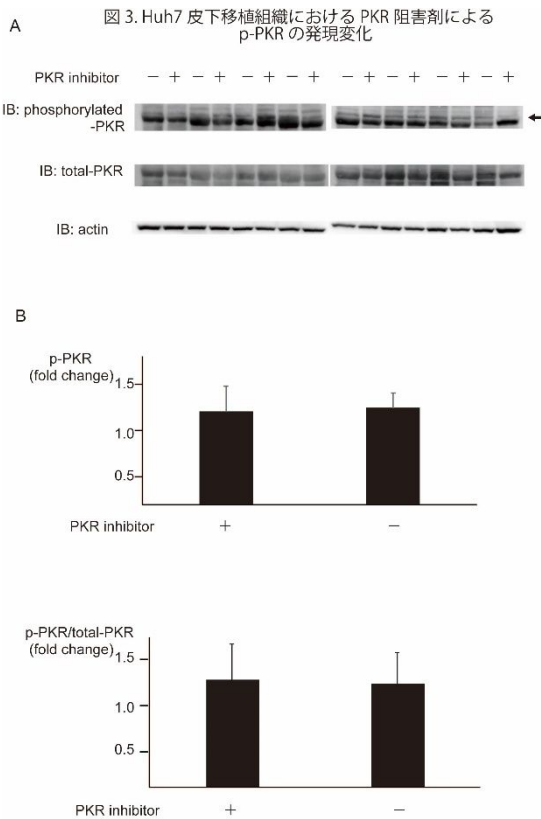


図2B. 肝細胞癌細胞株の皮下移植モデルにおけるPKR阻害剤の腫瘍増殖抑制効果②





(4) PKR 阻害剤による細胞内タンパク質の変化

Huh7 細胞に PKR 阻害剤を加えることで変化するタンパク質を質量分析の手法で網羅的に解析した。それにより Hexokinase-2 (HK2), Annexin A6 (ANXA6), Serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP) など、PKR 阻害剤による低下するタンパク質を複数同定した。

(5) PKR の肝細胞癌内遺伝子の DNA メチル化に及ぼす影響

HCV 複製肝癌細胞株において PKR ノックダウンにより DNA メチル化酵素 (DNMT1, 3a, 3b) の発現が RNA レベル、さらにタンパク質レベルで抑制されることを明らかにした。それにより複数の肝細胞癌内遺伝子のメチル化に変化がみられた。特に癌促進遺伝子である P-REX1 の発現は PKR 阻害により抑制され、その抑制は DNMT 阻害剤である 5-Aza-dC によりキャンセルされることが明らかとなった。またそれら PKR による DNMT 発現変化は HCV 感染のない肝癌細胞株では見られず、HCV と

の何らかの相互作用を介している可能性が示唆された。

結論

既存の PKR 阻害剤は肝細胞癌において in vivo, in vitro において腫瘍増殖抑制効果を示した。しかし PKR 阻害剤の in vitro での PKR リン酸化抑制は十分ではなかった。一方で PKR 阻害剤により複数のタンパク質の変化がみられ、これらのタンパク質を標的とする新たな機序の PKR 阻害剤を探索できる可能性が示唆された。また、PKR は DNA メチル化酵素 (DNMT1, 3a, 3b) の発現変化を介してエピジェネティックな変化をもたらし、複数の肝細胞癌内遺伝子のメチル化を変化させることを見出した。それらの中には細胞内代謝のキー分子である FOXO3 を含め、代謝酵素も含まれており、PKR が非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を背景とする肝細胞癌に対しても影響を与えている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Watanabe T, Imamura T, Hiasa Y. Roles of protein kinase R in cancer: Potential as a therapeutic target. *Cancer Sci*. 査読あり 2018 Apr;109(4):919-925. doi: 10.1111/cas.13551.

Watanabe T, Tokumoto Y, Joko K, (他 11 名, 1 番目) Predictors of treatment efficacy and ALT non-normalization with sofosbuvir/ribavirin therapy for patients with hepatitis C virus genotype 2. *J Med Virol*. 査読あり 2017 Sep;89(9):1567-1573. doi: 10.1002/jmv.24776.

Ohno Y, Koizumi M, Nakayama H, Watanabe T, (他 8 名, 4 番目) Downregulation of ANP32B exerts anti-apoptotic effects in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 査読あり 2017 May 9;12(5):e0177343. doi: 10.1371/journal.pone.0177343.

Yamamoto S, Oshima Y, Saitou T, Watanabe T, (他 7 名, 4 番目) Quantitative imaging of fibrotic and morphological changes in liver of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice by second harmonic generation (SHG) and

auto-fluorescence (AF) imaging using two-photon excitation microscopy (TPEM). Biochem Biophys Rep. 査読あり 2016 Sep 25;8:277-283. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.09.010.

〔学会発表〕(計 6 件)

Takao Watanabe, The epigenetic roles of protein kinase R in hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus Infection, and possibility of PKR inhibitor as a therapeutic target. The asian pacific association for the study of the liver single topic conference in Nagasaki 2017

渡辺崇夫, C型肝炎に対するDAA治療後の肝細胞癌新規発症・再発に寄与する因子の検討, 第21回日本肝臓学会大会 2017

渡辺崇夫, C型肝炎に対するDAA治療後の肝細胞癌新規発症・再発に関する検討, 第53回日本肝臓学会総会 2017

渡辺崇夫, DAA治療後のALT値から見たSVR後肝発癌高危険群の検討, 第103回日本消化器病学会総会 2017

Takao Watanabe, Overexpressed protein kinase R (PKR) in hepatocellular carcinoma with HCV infection modulates DNA methylation. HCV 2016

Takao Watanabe, The roles of Protein kinase R and its possibility as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. AALSD the liver meeting 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 崇夫 (Watanabe, Takao)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 90650458