

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	今井 祐輔
審査委員	主査 今村 健志 副査 高田 泰次 副査 鷓久森 徹 副査 村上 正基 副査 石丸 啓

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

審査結果の要旨

【背景と目的】 がんの悪性化・進展においてがん微小環境が重要な役割を果たしており、肝細胞がん(HCC)においては、肝星細胞(HSC)がHCCの進展に関与すると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。一方、HCCにおいて高発現し、その増殖に関わっている Protein kinase R (PKR) が、活性化されたHSCにおいて高発現することが報告されているが、その作用機序、特にHCCに対する役割は不明である。申請者らは、HSCにおけるLPSおよびNASHの進展に関与するパルミチン酸(PA)が誘導するIL-1 β 産生にPKRに関わり、これらがHCCのがん微小環境形成に重要な役割を果たすという仮定を立て、実験的立証を試みた。

【材料と方法】 まず、ヒト肝星細胞株(LX-2細胞)におけるLPSの下流シグナルを同定するために、LPS刺激LX-2細胞で、PKRとMAPKシグナルの遺伝子・タンパク質発現、IL-1 β 産生を、リアルタイム(RT-)PCR、ウエスタンブロット(WB)とELISAによって評価した。次に、LPS誘導性IL-1 β 産生におけるPKRの関与を明らかにするために、PKR阻害剤C16で処理したLX-2細胞とsiRNAによってPKRをノックダウンしたLX-2細胞を用いて、LPS誘導性IL-1 β の産生量の変化をRT-PCRとELISAで評価した。さらに、LPS刺激によってHSCから分泌される液性因子のHCCへの影響を検討するため、ヒト肝細胞がん由来細胞株(HepG2細胞)に対するLPS刺激LX-2細胞のコンディショニング培地(CM)の影響を、増殖アッセイ、スクラッチアッセイでと浸潤アッ

セイによって評価した。一方、PA の 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 と WB、ELISA によって評価した。最後に、PA 刺激によって HSC から分泌される液性因子の HCC への影響を検討するため、HepG2 細胞に対する PA 刺激 LX-2 細胞 CM の影響を、増殖アッセイとスクラッチアッセイで評価した。

【結果と考察】LPS 刺激により、LX-2 細胞の IL-1 β の産生が亢進し、PKR mRNA の増加と 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、活性化が認められ、LX-2 細胞における LPS の下流シグナルが同定された。次に、阻害剤 C16 または siRNA によって LX-2 細胞における PKR の活性・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、LX-2 細胞における LPS 誘導性 IL-1 β 産生における PKR の関与が明らかになった。また、LPS 刺激 LX-2 細胞 CM を HepG2 細胞に添加すると、HepG2 細胞の細胞増殖能、浸潤能の増強が見られ、PKR 阻害剤で LPS 刺激 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ことから、LPS 刺激によって HSC から分泌される液性因子が HCC の増殖・浸潤に関与していることが明らかになった。さらに、PA で刺激した LX-2 細胞では、IL-1 β の産生が亢進しその効果は、PKR 阻害剤の投与で消失したことから、LPS に加え、PA 刺激によっても PKR を介して IL-1 β 産生が誘導されることが明らかになった。最後に、PA 刺激 LX-2 細胞 CM は、HepG2 細胞の増殖能を増強させ、PKR 阻害剤で処理した PA 刺激 LX-2 細胞 CM では、HepG2 細胞の細胞増殖はみられなかったことから、LPS に加え、PA 刺激によって HSC から分泌される液性因子が HCC の増殖・浸潤に関与していることが明らかになった。以上のことから、LPS および PA により HSC において活性化される 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。

本学位審査は平成 31 年 1 月 22 日に開催され、申請者は、研究の背景から内容、特に HSC の LPS・PA 誘導性 IL-1 β 産生における PKR の関与とその分子メカニズム、PKR 阻害剤の臨床応用の可能性まで英語で明確に発表した。審査員より、①スクラッチアッセイなど実験方法の詳細と意義、②PKR と IL-1 β 産生の直接的な関与の実証方法、③TGF- β など他の PKR の上流因子の関与、④IL-1 β 以外の PKR の下流因子の関与、⑤阻害剤の作用機序と解釈、⑥予防を含めた臨床応用の可能性について等、日本語で質疑応答があり、申請者は的確に答えた。

分子生物学的手法を駆使した詳細な解析から、HSC における PKR の役割とその分子メカニズムを明らかにし、新たな肝がん治療法の可能性が示唆された点を高く評価し、審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。