

学位論文題名

Critical Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Anchorage-independent Growth and Hematogeneous Intrahepatic Metastasis of Liver cancer

(肝細胞癌肝内転移及び足場非依存性増殖における  
phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K) /Akt 系の関与)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

癌の血行性転移は主腫瘍からの癌細胞の離脱、血管系への浸潤、血管内の移動、標的臓器での脱出・増殖などの多段階からなる。そのいくつかの過程で細胞-細胞間および細胞-間質間の接着が失われ、癌細胞の増殖・生存には不利な環境となる。そのため、転移の成立には癌細胞がそのような環境でも増殖・生存可能であること(足場非依存性増殖・生存)が重要と考えられる。

セリン/スレオニンキナーゼである Akt はマウスに胸腺種を起こすレトロウイルスから得られた癌遺伝子である v-Akt のホモログとして同定された。この酵素は phosphatidylinositol 3-OH kinase(PI3K)によりリン酸化を受け活性化する。活性化した Akt はアポトーシスの抑制、細胞増殖、糖代謝などを制御する。一般に、正常上皮細胞は細胞基質から離れると急速に PI3K のレベルが低下することで Akt の活性も低下してアポトーシスにおちいる。一方、Ras でトランスフォームした上皮細胞では恒常的に Akt が活性化しており、基質からの離脱によるアポトーシスが抑制される。このことは活性化した Akt により上皮細胞が足場非依存性増殖能を獲得したことを示唆する。

肝細胞癌は予後不良であり、その主たる原因は術後の高率な肝内転移再発にある。肝内転移再発は癌細胞の門脈内散布によると考えられている。事実、肝細胞癌の門脈侵襲は予後不良因子であり、また周術期の肝細胞癌患者の末梢血中に肝細胞癌の腫瘍マーカーである AFP の mRNA が認められる。しかし、門脈侵襲陽性例や末梢血中の AFP mRNA 陽性例が必ずしも肝内転移再発を起こすとは限らない。このことは肝内転移の成立には癌細胞が血中に散布されるだけでなく、散布された癌細胞の足場非依存性増殖・生存が必要である可能性を示唆する。

本研究では肝細胞癌肝内転移における足場非依存性増殖と PI3K/Akt 系の関与を示し、それを標的とした新しい肝内転移に対する治療の可能性を示すことを目的とした。

【方法】

1) 国立がんセンター研究所病理部で作成したヒト肝細胞癌由来細胞株を用いた SCID マウス同所性移植肝内転移モデルで異なる転移性を示す 5 細胞株 Li7、KYN-2 (転移株)、PLC/PRF/5、HepG2、KIM-1 (非転移株) について足場非依存性増殖を colony formation assay 法を用いて評価した。

2) その 5 株について Akt 蛋白の発現量および活性化の状態を Western blot 法を用いて検討した。

3) Akt の活性化と足場非依存性増殖能との直接的な関与を評価するために dominant-negative

K179A-Akt mutant (東大分生研 藤田直也、鶴尾隆博士より供与)を Li7 細胞にトランスフェクションし、モノクローナルとポリクローナルな安定株をそれぞれ樹立し、それらを用いて colony formation assay 法による足場非依存性増殖能の変化を検討した。次に PI3K の特異的阻害剤(LY294002)を用いて同様の検討を行った。

4) PI3K/Akt 系の抑制による同所性移植肝内転移モデルの肝内転移に対する影響を検討するために、3) で樹立した dominant-negative Akt を安定発現させた Li7 細胞を用いて転移能の変化を検討した。次に LY294002 を投与し Li7 細胞の転移能の変化を検討した。LY294002 はマウスの腹腔内に移植した浸透圧ポンプより持続的に投与されるようにした。LY294002 の投与は主腫瘍の形成及び増殖への影響を無視できる接種後 2 週間目より開始した。

#### 【結果】

1) 本研究で用いた同所性移植肝内転移モデルでは Li7、KYN-2、KIM-1、PCL/PRF/5、HepG2 の 5 細胞株で接種した部位に腫瘍が形成され、Li7、KYN-2 では高率に肝内転移がおきる。このモデルは主腫瘍より経門脈的に癌細胞が散布し肝内転移を起こす像が病理組織学的に認められ、肝細胞癌の肝内転移の臨床像を良く模倣している。これらの 5 つの細胞株では足場非依存性増殖能を示す soft agar 内の colony の形成数はその株の転移能とよく相関した。この結果は転移株が非転移株に比べて足場非依存性増殖能が高いことを示す。

2) 血清存在下の 5 つの細胞株では Akt 蛋白はすべての細胞株でほぼ同等に発現していたが、転移性を有する Li7、KYN-2 の 2 細胞株でのみ強く活性化していた。

3) dominant-negative Akt を安定発現した細胞は通常培養下では Mock 細胞の約 80% の増殖であったが、colony formation assay 法では Mock 細胞に比べ約 1/3 の colony 数であった。PI3K の特異的阻害剤である LY294002 は競合的・可逆的に PI3K の ATP-binding サイトを阻害し Akt の活性化を抑制する。Li7 においても LY294002 は濃度依存性に Akt の活性化を抑制し、50  $\mu$ M の投与で完全に阻害した。Li7 細胞において LY294002 (20  $\mu$ M) を培地へ連日添加した細胞が非添加細胞に比べ、細胞数の増加が、抑えられることを確認した。さらに、LY294002 (0  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) を 3 週間連日投与した colony formation assay 法では濃度依存性に colony の数が減少した。これら結果より Li7 細胞における足場非依存性増殖は PI3K/Akt 系により制御されていることが示唆された。

4) dominant-negative Akt を安定発現させた Li7 細胞を用いて同所性移植を行ったところ、主腫瘍の最大腫瘍径と腫瘍体積はすべての細胞株で差はなく、dominant-negative Akt の発現は主腫瘍の形成及び増殖には関与しなかった。しかし、肝内転移はモノクローナルな安定株を接種した群が Mock 細胞を接種した群の約 1/3 に、ポリクローナルな安定株を接種した群が約 1/2 に減少した。次に LY294002 を用いた検討では経過中、副作用と思われる変化は認められなかった。マウスの体重は、LY294002 の投与開始後から犠牲死までの全期間で投与群は対照群に比べ重かった。主腫瘍の最大腫瘍径は両群間に差はないものの、腫瘍体積は投与群が対照群に比べやや小さい傾向にあった。また、肝内転移は投与群が対照群に比べ約 1/3 に減少した。

#### 【考察】

今回の結果は肝細胞癌の肝内転移が足場非依存性増殖および Akt の活性化の状態と良く相関することを示した。さらに、dominant-negative Akt の安定発現及び PI3K の特異的阻害剤 LY294002 の投与が足場非依存性増殖を抑制し、同所性移植肝内転移モデルの肝内転移を減少させた。このことは活性化した Akt が足場非依存性増殖を介した肝内転移に重要であることを意味する。このことは PI3K/Akt 系は肝細胞癌の肝内転移を制御するための重要なターゲットになり得る。LY294002 の適切な投与方法や投与量についての検討や Akt の特異的な阻害剤の開発は PI3K/Akt 系をターゲットとした肝細胞癌の肝内転移の治療を考える上で今後の重要な課題である。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 加 藤 紘 之  
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

### Critical Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Anchorage-independent Growth and Hematogeneous Intrahepatic Metastasis of Liver cancer

(肝細胞癌肝内転移及び足場非依存性増殖における  
phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K) /Akt 系の関与)

肝細胞癌は未だ予後不良であり、その主たる原因は高率な術後肝内転移再発にある。肝内転移再発は癌細胞の門脈内散布によると考えられているが、門脈侵襲陽性例が必ずしも肝内転移再発を起こすとは限らない。癌の血行性転移は多段階からなるが、その過程で細胞-細胞間および細胞-間質間の接着が失われ、癌細胞の増殖・生存には不利な環境となる。そのため、肝内転移の成立には癌細胞が血中に散布されるだけでなく、そのような環境でも増殖・生存可能であること（足場非依存性増殖・生存）が重要と考えられる。セリン/スレオニンキナーゼである Akt は phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K) によりリン酸化を受け活性化し、アポトーシスの抑制、細胞増殖、糖代謝などを制御する。ヒト肝細胞癌由来細胞株を用いた SCID マウス同所性移植肝内転移モデルでは Li7、KYN-2、KIM-1、PCL/PRF/5、HepG2 の 5 細胞株で接種した部位に腫瘍が形成され、Li7、KYN-2 では高率に肝内転移がおきることがすでに国立がんセンター研究所病理部より報告されている。このモデルは主腫瘍より経門脈的に癌細胞が散布し肝内転移を起こす像が病理組織学的に認められ、肝細胞癌の肝内転移の臨床像を良く模倣している。これらの 5 つの細胞株において肝内転移能と足場非依存性増殖能の関係を soft agar colony formation 法を用いて検討したところ、2 つの転移株 (Li7、KYN-2) は他の非転移株より多く colony を形成した。次に、5 つの細胞株で Akt 蛋白の発現量とその Akt の活性化の状態を Western blot 法で検討した。血清存在下の 5 つの細胞株では Akt 蛋白の発現量はほぼかわらなかったが、Akt のリン酸化の状態は 2 つの転移株が他の非転移株に比べ非常に強かった。以上の結果より同所性移植肝内転移モデルの肝内転移は足場非依存性増殖能及び Akt の活性化の状態と良く相関する事が示された。次に Akt の活性化と足場非依存性増殖能との直接的な関与を評価するため

に dominant-negative K179A-Akt mutant を Li7 細胞にトランスフェクションし安定発現株を得て、Colony formation assay 法を行ったところ、いずれの安定発現株でもは Mock 細胞に比べ colony 形成数が減少した。さらに PI3K の特異的阻害剤である LY294002 を 3 週間連日投与した colony formation assay 法では濃度依存性に colony の数が減少した。これら結果より Li7 細胞における足場非依存性増殖は PI3K/Akt 系により制御されていることが示唆された。さらに PI3K/Akt 系の抑制による同所性移植肝内転移モデルの肝内転移に対する影響を検討するために、まず dominant-negative Akt を安定発現させた Li7 細胞を用いて同所性移植を行った。肝内転移は安定発現株を接種した群が Mock 細胞群に比べ、少なかった。また、LY294002 の同所性移植肝内転移モデルにおける肝内転移に対する影響を検討した。LY294002 はマウスの腹腔内に移植した浸透圧ポンプより持続的に投与されるようにした。経過中、副作用と思われる変化は認められなかったが、肝内転移は投与群が対照群に比べ少なかった。以上よりヒト肝細胞癌由来細胞株 SCID マウス同所性移植肝内転移モデルにおいて、肝内転移と足場非依存性増殖は PI3K/Akt 系の抑制により制御されることが示された。

公開発表後、副査の加藤教授より 1) 活性化 Akt の抑制に対する in vivo と in vitro での抑制程度の差の乖離について 2) 臨床応用を想定して PI3K/Akt 系を抑制した際の主腫瘍と転移巣に対する予想される結果等の質問があった。それに対し、1) in vivo では増殖因子など外的因子が無視できないことや MAPK 系の増殖能の関与の可能性がある点、2) 临床上は腫瘍を形成した主腫瘍や転移巣には効果が少なく、血管内に浮遊している細胞に効果が期待できる等の回答があった。次に副査の藤堂教授より HepG2 細胞が足場非依存性増殖能が比較的高いにもかかわらず転移しない理由や cell line の背景と転移能について質問があった。HepG2 細胞は運動能が低いため転移できない事や cell line の分化度がある程度は転移能と関係する事などが回答として示された。最後に主査の浅香教授からは、cell line の選択や dominant-negative Akt を安定発現させた細胞株についての質問があった。分化度が低い Li7 は肝内転移の系としては必ずしも特殊でない点やクローン間の抑制程度の差が実験に影響を与える可能性が回答として示された。またターゲットとなる転移過程についての質問があり、術中散布された細胞のような腫瘍を形成する以前の脈管内に存在する癌細胞がターゲットになるとの回答がなされた。

本論文は、肝細胞癌の肝内転移が足場非依存性増殖を介し PI3K/Akt 系によりは制御されることを示した世界で初めての報告であり高く評価され、PI3K/Akt 系が肝細胞癌の肝内転移を制御するための重要なターゲットとなり、臨床応用されることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。