

論文内容の要旨

Downregulation of protein disulfide-isomerase A3 expression inhibits cell proliferation and induces apoptosis through STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma

肝細胞癌において Protein disulfide-isomerase A3 の発現抑制は
STAT3 シグナルを介して細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導する

日本医科大学大学院医学研究科 消化器外科学分野

大学院生 近藤 亮太

International Journal of Oncology (2019) 掲載予定

【背景】

肝細胞癌は炎症を背景に進展することが知られ、炎症性シグナルである signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 経路の活性化がその進展に寄与する。肝細胞癌は、予後の悪い癌であり効果的な治療法が模索されている。Protein disulfide-isomerase A3 (PDIA3)は、新規合成蛋白やミスフォールディング蛋白を管理するシャペロン蛋白で、小胞体の恒常性維持に関わる一方、多様な蛋白と複合体を形成していることも知られる多機能蛋白である。近年、肝細胞癌の予後不良因子として PDIA3 の高発現が報告されており、肝細胞癌における PDIA3 の機能が注目されるが、その解明には至っていないのが現状である。本研究では、肝細胞癌の進展に PDIA3 がどのように寄与するのかについて、肝細胞癌における PDIA3 と STAT3 シグナル経路の活性化の関係性について着目し検討した。

【方法】

外科的に切除された 53 例の肝細胞癌の組織標本を用い PDIA3 の免疫染色を行い、PDIA3 発現が高い 29 例と低い 24 例に分け、臨床病理学的因子、Ki-67 index による細胞増殖能、Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシスとの関連を検討した。細胞実験には、ヒト肝癌細胞株 HuH-7 と huH-1 を用いた。PDIA3 の発現抑制には、small interfering RNA (siRNA) を用いた。PDIA3 の発現抑制による細胞への影響を、細胞増殖解析、FITC-Annexin V によるアポトーシス細胞の測定、Propidium iodide 染色による細胞周期解析を行い調べた。PDIA3 の発現抑制が、小胞体ストレスを介したアポトーシスを誘導しているか調べるため、小胞体ストレスマーカーである 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) の発現をウエスタンブロット法にて観察した。PDIA3 と STAT3 の関係性において、免疫蛍光染色による共局在の有無、共免疫沈降法による蛋白間の結合性の確認を行った。さらに、PDIA3 の発現を抑制した細胞において、リン酸化 STAT3 (Tyr 705; P-STAT3)、STAT3 シグナル下流の蛋白 (survivin, XIAP, Mcl-1, Bcl-2, Bcl-XL, Cyclin D1, p53) の発現の変化をウエスタンブロット法により確認した。PDIA3 の発現抑制による細胞増殖抑制が、STAT3 経路を介しているか確認するため、STAT3 シグナル阻害剤である AG490 投与下で PDIA3 の発現を抑制し細胞増殖解析を行った。最後に、35 例の組織標本にて P-STAT3 の免疫染色を行い、P-STAT3 陽性 15 例と陰性 20 例における PDIA3 発現との関連を検討した。

【結果】

PDIA3 の発現と腫瘍径、脈管侵襲、組織型などの病理組織学的因子との関連はなかった。一方で、PDIA3 の発現が高い肝細胞癌では、高い Ki-67 Index を示し、アポトーシス細胞が少なかった。肝癌細胞株での PDIA3 発現抑制は、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。PDIA3 の発現抑制により、GRP78 の発現は増加せず、小胞体ストレスを誘導し

なかった。さらに PDIA3 と STAT3 の関係性について検討した。肝癌細胞株において、PDIA3 と STAT3 の細胞内の局在の一致と複合体形成を確認した。PDIA3 の発現抑制は、P-STAT3 を抑制し、抗アポトーシス蛋白 (Bcl-XL、Mcl-1、survivin、XIAP) の発現を抑制した。AG490 による STAT3 シグナル抑制は、肝細胞癌株の増殖能を抑制した一方で、AG490 投与下での PDIA3 発現抑制は相乗効果を示さなかった。組織標本において、P-STAT3 陽性の肝細胞癌検体は、PDIA3 発現が高く、P-STAT3 陰性のもものでは、PDIA3 発現が低かった ($P < 0.001$)。

【結語】

本研究は、組織標本の免疫染色と細胞実験により、PDIA3 が細胞増殖とアポトーシスを制御していることを示した。さらにそのメカニズムとして、PDIA3 が STAT3 経路を介して抗アポトーシス蛋白の発現を制御していることが明らかとなった。肝細胞癌の進展には、慢性炎症が寄与しており、PDIA3 が炎症性シグナルである STAT3 経路の活性を制御している。このことは、PDIA3 が重要な治療標的となる可能性を示唆するものである。