

(第3号様式)

学 位 論 文 要 旨

氏 名 渡辺 崇夫

論 文 名 C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌においてみられた、Protein kinase R
による c-Fos と c-Jun 活性化を介した細胞増殖促進作用

学位論文要旨

[背景と目的]

Protein kinase R (PKR)は、C型肝炎ウイルス (HCV)を含む RNA ウイルスが複製する際に生じる二本鎖 RNA によって活性化され、ウイルスの増殖を抑制する細胞内蛋白である。申請者らは、すでに PKR が、非癌部の肝組織に比べて HCV 関連肝細胞癌において強発現していることを同定してきた。しかし強発現した 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。そこで、申請者は、HCV 発現肝癌細胞株を作成し、PKR の発現を増減させることにより増減する癌関連遺伝子を同定することで、HCV による PKR を介した肝細胞癌発生の機序について検討した。また、ヒト肝細胞癌組織を用いて、HCV 発現肝癌細胞株の実験で同定された癌関連遺伝子が PKR 発現量によって増減するかについて検討した。

本研究は、HCV 関連肝細胞癌で強発現する PKR により活性化される癌関連遺伝子を同定することで、HCV による肝細胞癌の発生における PKR の役割を明らかにすることを目的とした。

[材料と方法]

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 と、HCV genotype 1 型の全遺伝子を複製する肝細胞癌株である H77s 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。

氏名 渡 辺 崇 夫

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。

[結果と考察]

1. 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. 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 株で大きかった。
3. 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。
4. 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。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。
5. 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。
6. ヒト肝細胞癌組織を用いた実験 (材料と方法 5) 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。ウエスタンブロットにて、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。

[結論]

HCV 感染関連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 を調節することが治療に結びつく可能性が示唆された。

キーワード (3~5)

PKR, HCV, 肝細胞癌, c-Fos, c-Jun