

# 論文内容の要旨

## 論文題目

脂肪肝から肝腫瘍を形成する肝特異的 *Pik3ca* 強制発現マウスの作成と解析

指導教員 小池 和彦 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 18 年 4 月入学  
医学博士課程  
内科学専攻

工藤 洋太郎

非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

および脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH) は非ウイルス性の肝癌の発生母地となる。NAFLD は日常的な栄養状態にも起因し、発癌との関連は臨床上の課題といえる。NAFLD から NASH への進行、発癌への影響因子についての検討が盛んに行われているが、まだ分子医学的な機序は不明な点が多い。一方、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) シグナルの異常が、ヒト悪性腫瘍に関与する知見は多く、とくに *PIK3CA* 遺伝子で肝細胞癌での変異 (N1068fs\*4) も報告された。さらには PI3K シグナルを抑制する Phosphatase and

tensin homolog deleted from chromosome 10 (*PTEN*) 遺伝子の変異も肝がんで認められ、肝細胞特異的な *Pten* 欠損マウスが脂肪肝から肝炎、発癌を呈すると報告された。これらは PI3K シグナル異常が脂肪肝から発癌に関与する可能性を示唆した。PI3K シグナルの異常亢進が脂肪肝から発癌を引き起こすのに十分かどうか、また PTEN のもつ多様な生物学的作用を鑑み、その低下による脂肪肝および発癌への病態が PI3K シグナルの活性化のみで説明されうるかなどはいまだ不明である。よって本研究では肝細胞特異的 *Pik3ca* 強制発現マウスを作成、解析することにした。

マウスの肝組織所見、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ値、肝組織中トリアシルグリセロール値、全脂質構成脂肪酸組成解析を、野生型と *Pik3ca* 強制発現マウスと、あるいは *Pik3ca* 強制発現マウスの肝腫瘍部と背景肝組織とで比較検討した。肝腫瘍部と背景肝組織の各種遺伝子の発現をイムノブロット法ないし定量的リアルタイム PCR 法にて解析した。*In vitro* での腫瘍形成能の評価法として軟寒天培地コロニー形成アッセイをおこなった。

*Pik3ca* 強制発現マウスは単純性脂肪肝を呈するが、炎症細胞浸潤や線維化などの NASH の所見は生じなかった。マウス正常肝細胞株である BNL-CL2 細胞をもちいた *in vitro* の検討では *Pik3ca* 遺伝子の安定発現株は腫瘍形成能を示さないが、*Pik3ca* 強制発現マウスは肝腫瘍(肝細胞腺腫)を形成した。*Pik3ca* 強

制発現マウスの肝腫瘍部では背景肝組織にくらべて複数の癌抑制遺伝子 (*Pten*, *Xpo4* and *Dlc1*) の発現が低下していたが、BNL-CL2 細胞では PI3K シグナルの活性化だけではこれらの遺伝子の発現は低下しなかった。*Pik3ca* 強制発現マウスの肝腫瘍部には背景肝組織と比較して脂肪酸が多く含まれており、特にオレイン酸に代表される不飽和脂肪酸の比率が増加していた。興味深いことに BNL-CL2 細胞における上記癌抑制遺伝子の発現はオレイン酸刺激により低下し、さらにオレイン酸刺激によりコロニー形成能が増加した。また、オレイン酸による癌抑制遺伝子の発現低下にはヒストン修飾を介している可能性を見出した。

このようにマウスの肝臓における PI3K シグナルの恒常活性化は単純性脂肪肝と肝腫瘍形成には十分であるが、肝臓における炎症を惹起するには不十分であることがわかった。またマウスの肝臓に蓄積したオレイン酸に腫瘍形成を促進する働きがあることが示された。これらの結果は代謝異常と脂肪肝を背景とする発癌とを結びつける手がかりになると考えられる。

*Pik3ca* 強制発現マウスは、炎症所見を認めず、肝腫瘍のうち発癌率は低率(10%)であるため、今後 *Pik3ca* 強制発現マウスに様々な” 2nd hit” 候補を付加することで、例えば酸化ストレス、間葉系細胞、免疫機構の変化と、単純性脂肪肝から NASH への進展あるいは発癌との関わりを検討することに有用なモデルになると考える。