

学位論文審査結果の要旨

氏名	渡辺 崇夫
審査委員	主査 今村 健志 副査 田中 潤也 副査 小笠原 正人 副査 杉田 敦郎 副査 井上 博文

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

審査結果の要旨

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タンパク質である。申請者らはこれまでの検討で、PKRが、HCV関連の肝細胞癌において非癌部の肝組織に比べて高発現することを報告してきた。しかし、HCV関連肝細胞癌で高発現するPKRの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る。

そこで申請者は、HCV発現肝癌細胞株を用いてPKRの発現を増減させ、発現量に変化のみられる遺伝子を同定し、その機能を検討した。まず、肝癌細胞株Huh7.5.1を用いて、HCV2型の全遺伝子を複製するJFH1株と、HCV1型の全遺伝子を複製するH77s株を作製した。それらの細胞株を用いてin vitro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おこない、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。以上の結果を、リアルタイムPCRにより確認し、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することを示した。

次に、細胞増殖アッセイ (MTS アッセイ) と wound-healing アッセイをおこない、PKR ノックダウンにより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し、PKR ノックダウンにより傷の修復が遅延することを示した。さらに、c-Fos を阻害する U0126 と c-Jun を阻害する SP600125 を添加すると、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。

最後に、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 が増加していることを明らかにした。また、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。

本学位審査は平成 24 年 11 月 15 日に開催され、申請者は、*in vitro* で gain-of-function 実験と loss-of-function 実験をおこない、PKR の役割とその機序を解析し、さらに、ヒト肝細胞癌組織を用いた実験をおこない、HCV 感染関連肝細胞癌で強発現している PKR は c-Fos と c-Jun の活性化による細胞増殖能亢進能を有し、この作用が PKR の腫瘍増殖作用と発癌作用に寄与していることを明解に発表し、HCV 感染関連肝細胞癌で過剰に発現する PKR がその治療標的となり得る可能性を示した。①PKR による c-Fos と c-Jun の活性化におけるタンパク量とリン酸化の関係、②PKR と IL-8、NFkB の関係、③正常肝細胞における PKR の発現とその作用、④肝炎と肝癌における PKR の作用と AP-1 活性の違い、⑤PKR の機能解析における wound-healing アッセイの意義、⑥肝癌以外の癌における PKR の発現とその作用、等について質疑応答があり、申請者は的確に答えた。本来、HCV に対して抑制的に作用する PKR が、HCV 関連の肝細胞癌において非癌部の肝組織に比べて高発現することに着目し、PKR が肝細胞癌において c-Fos と c-Jun の活性化による細胞増殖能亢進能を有し、この作用が PKR の腫瘍増殖作用と発癌作用に寄与していることを明らかにした点は特記でき、肝細胞癌治療の面で大いなる寄与をもたらす点を評価し、審査員は全員一致で本研究が学位(医学)に値すると判定した。