

学 位 論 文 要 旨

氏 名：今井 祐輔

論 文 名：肝星細胞における Protein kinase R の活性化と肝細胞癌の進展への影響

学位論文要旨

【背景と目的】 1938/2000

肝細胞癌の進展には、サイトカインやケモカインなど肝非実質細胞により形成される腫瘍微小環境が影響する。肝非実質細胞である肝星細胞(HSC)は、サイトカインや DAMP (damage associated molecular patterns)などの様々な刺激により活性化し、細胞外器質やサイトカインを分泌することで腫瘍微小環境を形成し、肝細胞癌(HCC)の進展に関与すると考えられる。しかし、その詳細な機序は明らかではない。

Protein kinase R (PKR) は HCC において高発現し、癌細胞増殖促進に寄与していることが同定されている。刺激された HSC においても PKR が高発現することが報告されているが、その生理的作用、特に HCC に対する役割は不明な点が多い。PKR は TLR などの細胞レセプターを介した刺激によりリン酸化が促進することで炎症にも関与するとされ、マクロファージにおいては IL-1 β の産生調節に関わっている。IL-1 β は癌細胞の増殖および浸潤を亢進するとされ、HSC でも LPS による刺激などによりその分泌が促進されることから、HCC の腫瘍微小環境形成に刺激された HSC、および同 HSC から産生された IL-1 β が関与し、その調整に PKR が関与する可能性が想定される。

本研究では、刺激された HSC の PKR 活性化と、サイトカイン産生および HCC への影響を評価し、HCC の進展における HSC および HSC で活性化する PKR の腫瘍微小環境形成に果たす役割について明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

1. ヒト肝星細胞株 (LX-2 細胞) を LPS で刺激し、PKR、MAPK カスケードの遺伝子および蛋白の発現、IL-1 β の産生を、リアルタイム(RT-)PCR、ウエスタンブロット法、ELISA によって評価した。
2. PKR を阻害した際の IL-1 β の産生への影響を検討するため、PKR 阻害剤で処理した LX-2 細胞、および PKR siRNA をトランスフェクションして PKR の発現をノックダウンした LX-2 細胞について、IL-1 β の産生量の変化を RT-PCR、ELISA で評価した。
3. LPS で活性化した HSC の形成する腫瘍微小環境による HCC への影響を検討するため、LPS で刺激した LX-2 細胞のコンディショニング培地(CM)でヒト肝細胞癌由来細胞株 (HepG2 細胞) を培養し、HepG2 細胞の増殖能の変化を細胞増殖アッセイ、スクラッチアッセイで、浸潤能の変化を細胞浸潤アッセイによって評価した。

氏名 今井 祐輔

4. NASH の進展に関与する長鎖脂肪酸であるパルミチン酸(PA)による HSC への影響を評価するため、HSC を PA で刺激し、IL-1 β の産生を、RT-PCR、ウェスタンブロット法、ELISA によって評価した。
5. PA で活性化した HSC の形成する腫瘍微小環境による HCC への影響を検討するため、PA で刺激した HSC の CM で HepG2 細胞を培養し、増殖能の変化を細胞増殖アッセイ、スクラッチアッセイで評価した。

【結果と考察】

1. LX-2 細胞は、LPS 刺激により、IL-1 β の産生が亢進した。また、LX-2 細胞は、LPS 刺激により、PKR mRNA の増加および PKR のリン酸化の亢進がみられた。さらに、PKR 活性化に伴い、MAPK シグナルの ERK1/2、JNK、c-Fos、c-Jun の発現亢進、活性化がみられた。
2. PKR 阻害剤ならびに、PKR siRNA で LX-2 細胞における PKR の発現を抑制すると、LPS 刺激による LX-2 細胞の IL-1 β 産生が阻害された。
3. LPS で刺激した LX-2 細胞の CM を HepG2 細胞に添加すると、細胞増殖アッセイ、スクラッチアッセイおよび細胞浸潤アッセイにて、HepG2 細胞の細胞増殖能、浸潤能の増強が見られた。PKR 阻害剤で LX-2 細胞の PKR を阻害した CM で HepG2 細胞を培養すると、これらの増強効果は消失した。
4. PA で刺激した LX-2 細胞では、IL-1 β の産生が亢進した。これらの効果は、PKR 阻害剤の投与で消失した。
5. PA で刺激した LX-2 細胞の CM は、LPS で刺激した CM と同様、HepG2 細胞の細胞増殖能を増強させた。一方、PKR 阻害剤で処理した後 PA で刺激した LX-2 細胞の CM では、HepG2 細胞の細胞増殖はみられなかった。

【結論】

LPS および PA により刺激された HSC では PKR が活性化し、PKR 依存性に IL-1 β 産生が亢進した。また、HSC より産生された IL-1 β が肝細胞癌の進展を促進した。活性化 HSC による HCC 増殖促進に PKR が関与することから、HSC における PKR が HCC 進展抑制のための新たな治療標的となる可能性が示唆された。

キーワード (3~5)	肝星細胞 肝細胞癌 非アルコール性脂肪肝炎 IL-1 β PKR
-------------	--