

[過程-2]

審査の結果の要旨

氏名 工藤 洋太郎

本研究は代謝や悪性腫瘍において重要な役割を演じていると考えられるホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) シグナルの異常が肝脂肪化および肝腫瘍発生に及ぼす影響を明らかにするために、ヒト肝がんでも報告のある *Pik3ca*(N1068fs*4) 変異遺伝子をアルブミンプロモータを用いて肝細胞特異的に強制発現する遺伝子改変マウスの作成、解析を試みたものである。 *In vitro* の解析も加え、下記の結果を得ている。

1. 肝細胞特異的に *Pik3ca*(N1068fs*4) を強制発現させると、肝組織における PI3K/Akt 経路の活性化が immunoblot 法により示された。
2. 293T 細胞に一過性に発現させる系をもちいて、*Pik3ca*(wild type sequence, N1068fs*4, H1067R) の Akt リン酸化能を immunoblot 法により評価比較した。*Pik3ca*(N1068fs*4) 変異は hot spot mutant として知られる H1047R 変異にくらべてリン酸化能が弱く、wild type sequence と同等であった。
3. *Pik3ca* 強制発現マウスは肝重量の増加をしめした。肝組織中トリアシルグリセロール料の増加、血清 ALT 値の増加、そして病理組織学的所見から *Pik3ca* 強制発現マウスが脂肪肝を呈することを確認した。脂肪肝組織の脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR 法にて評価したところ、*Srebp1*、*Fas* の発現増加は見られず、*Pparg* とその標的である *aP2* 遺伝子の発現増加を認めたことから、*Pik3ca* (N1068fs*4) の強制発現における肝脂質蓄積は PPAR γ の活性化を介している可能性が強く示唆された。
4. *Pik3ca* 強制発現マウスはヒトの NASH でみられるような脂肪肝を背景とした炎症細胞浸潤や、肝線維化を認めないが、肝細胞腺腫を高率に形成した。腫瘍部では背景肝組織と比較して *Pten* を含む複数の癌抑制遺伝子の発現が低下しており腫瘍発生に寄与している可能性が考えられた。*In vitro* でマウス正常肝細胞株(BNL-CL2)に *Pten* shRNA 発現レンチウイルスをもちいてノックダウンすると軟寒天培地におけるコロニー形成能が増加を確認した。
5. マウス正常肝細胞株の *Pik3ca* (N1068fs*4) 安定発現株を複数樹立した。*Pik3ca*(N1068fs*4) の強制発現のみでは腫瘍形成能が得られないことを軟寒天培地におけるコロニー形成能アッセイで確認した。
6. ガスクロマトグラフィー法をもちいた組織含有全脂質構成脂肪酸の組成解析により腫瘍部は背景肝組織よりも脂肪酸の増加が著明であり、特にオレイン酸とパルミチン酸が多

いことがわかった。

9. マウス正常幹細胞株をもちいた実験では、オレイン酸は *Pten* を含む上記複数の癌抑制遺伝子の発現を低下させ、*in vitro* の腫瘍形成能を増加させた。

以上、本論文は *Pik3ca* 強制発現マウスが脂肪肝を背景に肝腫瘍を発生させることを見出し、*Pik3ca* 遺伝子強制発現による直接的な結果としてではなく、2 次的に生じた脂肪酸の組成変化を介した肝腫瘍形成の機序を明らかにした。

本研究は、世界的に増加している非アルコール性脂肪性肝疾患を背景とした肝発がんにおける代謝異常、脂肪肝と肝発がんとを結びつける機序解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。