

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09006

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルスによる炎症に起因する肝発癌および癌進展機序とPKRの役割

研究課題名(英文) The role of protein kinase R (PKR) for hepatocarcinogenesis and progression of hepatocellular carcinoma during inflammation due to hepatitis C virus infection.

研究代表者

日浅 陽一 (Hiasa, Yoichi)

愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70314961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Protein kinase R (PKR)はC型肝炎ウイルス(HCV)の増殖を抑制するが過剰発現すると細胞増殖を促進する。本研究ではヒトおよび動物モデルにおける検討で、PKRの発現がMAPKシグナルを増強し、その阻害剤が肝細胞癌の増殖を抑制することを示した。また、PKRは肝細胞癌においてDNMTを制御してDNAメチル化に関与し、いくつかの癌関連遺伝子を制御している可能性がある。下流のeIF2-alphaにはPERKと補完的に作用してその機能を維持する一方で、PERKと互いの強い干渉作用はみられず、炎症時にも独立して肝細胞癌に関わっていると考えられ、肝細胞癌制御の治療分子標的候補と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Protein kinase R (PKR) is recognized as a key executor of anti-hepatitis C virus (HCV). Moreover, over-expressed PKR up-regulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, and it promotes hepatocarcinogenesis and progression of hepatocellular carcinoma (HCC) in vitro models. In this study, we investigate the total potential of PKR against the role for HCC by using in vivo models, including human specimens after HCC resection and HCC transplanted nude mice model. In also human specimens, over-expressed PKR enhanced MAPK signaling, and in mice model, PKR inhibitor inhibited progression of HCC. Additionally, PKR has epigenetic roles to regulate DNMTs in HCV infected cells. Moreover, there is not obvious interaction between PKR and PERK, and PKR would regulate the activity of eIF2-alpha cooperated with PERK, which is a key molecule for ER stress and cell inflammation. From those data, PKR could be one of the therapeutic targets to regulate HCC in patients with HCV.

研究分野：医歯薬学

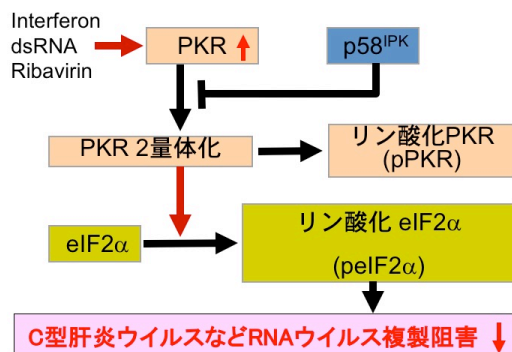
キーワード：Protein kinase R Hepatocellular carcinoma C型肝炎ウイルス eIF2-alpha PERK ERストレス DNMT MAPK

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は悪性腫瘍の死亡原因として現在第5位と多く、他の癌に比べ罹患数に対し死亡数が多い予後不良の癌である。また、肝細胞癌はその発症に肝炎に伴う炎症と肝線維化が背景としてあり、これらの事象が発癌および癌進展に大きく影響を及ぼしていると考えられる。肝癌の背景疾患として肝線維化の週末像である肝硬変からの発癌が多いが、その原因は、C型肝炎ウイルス(HCV)の感染によるものが約50-60%と最も多い。近年、C型肝炎の治療成績が向上しているが、依然として肝細胞癌の最大の原因である。発癌とその背景の炎症、肝線維化の原因が感染症であることから、肝細胞癌は発癌およびその進展機序を成因から同定しうるモデルである。

肝癌の原因となるHCVは1本鎖RNAウイルスである。肝細胞内で増殖する際に2本鎖RNA(dsRNA)を形成する。dsRNAはProtein kinase R (PKR)を活性化し、同蛋白の2量体化とともに、RNAの蛋白翻訳に関わるeIF2 $\alpha$ をリン酸化させることで、その翻訳を阻害し、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と考えられている(図1)。申請者の検討でも*in vitro*

図1. Protein kinase R (PKR)による抗ウイルス作用

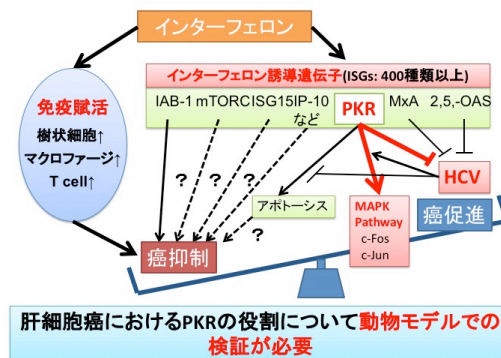


のHCV複製系においてHCV増殖によりPKRは誘導され、PKRの過剰発現は抗HCV作用を有した(文献1)。またPKRは臨床的に抗HCV薬として用いられるインターフェロン(IFN)により強く誘導されるが、IFNによる抗HCV効果はPKRの作用に依存していることを証明している(文献2)。同じく抗HCV薬として用いられるリバビリンも、肝細胞内の内因性IFNであるIFN- $\beta$ 産生を増加させ、PKRの発現増強を介して抗HCV作用を来すことを証明した(文献3)。

これらのことから、PKRはHCV増殖に抑制的に働き、肝細胞癌の発癌及び増生に「善玉」として作用することが想定される。しかし、申請者らのヒト肝細胞癌組織を用いた検討では、肝細胞癌部で非癌部よりもPKRは強発現しており(文献4)、また、肝線維化の進展とともにPKRの発現が増強することが確認された。さらに、HCV複製細胞株での検討で、PKRの強発現によりMAPKシグナルが活性化され、c-Fosおよびc-Junの活性化、それに伴う細胞増殖促進作用がみられた(文献5)。ヒ

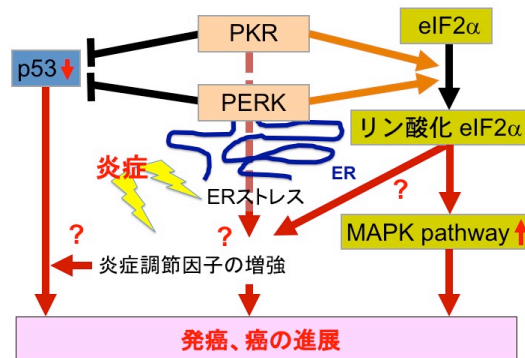
ト肝癌組織を用いた検討でも、PKRの高発現とc-Fos、c-Junの活性化は連動していた。つまり、肝線維化の進展とともに発現が増強するPKRは、肝細胞癌においてさらに過剰に発現しており、その結果MAPKシグナルを増強させ、細胞増殖に働く「悪玉」の面があることが示唆される。しかし、PKRの肝癌における「善玉」と「悪玉」の境界、役割の相違については十分解明されていない(図2)。

図2. PKRによる抗HCV作用と肝がん促進作用



一方、PKRと同様の活性を示す、PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase (PERK)も同様にdsRNA結合領域を有しており、eIF2 $\alpha$ を標的とした蛋白質合成阻害を誘導する。PERKは肝炎症によって生じるERストレスに影響され、PKRと同様に抗ウイルス作用を持つことが示されているが(文献6)、PKRとどのように連動し肝癌を調節しているかなど不明である。またPERKはPKRとともに癌への寄与が示唆されているが、肝癌での役割は十分解析されていない。炎症性免疫応答の調節に多面的な役割をもつPKRおよびその関連蛋白は、HCV感染に伴う発癌に代表される炎症性発癌のkey moleculeと思われる(図3)。

図3. PKR、PERKと炎症およびERストレス



### 2. 研究の目的

本研究はPKRとその関連蛋白をkey moleculeとしてHCVなどによる炎症性発癌の機序を解析することで、ウイルス感染による癌化と癌の進展について解析することを研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)ヒト肝細胞癌組織におけるPKR発現と肝癌累積再発率に関する臨床研究

肝細胞癌細胞株を用いた検討で PKR の肝癌増殖促進効果を *in vitro* モデルで証明しているが、図 2 のごとく、HCV についての抗ウイルス作用など生体にとって「善玉」として作用している可能性もあり、肝癌に対し生体のトータルとして PKR は「悪玉」と言えるのか、治療標的になり得るのかについてはヒト組織や動物モデルなどの *in vivo* の検討が必要であった。そのため、まずヒト肝細胞癌組織を用いた検討により、肝細胞癌の累積再発率を比較し、癌再発への影響をみた。肝細胞癌の手術を受けた患者より同意を得た後、肝癌組織における PKR mRNA 量を定量し、中央値で高発現群と低発現群の 2 群に分けて、肝細胞癌の累積発現率について検討した。

#### (2) 肝細胞癌細胞株を移植したヌードマウスの予後の検討

さらに *in vivo* における PKR 発現の影響についてみるため、動物モデルでの検証を試みた。5 週齢のヌードマウスに肝細胞癌細胞株である Huh7 を皮下移植し、同マウスに PKR inhibitor を連日腹腔内投与して腫瘍径と質量を経時的に測定し、非投与群との差について検討した。

#### (3) PKR ノックダウンに伴うエピジェネティックな遺伝子修飾についての検討

PKR により発現が増強することを同定し得た JNK は、肝癌においてヒストンメチル化に関与しているという報告がある(文献 7)。PKR 高発現による肝細胞癌促進作用に MAPK シグナルの活性化以外に DNA メチル化が関与している可能性がある。そのため 2 つの HCV 感染肝細胞株である JFH1 および H77s 細胞を用いて、PKR siRNA により PKR をノックダウンした際に DNA メチル化に関与する DNMT の変化について検討した。さらに、PKR ノックダウンによるメチル化頻度の変化を解析した。メチル化の変化を来した遺伝子をビーズアレイ解析で網羅的に解析し、遺伝子の同定を試みた。

#### (4) PKR の発現が PERK に及ぼす影響

PKR の下流にある eIF2 $\alpha$  に同じく作用する PERK について、PKR が変化することによる PERK 発現への影響、PKR への干渉作用、また下流分子である eIF2 $\alpha$  への影響および肝癌細胞増殖への影響について検討した。

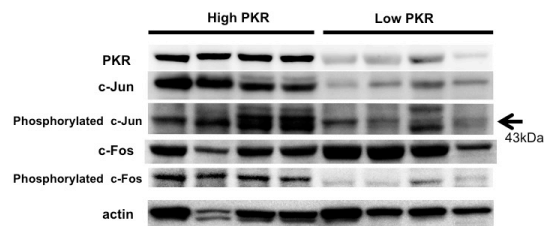
### 4. 研究成果

#### (1) ヒト肝細胞癌組織における PKR 発現と肝癌累積再発率に関する臨床研究

肝細胞癌を手術で切除した患者 34 例を対象に、同意書取得後に肝癌組織を凍結で保存し、蛋白および mRNA を抽出した。肝細胞癌組織における PKR の発現を Western blot により確認し、高発現している 4 例と、低発現している 4 群について、その下流にあり、up-regulate することを同定した c-Jun、

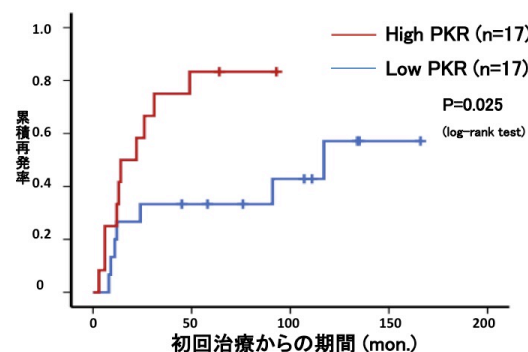
c-Fos、またその活性化型である phosphorylated c-Fos、phosphorylated c-Jun について Western blot によりその発現を確認した。その結果、PKR が高発現している症例では phosphorylated c-Fos、phosphorylated c-Jun の発現が強く、両者は活性化していることが確認された(図 4)。このことから、PKR による MAPK シグナル増強作用が臨床検体でも証明された。

図4. ヒト肝癌組織におけるPKRとc-Jun, c-Fosの発現および各々のリン酸化タンパクの発現



また、34 例の肝癌組織より抽出した PKR mRNA を real-time RT-PCR により定量し、中央値で高発現 14 例、低発現 14 例の 2 群に分けて、肝細胞癌の累積再発率をプロットした。その結果、PKR 高発現群 (high PKR) では、PKR 低発現群 (low PKR) に比べて肝細胞癌の累積再発率が高く ( $P=0.025$ , by log-rank test)、PKR の高発現が肝細胞癌再発にも寄与していることがわかった(図 5)。

図5. ヒト肝細胞癌におけるPKR発現量と累積再発率



#### (2) 肝細胞癌細胞株を移植したヌードマウスの予後の検討

さらに PKR 阻害による肝細胞癌の増殖抑制効果の有無について、動物モデルを用いた *in vivo* の検討を行った。5 週齢のヌードマウスに肝癌細胞株である Huh7 細胞を皮下注射し、その後、PKR inhibitor を連日腹腔内投与し、移植したマウスの肝細胞癌の腫瘍径を経時的にプロットした(図 6)。

腫瘍を PKR inhibitor あり群となし群の 2 群に分け、腫瘍容量の平均で比較したところ、図 7 のようになり、PKR inhibitor あり群で PKR inhibitor なし群に比べて腫瘍の増殖抑制効果がみられた(図 7)。

これらの検討により、肝細胞癌において高

図6. 肝細胞癌移植後マウスへのPKR阻害剤の影響

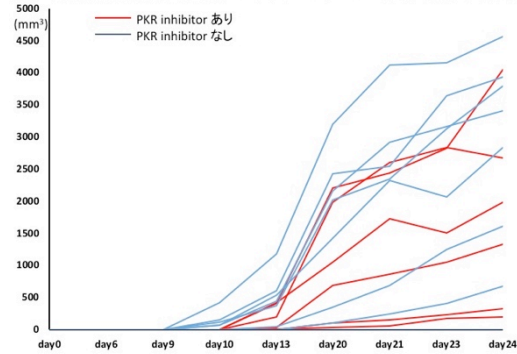
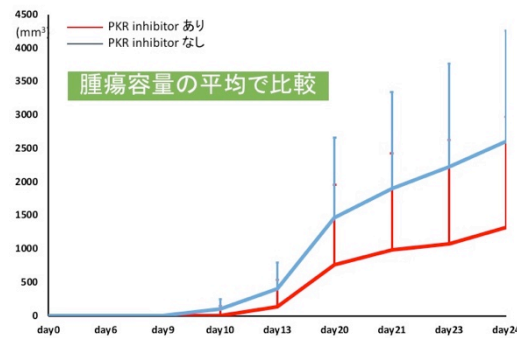


図7. PKR阻害剤による肝癌腫瘍容量の抑制効果

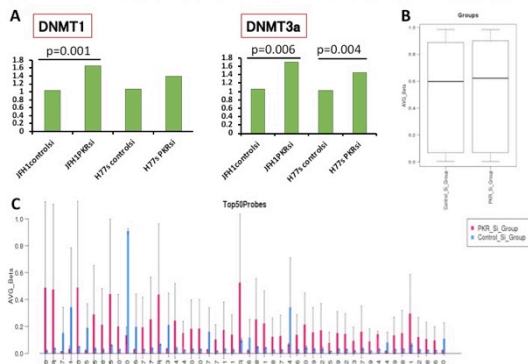


発現しているPKRは、肝細胞癌の再発率を高め、腫瘍容量を増大させる方向に作用することが明らかとなり、ヒト肝細胞癌において治療標的になり得ることが示唆された。

(3) PKR ノックダウンに伴うエピジェネティックな遺伝子修飾についての検討

C型肝炎ウイルスを感染させた肝細胞株であるJFH1, H77sを用いて、PKR siRNAによりPKRをノックダウンした際の、メチル化に関するDNMTの発現変化について、そのmRNA量をreal-time RT-PCRにより定量した。その結果、PKR ノックダウン時においてDNMT1およびDNMT3aの発現が有意に増加した(図8A)。これらのDNMT増加作用はHCV感染肝細胞株であるJFH1, H77sの2つともに見られた。

図8. PKRノックダウンによるDNAメチル化への影響



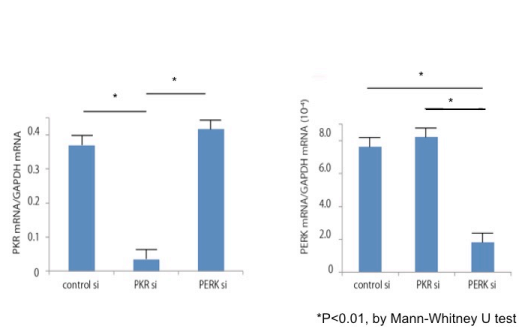
PKR siRNAによるPKR ノックダウン時のDNAメチル化頻度の変化についてビーズアレイ解析を行ったところ、全体としてメチル化頻度はPKR ノックダウン時に有意に増加していた(図8B)。さらに、DNAメチル化の変化を来

した遺伝子について網羅的に解析したところ、約50個の強く変化する遺伝子を同定した(図8C)。これらの遺伝子については、現在個々にreal-time RT-PCRを行い、その変化についてconfirmしている。

(4) PKRの発現がPERKに及ぼす影響

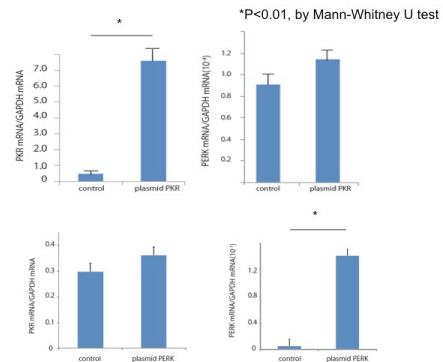
PKR siRNAを用いて肝癌細胞株(Huh7)にトランスフェクションしてPKR ノックダウン時におけるPERK mRNAの変化をみるとともに、PERK siRNAを作成し、PERKの発現を低下させ、PKR mRNAの変化をreal-time RT-PCRで定量した。その結果、PKR ノックダウン時にはPERK mRNAの増加傾向がみられ、またPERK ノックダウン時にはPKRの増加傾向がみられたが、有意差はみられなかった(図9)。

図9. PKR及びPERKノックダウン時の両分子の変化



また、PKRおよびPERK高発現時の両分子の変化について、各々の発現プラスミドを用いて検討した。その結果、PKR高発現時にPERK mRNAはむしろやや増加、PERK高発現時にもPKRの同様の増加傾向がみられた。しかし統計的有意差はみられなかった(図10)。このことから、PKRとPERKはともに相互の干渉作用は強くなく、各々独立して機能していることが示唆された。

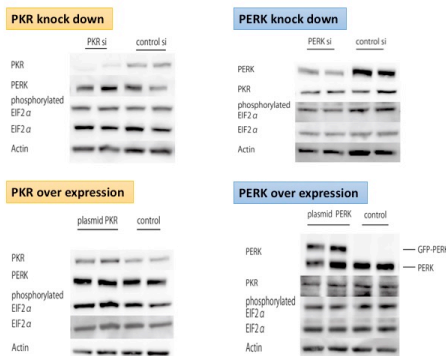
図10. PKR及びPERK高発現時の両分子の変化



次に、PKRおよびPERKをノックダウン、あるいは高発現した際の、その下流にあるeIF2αおよびその活性型のphosphorylated eIF2αの発現についてWestern blotで検討した。その結果、PKR siRNAによるPKR ノックダウン時にPERKの発現は軽度増加が伺われるものの、その下流のeIF2αはphosphorylated eIF2αとともに変化なく、PKR過剰発現でも明らかな変化はみられなかった(図11)。PERK

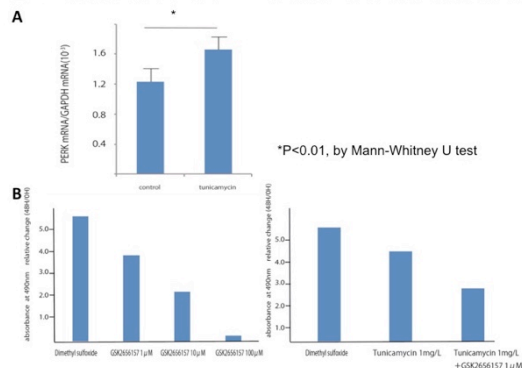
siRNAによるPERKノックダウン時はPKRの発現は特に変化はみられなかった。しかし、phosphorylated eIF2 $\alpha$ は明らかに低下しており、eIF2 $\alpha$ はPKRよりもPERKノックダウン時に影響を受けやすい可能性が考えられる。しかし、一方でPERK過剰発現の際にはPKR、リン酸化eIF2 $\alpha$ ともに明らかな発現変化はみられず、一定の傾向を示さなかったことから、PKRとPERKの明らかな干渉作用はみられず、むしろ、一方が変化してもeIF2 $\alpha$ とその活性型であるphosphorylated eIF2 $\alpha$ への影響を軽減するように、相互に補完し合っ

図11. PKR及びPERK変化時の両分子と下流の変化



酸化ストレス下におけるPERKの役割をみるため、Tunicamycinにより酸化ストレス刺激を加えたところ、肝細胞におけるPERK mRNA発現の増加がみられた(図12A)。さらにその状況下で、PERK阻害剤(GSK2656157)を添加し、PERKを阻害すると、MTSアッセイで吸光度値の低下がみられた(図12B)。PERKは酸化ストレスなどの小胞体ストレス時に細胞保護機能としての役割を持っている可能性がある。HCV感染時には小胞体ストレスが生じることから、感染および炎症時において肝細胞に良い役割を持つ反面、発癌および癌進展には負の作用を持つ可能性が考えられる。またその際のPKRの挙動と相互作用についても現在検討している。

図12. 酸化ストレスとPERK阻害による細胞増殖抑制



いずれにせよ、PKRはその下流を同じくするPERKとは比較的独立した挙動を示しており、PKRとPERKの一方を阻害しても、最終的なphosphorylated eIF2 $\alpha$ の発現量にあまり影響を与えないことが伺えた。PKRとPERKはお互い相補的に働き、細胞の生命維持に関わ

る転写因子であるeIF2 $\alpha$ の機能を維持していると考えられ、肝細胞癌における両者の機能について、eIF2 $\alpha$ を介さない作用も含めて、さらに網羅的な検討を含めて解析していく必要がある。

肝細胞癌におけるPKRは、ヒト検体およびマウスを用いた*in vivo*の検討においても、高発現により肝細胞癌の発癌、増殖を促し、肝細胞癌治療の分子標的となることが示された。また、下流タンパクとしてeIF2 $\alpha$ を共有するPERKとは比較的独立した挙動を示し、一方でPKRおよびPERKのいずれか一方を変化させてもeIF2 $\alpha$ 活性に変化が乏しいことから、両者は相補的に働きeIF2 $\alpha$ の機能を維持している可能性が示唆された。今後、細胞内酸化ストレス下におけるPKRとPERKの機能変化を明らかにし、細胞増殖および肝細胞癌進展への役割をさらに明らかにしていきたい。両者のeIF2 $\alpha$ 以外の細胞内分子への作用機序についても検討することで、PKR以外にも肝細胞癌の治療分子標的候補を同定できる可能性があり、今後さらに詳細に検討していく予定である。

#### <引用文献>

1. Hiasa Y, Blackard JT, Lin W, et al. J Virol Methods 132 巻 195-203, 2006.
2. Tokumoto Y, Hiasa Y, Horiike N, et al. J Med Virol 79 巻 1120-1127, 2007.
3. Tokumoto Y, Hiasa Y, Uesugi K, et al. J Infect Dis 205 巻 1121-1130, 2012.
4. Hiasa Y, Kamegaya Y, Nuriya H, et al. Am J Gastroenterol 98 巻 2528-2534, 2003.
5. Watanabe T, Hiasa Y, Tokumoto Y, et al. PLoS One 8 巻 e67750, 2013.
6. Baltzis D, Pluquet O, Papadakis AI, et al. J Biol Chem 282 巻 31675-31687, 2007.
7. Chang Q, Zhang Y, Beezhold KJ, et al. J Hepatol 50 巻 323-333, 2009.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Watanabe T, Imamura T, Hiasa Y. Roles of protein kinase R in cancer: Potential as a therapeutic target. Cancer Sci. 109:919-25, 2018. 査読有 DOI: 10.1111/cas.13551.
2. Watanabe T, Tokumoto Y, Hiasa Y, et al. Predictors of treatment efficacy and ALT non-normalization with sofosbuvir/ribavirin therapy for patients with hepatitis C virus genotype 2. J Med Virol. 89:1567-73, 2017. 査読有 DOI: 10.1002/jmv.24776.
3. Tada T, Kumada T, Hiasa Y, et al. Role of hepatic resection in patients with

- intermediate-stage hepatocellular carcinoma: A multicenter study from Japan. *Cancer Sci.* 108:1414-20, 2017. 査読有  
DOI: 10.1111/cas.13257.
4. Ohno Y, Koizumi M, Hiasa Y, et al. Downregulation of ANP32B exerts anti-apoptotic effects in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 12:e0177343, 2017. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0177343.
  5. Hirooka M, Koizumi Y, Hiasa Y, et al. Nonalcoholic fatty liver with a hepatic arterial buffer response strongly associated with future metabolic disease. *Hepatology* 66:1623-33, 2017. 査読有  
DOI: 10.1002/hep4.1070.
  6. Masugi Y, Abe T, Hiasa Y, et al. Quantitative assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 66:58-68, 2017. 査読有  
DOI: 10.1002/hep4.1121.
  7. Matsuura K, Sawai H, Hiasa Y, et al. Genome-Wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated with Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 152:1383-94, 2017. 査読有  
DOI: 10.1053/j.gastro.2017.01.041.
  8. Watanabe T, Joko K, Hiasa Y, et al. Simeprevir with peginterferon/ribavirin for patients with hepatitis C virus genotype 1: high frequency of viral relapse in elderly patients. *Springerplus* 5:26:518, 2016. 査読有  
DOI: 10.1186/s40064-016-2190-9.

[学会発表] (計 5 件)

1. Watanabe T, Tokumoto Y, Hiasa Y, et al. The roles of protein kinase R and its possibility as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma with hepatitis C virus infection. The Liver Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 2016.
2. Ohno Y, Koizumi M, Hiasa Y, et al. Down-regulated acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B (ANP32B) has a role in suppression of apoptosis, and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. The Liver Meeting of

American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) 2016.

3. Watanabe T, Tokumoto Y, Hiasa Y, et al. Protein kinase R modulates DNA methylation in hepatocellular carcinoma with HCV infection. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2016.
4. 渡辺崇夫、日浅陽一, HCV 関連肝細胞癌における Protein kinase R の役割, 第 25 回抗ウイルス療法学会総会, 2015.
5. 渡辺崇夫、小泉光仁、日浅陽一, C 型肝炎細胞癌における Protein kinase R の役割-c-Fos, c-Jun 活性化を介した細胞増殖促進作用, 日本がん分子標的治療学会第 19 回学術集会, 2015.

[図書] (計 1 件)

1. 渡辺崇夫、徳本良雄、日浅陽一. C 型肝炎細胞癌における Protein kinase R の役割, 第 31 回犬山シンポジウム -B 型肝炎・C 型肝炎・肝癌, 89-92, 2018. 犬山シンポジウム記録刊行会

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: B 型肝炎ワクチン

発明者: 小原道法、真田崇弘、日浅陽一、小原恭子、郷保正、織田康則

権利者: 同上

種類: A: 創薬に関する研究成果に係わる特許

番号: 特願 2017-138047

出願年月日: 平成 29 年 7 月 25 日

国内外の別: 国内

名称: 経鼻 B 型肝炎ワクチン組成物およびその製造方法

発明者: 上下泰造、宮崎隆、小原道法、真田崇弘、日浅陽一、吉田理、小原恭子、長谷川秀樹

権利者: 同上

種類: A: 創薬に関する研究成果に係わる特許

番号: 特願 2017-195262

出願年月日: 平成 29 年 10 月 5 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページの開示なし

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