

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15818

研究課題名(和文) PKRによる肝細胞癌増殖と代謝分子制御の機序解析および新規治療標的の探索

研究課題名(英文) The inhibitor of protein kinase R (PKR) suppresses tumor proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo models

研究代表者

渡辺 崇夫 (Watanabe, Takao)

愛媛大学・医学系研究科・講師

研究者番号：90650458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：PKR阻害剤(oxindole/imidazole compound: C16)の腫瘍抑制効果とその機序を明らかにした。肝細胞癌細胞株Huh7の腫瘍増殖はPKR阻害剤添加により容量依存性に抑制された。ヌードマウスにHuh7細胞を皮下移植し、PKR阻害剤の連日腹腔内投与を行ったところ、腫瘍体積の増加が抑制された。PKR阻害剤投与後の腫瘍内では、PKR阻害剤投与により顕著に血管数が減少していた。血管新生抑制の機序として、PKR阻害剤添加により各種増殖因子の発現低下が見られた。以上の結果からPKR阻害剤は腫瘍微小環境にも影響を与え、増殖因子の発現抑制により血管新生を抑制する作用も有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、肝細胞癌に対する治療は、手術、内科的な局所治療としてRFA、TACEなどが用いられている。しかし肝細胞癌患者の高齢化、その高い再発率から患者への負担の少ない薬物治療の開発が必要である。治療効果のエビデンスのある薬物もごく限られているのが現状である。本研究では細胞株とマウスを用いた検討を行い、PKR阻害剤により肝細胞癌の増殖、血管新生が抑制されることを示した。PKRをターゲットとした治療は肝細胞癌における新規治療となり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We tested the effect of protein kinase R (PKR) inhibitor C16 on proliferation of HCC Huh7 cells in vitro and tumor progression and angiogenesis of tumor bearing mouse of Huh7 in vivo.

C16 suppressed proliferation of Huh7 cells in a dose-dependent manner in vitro evaluated with the MTT assay. Mouse models with xenograft transplantation showed that the inhibitor suppressed the growth of HCC cells in vivo. Moreover, C16 decreased angiogenesis in HCC tissue in the xenograft model. Consistent with these results in mice, transcript levels of vascular endothelial growth factor-A and factor-B, platelet-derived growth factor-A and factor-B, fibroblast growth factor-2, epidermal growth factor, and hepatocyte growth factor, which are angiogenesis-related growth factors, were significantly decreased by C16 in vitro.

In conclusion, the PKR inhibitor C16 blocked tumor cell growth and angiogenesis via a decrease in mRNA levels of several growth factors. C16 may be useful in the treatment of HCC.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝細胞癌 PKR 細胞増殖 血管新生 阻害剤 増殖因子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の患者数は国内約 4.4 万人、世界約 75 万人とされ、悪性腫瘍の死亡原因として依然 4 位と高い頻度を維持している。肝細胞癌は慢性肝炎、特に肝硬変を背景として発症することが多く、また慢性肝炎患者の高齢化も相まって予後不良の癌腫である。肝細胞癌の原因としては依然として 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。近年新規の抗 HCV 薬としてウイルスを直接阻害する direct-acting antivirals (DAAs) による治療が行われるようになり、安全かつ高率に HCV の排除が得られるようになった。しかし、HCV 排除後においても肝細胞癌が発生は比較的高率に起こることが明らかとなってきた。一方、食生活の欧米化などに伴い慢性肝障害の原因として非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の割合が増加しており、NASH を背景とする肝細胞癌も増加してきている。

Protein kinase R (PKR) は HCV の複製でみられる 2 本鎖 RNA などにより誘導される宿主蛋白で、RNA の蛋白翻訳に関わる eIF2- $\alpha$  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。当科における過去の検討で PKR は、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た (1)。さらに HCV 関連肝細胞癌において PKR は ERK1/2, JNK のシグナルを介して c-Fos, c-Jun を活性化し、それにより細胞増殖促進作用を示すことを見出している (2)。

### 2. 研究の目的

肝細胞癌に対する治療は、手術、内科的な局所治療として RFA, TACE が用いられている。しかし肝細胞癌患者の高齢化、その高い再発率から患者への負担の少ない薬物治療の開発が必要である。肝細胞癌に対する分子標的薬としては、治療効果のエビデンスのある薬物はソラフェニブ (MAPK 経路を直接阻害するキナーゼ阻害剤) などごく限られているのが現状である。本研究では肝細胞癌の新たな治療として PKR 阻害剤 (oxindole/imidazole compound: C16) の *in vitro*, *in vivo* における腫瘍抑制効果とその機序を明らかにする。また質量分析の手法で 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同定し、PKR 阻害剤の抗腫瘍効果の鍵となる下流分子を明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

(1) PKR 阻害剤 (C16) 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。PKR 阻害剤の PKR シグナル抑制の確認のため、PKR, リン酸化 PKR (p-PKR) のウェスタンブロット解析を行った。

(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 BALB/c-nu/nu に  $3.0 \times 10^6$  個/body で皮下移植したモデルを作成し、PKR 阻害剤 (300  $\mu$ g/kg) 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。

Volume (mm<sup>3</sup>) = L $\times$ W<sup>2</sup>/2 (L:腫瘍の長径、W:腫瘍の短径)

PKR 阻害剤の PKR シグナル抑制の確認のため、阻害剤投与後 0, 2, 4, 24 時間後に移植した皮下腫瘍から蛋白質を採取し PKR, p-PKR のウェスタンブロット解析を行った。

(3) PKR 阻害剤投与 28 日後に腫瘍を摘出し、CD31 の免疫染色を行い、血管数を比較した。血管数は低倍率視野 ( $\times 100$ ) で最も CD31 陽性の血管が多い箇所を同定した後、高倍率視野 ( $\times 200$ ) にて 3 ヲ所の血管数の平均を算出した (Microvessel density: MVD)。

(4) Huh7 細胞に PKR 阻害剤を添加し、各種増殖因子 (VEGF-A, VEGF-B, PDGF-A, PDGF-B, FGF-1, FGF-2, EGF, HGF) の発現を real-time RT-PCR を用いてコントロールと比較した。

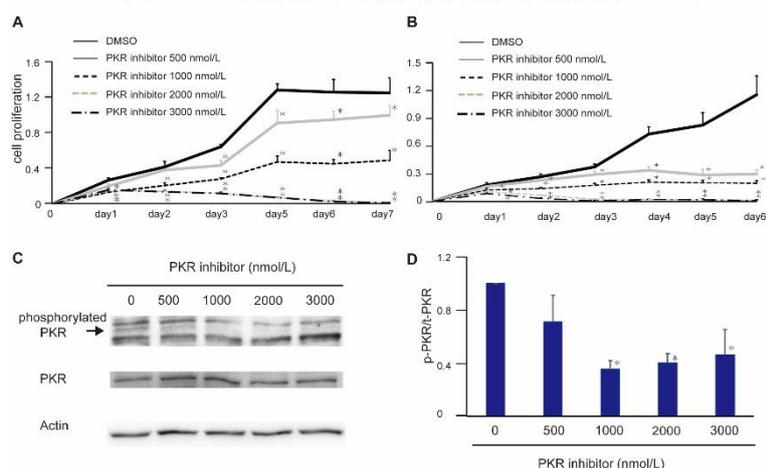
### 4. 研究成果

#### (1) 肝細胞癌細胞株における PKR 阻害剤の増殖抑制効果

肝細胞癌細胞株 Huh7 を用い MTS アッセイを行い、PKR 阻害剤 (C16) 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 1A)。

ウェスタンブロット解析により、total PKR, p-PKR の蛋白発現を解析し、デンストメトリを行った結果、PKR 阻害剤添加により p-PKR/PKR が著明に低下していることを

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



確認した (図 1C, D)。また PKR 阻害剤による増殖抑制効果は他の肝癌細胞株 HepG2 でも同様であった (図 1B)。

## (2) *in vitro*における PKR 阻害剤の肝細胞癌の増殖抑制効果

BALB/c-nu/nu マウスに Huh7 細胞を皮下移植し、PKR 阻害剤の連日腹腔内投与を行った。その結果腫瘍体積の増加が容量依存性に抑制された (図 2)。

図 2 より阻害剤濃度を 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  に設定した。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 (図 3A)。腫瘍の増殖は PKR 阻害剤投与により著明に抑制された (図 3B)。また PKR 阻害剤投与後 0, 2, 4, 24 時間後に移植した皮下腫瘍から蛋白質を採取し PKR, p-PKR のウェスタンブロット解析を行った。デンシトメトリにより阻害剤投与で少なくとも 24 時間後まで腫瘍内において p-PKR/PKR を抑制していることを確認した (図 3C, D)。

図 2 *in vivo* における PKR 阻害剤の容量依存的な腫瘍増殖抑制効果

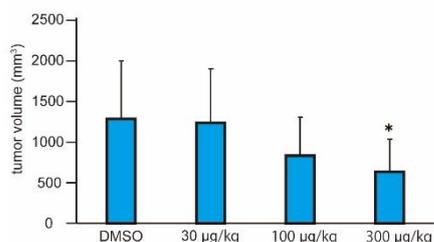
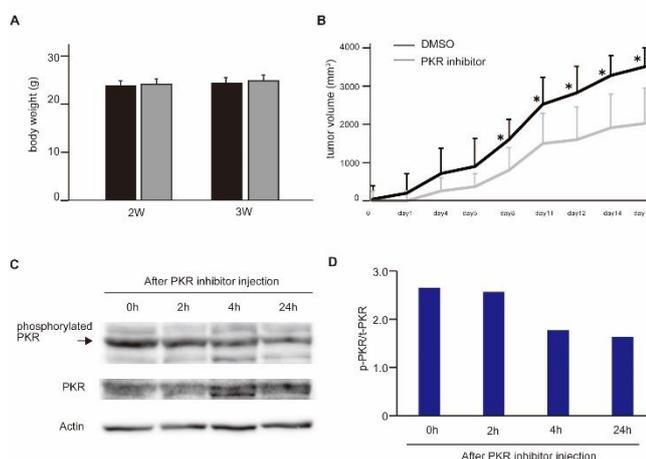


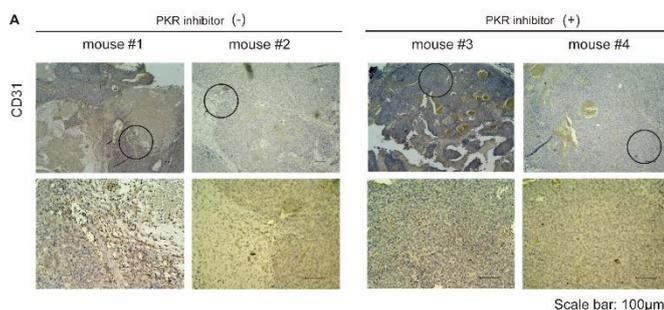
図 3. PKR 阻害剤の腫瘍増殖抑制効果 (肝細胞株皮下移植モデル)



## (3) PKR 阻害剤の血管新生抑制

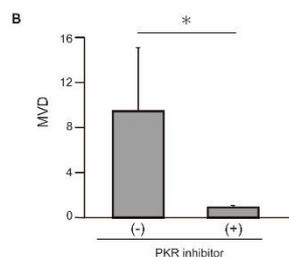
PKR 阻害剤投与 28 日後に腫瘍を摘出し、CD31 の免疫染色を行った。腫瘍内における血管数は PKR 阻害剤投与群ではコントロールと比較して有意に少なく、PKR 阻害剤投与による血管新生抑制が明らかとなった。

図 4. PKR 阻害剤による血管新生抑制



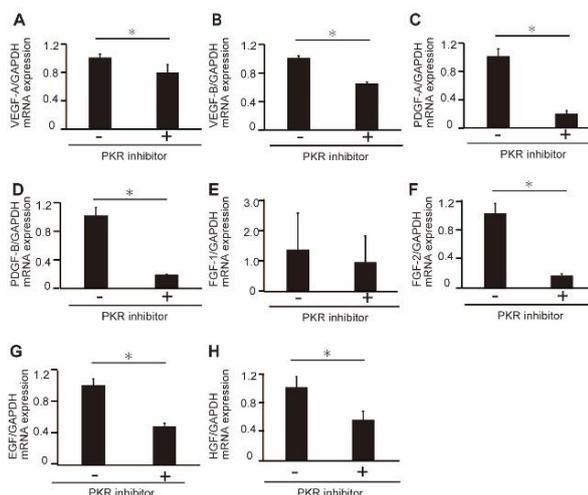
## (4) PKR 阻害剤による各種増殖因子の発現抑制

血管新生抑制の機序として、Huh7 細胞に PKR 阻害剤を添加し、各種増殖因子 (VEGF-A, VEGF-B, PDGF-A, PDGF-B, FGF-1, FGF-2, EGF, HGF) の発現を real-time RT-PCR にて測定し、PKR 阻害剤投与群とコントロール群を比較した。



阻害剤添加 24 時間では VEGF A, B, PDGF A, B, FGF 2, EGF の発現が顕著に低下していた (図 5)。また、VEGF-A, PDGF-A, PDGF-B, EGF は阻害剤投与後 3 時間, 6 時間でも発現が低下しており、PKR 阻害による直接の影響が強く示唆された。PKR 阻害剤による増殖因子の発現抑制効果は他の肝細胞癌細胞株 HepG2 でも同様であった。

図 5. PKR 阻害剤による増殖因子の発現減少



## (5) 質量分析による PKR 阻害剤の標的分子の検討

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。PKR 阻害剤添加により、これらの分子は real-time RT-PCR にて mRNA 発現も有意に抑制されることが分かった。特に Hexokinase-2 は解糖系の主要な酵素の一つであり、ANXA6 は細胞内代謝に影響を与え、NASH の病態に関与していることが報告されており、今後注目していきたい。

#### (6) 結語

PKR 阻害剤の投与により腫瘍の増殖が著明に抑制された。また PKR 阻害剤は腫瘍微小環境にも影響を与え、増殖因子の発現抑制により血管新生を抑制する作用も有していた。PKR は肝細胞癌において新規治療標的となる可能性がある。

#### 〈引用文献〉

- ① Hiasa Y, Kamegaya Y, Nuriya H, et al. Am J Gastroenterol 98 巻 2528-2534, 2003.
- ② Watanabe T, Hiasa Y, Tokumoto Y, et al. PLoS One 8 巻 e67750, 2013.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe T, Imamura T, Hiasa Y.	4. 巻 Apr;109(4)
2. 論文標題 Roles of protein kinase R in cancer: Potential as a therapeutic target.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 919-925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13551. Epub 2018 Mar 23. Review.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe T, Tokumoto Y, Joko K, Michitaka K, Horiike N, Tanaka Y, Tada F, Kisaka Y, Nakanishi S, Yamauchi K, Yukimoto A, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y.	4. 巻 Feb;49(2)
2. 論文標題 Predictors of hepatocellular carcinoma occurrence after direct-acting antiviral therapy in patients with hepatitis C virus infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 136-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13278. Epub 2018 Nov 20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imai Y, Yoshida O, Watanabe T, Yukimoto A, Koizumi Y, Ikeda Y, Tokumoto Y, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y.	4. 巻 Feb 22;14(2)
2. 論文標題 Stimulated hepatic stellate cell promotes progression of hepatocellular carcinoma due to protein kinase R activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0212589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0212589. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yukimoto A, Hirooka M, Hiraoka A, Michitaka K, Ochi H, Joko K, Imai Y, Watanabe T, Koizumi Y, Yoshida O, Abe M, Hiasa Y.	4. 巻 Jan 1;49(1)
2. 論文標題 Using ALBI score at the start of sorafenib treatment to predict regorafenib treatment candidates in patients with hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 42-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyy153.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe T, Ninomiya H, Saitou T, Takanezawa S, Yamamoto S, Imai Y, Yoshida O, Kawakami R, Hirooka M, Abe M, Imamura T, Hiasa Y.	4. 巻 Mar 20;10(1)
2. 論文標題 Therapeutic Effects of the PKR Inhibitor C16 Suppressing Tumor Proliferation and Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma in Vitro and in Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61579-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Konishi K, Miyake T, Furukawa S, Senba H, Kanzaki S, Nakaguchi H, Yukimoto A, Nakamura Y, Watanabe T, Koizumi Y, Yoshida O, Tokumoto Y, Hirooka M, Kumagi T, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y.	4. 巻 Apr;299
2. 論文標題 Advanced Fibrosis of Non-Alcoholic Steatohepatitis Affects the Significance of Lipoprotein(a) as a Cardiovascular Risk Factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 32-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2020.02.026.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 渡辺崇夫、上甲康二、日浅陽一
2. 発表標題 C型肝炎に対するDAA治療後の肝細胞癌新規発症危険群の同定
3. 学会等名 第22回 日本肝臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣岡昌史、渡辺崇夫、日浅陽一
2. 発表標題 DAAによるSVR後のHCV関連肝臓がんに寄与する臨床因子の検討
3. 学会等名 第54回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺崇夫、行本敦、今井祐輔、中村由子、小泉洋平、吉田理、廣岡昌史、阿部雅則、日浅陽一
2. 発表標題 当科における肝硬変の成因別分類
3. 学会等名 第54回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺崇夫、道堯浩二郎、日浅陽一
2. 発表標題 多施設共同研究によるDAA治療後の肝細胞癌新規発症、再発例の特徴についての解析
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会プログラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺崇夫、徳本良雄、日浅陽一
2. 発表標題 多施設共同研究によるC型肝炎に対するDAA治療後の肝細胞癌新規発症危険因子における性別の影響についての検討
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺崇夫、上甲康二、道堯浩二郎、堀池典生、田中良憲、多田藤政、上杉和寛、中西征司、野中卓、山内一彦、廣岡昌史、阿部雅則、日浅陽一
2. 発表標題 多施設共同研究における超高齢者C型肝炎患者に対するDAA治療の治療効果・安全性の検討
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----