

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590980

研究課題名(和文)肝細胞癌におけるPKRの役割とその宿主細胞機能修飾

研究課題名(英文)The role of PKR and its modification to the function of host cell in hepatocellular carcinoma

研究代表者

日浅 陽一(Hiasa, Yoichi)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70314961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Protein kinase R (PKR)は、非癌部の肝組織に比べてHCV関連肝細胞癌において高発現している。しかし高発現したPKRのHCV関連肝細胞癌の発癌と進展における役割については不明であった。申請者らはHCV感染肝癌細胞株、ヒト肝細胞癌組織を用いて、PKRがHCV関連肝細胞癌において細胞増殖能を亢進させており、その作用はErk1/2、c-Fos、JNK、c-JunのMAPK経路に依存していることを同定した。HCV感染に伴う肝細胞癌で高発現するPKRが、癌の進展を亢進させ、を調節することが治療に結びつく可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that protein kinase RNA-dependent (PKR) is overexpressed in hepatocellular carcinoma (HCC) with hepatitis C virus (HCV) infection, as compared with surrounding non-HCC tissues. Cell proliferation significantly increased by PKR expression, moreover that was dependent on PKR-modulated c-Fos and c-Jun expression in the HCV-replicating cell lines. We also confirmed the coordinate expression of c-Fos and c-Jun with PKR in human HCC specimens. These findings suggest that the overexpressed PKR would some roles for proliferation of HCC, and could be one of the targeted molecules to treat the HCC related with HCV.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PKR 肝細胞癌 細胞増殖 C型肝炎ウイルス MAPK c-Jun c-Fos JNK

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

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。

申請者は過去の検討で、Protein kinase R (PKR)が、肝細胞癌において非癌部の肝組織に比べて強発現することを同定し、報告した(文献1)。PKRはHCVの複製でみられる2本鎖RNAにより誘導される宿主蛋白で、RNAウイルスの感染を阻害する宿主蛋白として認識されている。ヒト肝細胞癌のサンプルを用いた検討により、肝細胞癌組織では非癌組織に比べてPKRの発現が有意に上昇し、それとともにリン酸化eIF2- α の発現増加がみられた。一方、PKRはHCVなどRNAウイルスの複製を阻害する。また、申請者の検討でも*in vitro*のHCV複製系においてHCV増殖によりPKRは誘導され、PKRの過剰発現は抗HCV作用を有した(文献2)。ヒト肝細胞癌組織を用いた検討では、肝細胞癌部で強発現するPKRはHCV複製阻害作用を保持し、肝細胞癌部では非癌部よりもHCV-RNA量は低下していた。HCVは肝細胞癌を誘導する最も強い原因であるが、それによって誘導されるPKRが、肝発癌・進展に寄与する可能性はある。PKRが肝細胞癌発癌に関与しているのか、あるいは発癌の結果増強しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では肝細胞癌で高発現するPKRについて、その発癌に対しての役割を究明するとともに、癌化に関わる宿主細胞蛋白を同定し、さらにはそれらのkey moleculeの宿主肝細胞への機能修飾作用を明らかにすることを

研究の目的とする。その結果、PKRおよびその関連蛋白が、発癌予測や予後を規定する分子マーカーとして、あるいは癌治療の治療標的としての臨床的に有用なfactorになりうるかについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Huh7.5.1細胞を用いて、HCV genotype 2型の全遺伝子を複製する肝細胞癌株であるJFH1(文献3)と、HCV genotype 1型の全遺伝子を複製する肝細胞癌株であるH77s(文献4)を作成した。

(2) 作成したPKR siRNAと、PKRの全遺伝子をコードしたプラスミド(pPKR)を用いて、肝細胞癌株にトランスフェクションしてPKRの発現をノックダウン、あるいは過剰発現させ、修飾される細胞内遺伝子をPCRアレイで網羅的に検討した。またC型肝炎ウイルス導入前後のHuh7.5.1とJFH1における細胞内癌関連遺伝子の変化を比較し、HCVによる修飾についても検討した。

(3) PKR発現の増減に伴って増減した細胞内癌関連遺伝子(2.で抽出された遺伝子)について、mRNAおよび蛋白の変化をリアルタイムRT-PCR、ウエスタンブロット法で確定した。

(4) PKRの細胞増殖への影響を調べるため、細胞増殖アッセイ(MTSアッセイ)とwound-healingアッセイを用いて、PKRの発現量の増減に伴って、増減する肝細胞癌増殖能を観察した。

(5) 手術あるいは肝生検時に得られた34例の肝細胞癌組織(HCV陽性17例、陰性17例)より、mRNAを抽出し、PKR mRNAの中央値か

ら PKR 高発現群と低発現群に分けた。次に 3. で同定し得た細胞内癌関連遺伝子について、mRNA および蛋白をリアルタイム RT-PCR、ウエスタンブロット法で測定し、PKR 発現量によって増減するかどうかを検討した。また HCV 陽性群と陰性群に分けて検討を加えた。

(倫理面への配慮)

検体採取および WT1 ペプチドを用いた臨床試験については愛媛大学医学部臨床研究倫理委員会にて承認後(0809006 号)、十分な説明を行い、書面による同意を得た上で行った。

4. 研究成果

(1) HCV 感染肝癌細胞株の作成、PKR siRNA と発現プラスミドによる PKR 発現変化

H77s (HCV genotype 1) と JFH1 (HCV genotype 2) から抽出した HCV-RNA を Huh7.5.1 細胞に導入した。その細胞株で PKR siRNA による PKR のノックダウンと PKR 発現プラスミドによる過剰発現を確認した。

(2) 肝細胞癌株における PKR 発現量の変化に伴う肝細胞内遺伝子発現修飾についての網羅的な解析

PCR アレイの結果、PKR を過剰発現すると MAP kinase 関連遺伝子である c-Fos と c-Jun の発現が増加してノックダウンすると低下した。PKR の増減による c-Fos と c-Jun 遺伝子の増減は、HCV を複製していない Huh7.5.1 より、HCV を複製している JFH1 株で変化が大きかった。

(3) H77 s, JFH1 における PKR の増減に伴う c-Fos, c-Jun の発現変化

JFH1 と H77s において、PKR ノックダウンに伴う c-Fos と c-Jun の発現低下、および PKR 過剰発現による c-Fos と c-Jun の発現増

加をリアルタイム PCR により確認した。またリン酸化 c-Fos とリン酸化 c-Jun も PKR ノックダウンで低下し、PKR 過剰発現で増加することをウエスタンブロット法で確認した。さらに各々の上流にある Erk1/2 と JNK1 のリン酸化蛋白も同様に PKR の増減に伴って増減した(図 1, 2)。

図 1. HCV 感染肝癌細胞株における PKR の増減による c-Fos, c-Jun mRNA の発現変化

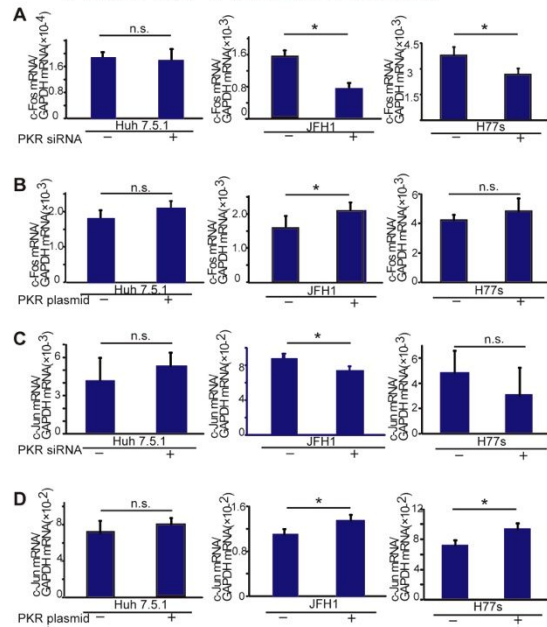
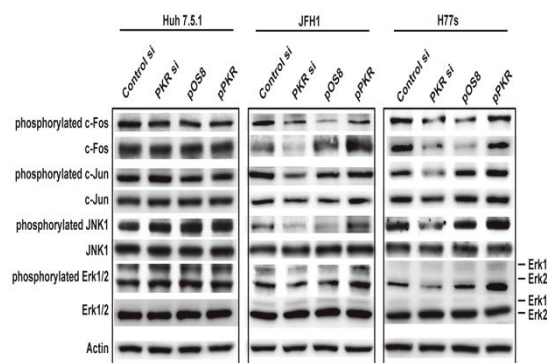


図 2. HCV 感染肝癌細胞株における PKR の増減によるリン酸化 c-Fos, Erk1/2 およびリン酸化 c-Jun, JNK1 の変化



(4) H77s, JFH1 における PKR の発現変化に伴う細胞増殖への影響

細胞増殖アッセイ (MTS アッセイ) を行った。その結果 PKR をノックダウンすると細胞増殖能が低下し、また過剰発現すると細胞増

殖能が増加することが分かった(図3)。次に wound-healing アッセイを行いPKR をノックダウンすると傷の修復が遅延することを確認した(図4)。

図3. PKR発現変化による細胞増殖能への影響①

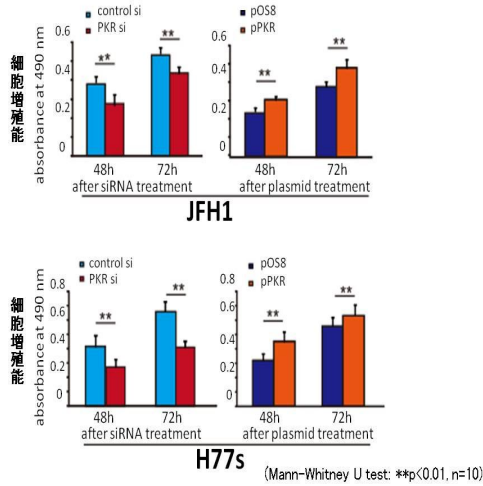
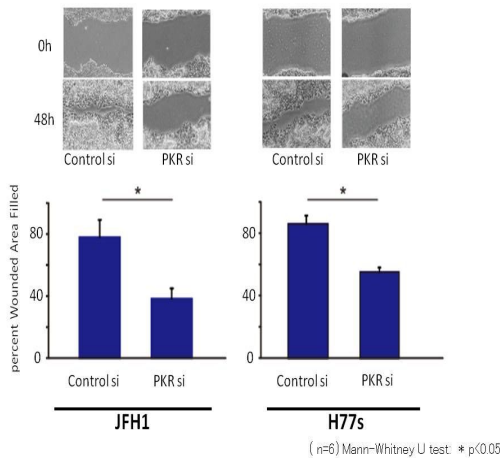


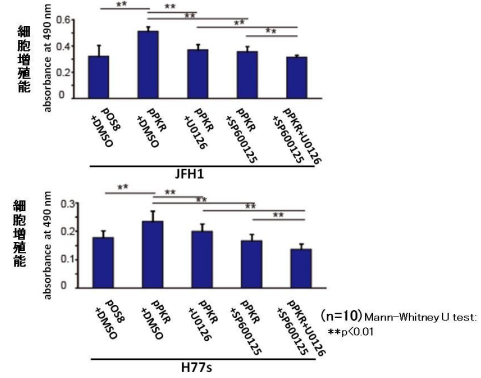
図4. PKR発現変化による細胞増殖能への影響②



(5) PKR による細胞増殖能亢進と MAPK 経路との関連

c-Fos を阻害する U0126 と c-Jun を阻害する SP600125 を添加して阻害実験を行った。PKR の過剰発現による細胞増殖増加は、各々の阻害により低下し、両者を阻害することでさらに低下した。PKR による肝細胞癌増殖作用は c-Fos と c-Jun の両者に依存していた(図5)。

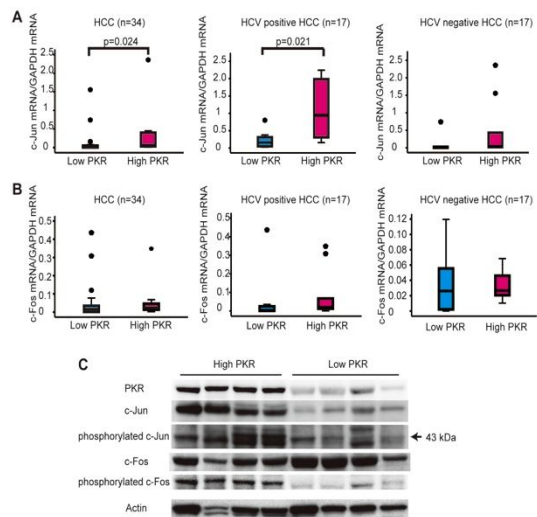
図5. c-Fos, c-Jun各シグナル阻害剤のPKRによる細胞増殖能亢進の阻害



(6) 肝細胞癌患者より採取した肝細胞癌組織を用いた c-Fos, c-Jun の検討

ヒト肝細胞癌組織を用いた実験で、特に HCV 陽性の肝細胞癌で PKR 高発現群において PKR 低発現群より c-Jun mRNA が増加していた。Western blot にて、PKR 高発現群では PKR 低発現群よりリン酸化 c-Fos とリン酸化 c-Jun の発現増加がみられた。これらの結果は細胞株の実験でみられた PKR が c-Fos と c-Jun を活性化する結果と一致していた(図6)。

図6. ヒト肝細胞癌組織における PKR の発現と c-Jun, c-Fos 発現の関係



(7) 結論

HCV 感染に伴う肝細胞癌において過剰に発現している PKR は、c-Fos と c-Jun

を活性化して癌細胞増殖を亢進することを明らかにした。HCV 関連肝細胞癌において PKR を調節することにより、その進展を阻害しうる可能性があり、PKR は治療標的の一つとなる可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Hiasa Y, Kamegaya Y, Nuriya H, et al. *Am J Gastroenterol* 98 巻 2528-2534 (2003)
2. Tokumoto Y, Hiasa Y, Horiike N, et al. *J Med Virol* 79 巻 1120-1127 (2007)
3. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. *Nat Med* 11 巻 791-796, (2005)
4. Yi M, Villanueva RA, Thomas DL, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 巻 2310-2305 (2006)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

Pancreatic congestion in liver cirrhosis correlates with impaired insulin secretion. Kuroda T, Hirooka M, Hiasa Y (他 6 名, 9 番目) *J Gastroenterol*. (2014) [Epub ahead of print] 査読有

Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Portal Hypertension Due to Outflow Block in Patients without Cirrhosis. Hirooka M, Koizumi Y, Hiasa Y (他 6 名, 9 番目) *Radiology*. 274 巻 597-604 (2014) 査読有
DOI: 10.1148/radiol.14132952.

18F-FDG-PET/CT predicts the distribution of microsatellite lesions in hepatocellular carcinoma. Ochi H, Hirooka M, Hiasa Y (他 11 名, 14 番目) *Mol Clin Oncol*. 2 巻 798-804 (2014) 査読有
DOI: 10.3892/mco.2014.328.

Maximum standardized uptake value in 18F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography is associated with advanced tumor factors in esophageal cancer. Kajiwara T, Hiasa Y, Nishina T (他 8 名, 2 番目) *Mol Clin Oncol*. 2 巻 313-321 (2014) 査読有
DOI: 10.3892/mco.2014.238.

Increased B cell-activating factor promotes tumor invasion and metastasis in human pancreatic cancer. Koizumi M, Hiasa Y, Kumagi T (他 6 名, 2 番目) *PLoS One* 8 巻 e71367 (2013) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0071367.

Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote

proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. Watanabe T, Hiasa Y, Tokumoto Y (他 6 名, 2 番目) *PLoS One* 8 巻 e67750 (2013) 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0067750.

Importance of screening for synchronous malignant neoplasms in patients with hepatocellular carcinoma: impact of FDG PET/CT. Hiraoka A, Hirooka M, Hiasa Y (他 16 名, 16 番目) *Liver Int*. 33 巻 1085-1091 (2013) 査読有

DOI: 10.1111/liv.12161.

Blockade of B-cell-activating factor signaling enhances hepatic steatosis induced by a high-fat diet and improves insulin sensitivity. Kawasaki K, Abe M, Hiasa Y (他 7 名, 9 番目) *Lab Invest*. 93 巻 311-321 (2013) 査読有
10.1038/labinvest.2012.176.

Des-gamma-carboxy prothrombin identified by P-11 and P-16 antibodies reflects prognosis for patients with hepatocellular carcinoma. Takeji S, Hirooka M, Hiasa Y (他 6 名, 8 番目) *J Gastroenterol Hepatol*. 28 巻 671-677 (2013) 査読有

DOI: 10.1111/jgh.12076.

Wilms' tumor 1 gene modulates Fas-related death signals and anti-apoptotic functions in hepatocellular carcinoma. Uesugi K, Hiasa Y, Tokumoto Y (他 6 名, 2 番目) *J Gastroenterol*. 48 巻 1069-1080 (2013) 査読有

DOI: 10.1007/s00535-012-0708-7.

FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. Arai T, Ueshima K, Hiasa Y (他 26 名, 16 番目) *Hepatology* 57 巻 1407-1415 (2013) 査読有

DOI: 10.1002/hep.25956.

Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α -2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. Izumi N, Asahina Y, Hiasa Y (他 20 名, 19 番目) *J Gastroenterol* 48 巻 382-390 (2013) 査読有

DOI: 10.1007/s00535-012-0641-9.

High serum palmitic acid is associated with low antiviral effects of interferon-based therapy for hepatitis C virus. Miyake T, Hiasa Y, Hirooka M (他 10 名, 2 番目) *Lipids* 47 巻

1053-1062 (2012) 査読有
DOI: 10.1007/s11745-012-3716-8.
Lymphotoxin β receptor signaling promotes development of autoimmune pancreatitis. Seleznik GM, Reding T, Hiasa Y (他 26 名, 13 番目) Gastroenterology 143 巻 1361-1374 (2012) 査読有
DOI: 10.1053/j.gastro.2012.07.112.
Rapid alternative absorption of dietary long-chain fatty acids with upregulation of intestinal glycosylated CD36 in liver cirrhosis. Yamamoto Y, Hiasa Y, Murakami H (他 5 名, 2 番目) Am J Clin Nutr 96 巻 90-101 (2012) 査読有
DOI: 10.3945/ajcn.111.033084.
Real-time tissue elastography for evaluation of hepatic fibrosis and portal hypertension in nonalcoholic fatty liver diseases. Ochi H, Hirooka M, Hiasa Y (他 7 名, 9 番目) Hepatology 56 巻 1271-1278 (2012) 査読有
DOI: 10.1002/hep.25756.
Ribavirin regulates hepatitis C virus replication through enhancing interferon-stimulated genes and interleukin 8. Tokumoto Y, Hiasa Y, Uesugi K (他 7 名, 2 番目) J Infect Dis. 205 巻 1121-1130 (2012) 査読有
DOI: 10.1093/infdis/jis025.
Regulatory dendritic cells pulsed with carbonic anhydrase I protect mice from colitis induced by CD4+CD25⁻ T cells. Yamanishi H, Murakami H, Hiasa Y (他 5 名, 6 番目) J Immunol. 188 巻 2164-72 (2012) 査読有
DOI: 10.4049/jimmunol.1100559.

〔学会発表〕(計 5 件)

Portal hypertension due to outflow block in non-cirrhotic patients with nonalcoholic fatty liver disease. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Koizumi Y, Hiasa Y, et al. Boston USA, 2014 年 11 月 9 日.
Branched-chain amino acids improve intestinal malabsorption of dietary long-chain fatty acids and preserve intestinal fatty acid transporters in liver cirrhosis. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Yamamoto Y, Hiasa Y, et al. Boston USA, 2014 年 11 月 9 日.
Pancreatic congestion in liver cirrhosis

correlates with impaired insulin secretion. Kuroda T, Hiasa Y, et al. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston USA, 2014 年 11 月 9 日.

Protein kinase R modulates c-Fos and c-Jun signaling to promote proliferation of hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Watanabe T, Hiasa Y, et al. Washington DC USA, 2013 年 11 月 3 日.

Composition of serum fatty acids may be associated with the antiviral effects of interferon-based therapy in patients with hepatitis C virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Miyake T, Hiasa Y, et al. Washington DC USA, 2013 年 11 月 3 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 体内での針先端を画像上に表示する針先端画像表示装置、それを用いたがん治療装置および体内での針先端を画像上に表示する針先端画像表示方法

発明者: 廣岡昌史、日浅陽一

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-086806

出願年月日: 平成 26 年 10 月 15 日

国内外の別: 国内

名称: ROM スコア及び肝細胞癌患者の客観的な予後予測方法

発明者: 日浅陽一、竹治智、廣岡昌史、恩地森一

権利者: 愛媛大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-273601

出願年月日: 平成 25 年 1 月 18 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日浅 陽一 (Hiasa, Yoichi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70314961

(2) 研究分担者、連携研究者 なし