

学位論文の要旨

| 学位の種類 | 博士 | 氏名 | 柳川 伸幸 |
|---|----|----|-------|
| 学位論文題目 | | | |
| 活性化型セリン/スレオニン型蛋白リン酸化酵素 AKT による胆管癌細胞の放射線感受性増強作用 —胆管癌の放射線感受性における AKT の役割— | | | |
| 北海道医学雑誌第 78 巻第 2 号 (平成 15 年 3 月) 掲載 | | | |
| 研究目的 | | | |
| <p>胆管癌の多くは治癒切除不能な進行癌となつてから発見されるため、平均生存期間は 7 カ月、5 年生存率は 0~10% ときわめて予後不良である。切除不能例では外照射や内照射による放射線治療が行われるが、胆管癌の大部分が放射線抵抗性の腺癌であり、進行例での効果は乏しい。胆管癌細胞の放射線抵抗性は <i>in vitro</i> でも明らかにされているが、その放射線抵抗性に関わるシグナル経路は不明である。一般に、放射線照射により誘導される細胞死に影響する因子として、癌抑制遺伝子 p53 を介する経路が詳細に検討されているが、胆管癌における p53 遺伝子異常の頻度は 15~30% 程度と高くないこと、さらに野生型 p53 を有する胆管癌細胞と変異型 p53 を有する細胞との間には放射線感受性に差が見られないことが <i>in vitro</i> の実験によって明らかにされ、胆管癌の放射線抵抗性には p53 を介さないシグナル経路が深く関わっていると推測されている。このような p53 非依存性の放射線抵抗性シグナルとして、AKT (別名、protein kinase B) が注目されている。AKT は、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 下流に位置するセリン/スレオニン型蛋白リン酸化酵素であり、PI3K によってリン酸化 (活性化) され、抗アポトーシス作用や蛋白合成の促進作用を発揮することで細胞生存を促進させる。近年、AKT が放射線感受性の制御においても重要な役割を担うことが非小細胞性肺癌や膵癌で推測されているが、胆管癌における発現の有無や役割は不明である。</p> <p>本研究では、胆管癌手術摘出標本の胆管癌細胞において免疫組織学的にリン酸化型 AKT (phospho-AKT) 発現が認められるかどうかを検討し、また、ヒト胆管癌由来細胞株を用いて、胆管癌の放射線感受性に及ぼす活性化型 AKT の役割および AKT シグナルを分子標的とした胆管癌の放射線感受性増強について明らかにするために検討を行った。</p> | | | |
| 材料・方法 | | | |
| 1. 免疫組織学的検討 | | | |
| <p>1995 年から 2000 年までに、旭川医科大学付属病院第三内科で診断後、外科切除された胆管癌 19 例の組織を用いて、正常胆管部と癌部のパラフィン切片を作成し、免疫組織学的に検討を行った。検体を使用するにあたり、学内の倫理委員会にて研究に関する承諾を得た後、患者本人または家族の同意を文書で得た。</p> <p>免疫染色はヒストファイン SAB-PO (R) キット (ニチレイ) を用いて、streptavidin-biotin peroxidase (SAB) 法で行った。1 次抗体としてパラフィン切片で使用可能なウサギ抗 phospho-AKT 抗体 (Ser473) (New England Biolabs) を 100 倍希釈で使用した。Phospho-AKT 染色は、腫瘍細胞が非腫瘍部胆管上皮より強く染色されるものを陽性とした。</p> | | | |
| 2. 胆管癌細胞株 | | | |
| <p>ヒト肝内胆管癌細胞株 HuCC-T1 とヒト肝外胆管癌細胞株 TFK-1 を東北大学加齢医学研究所より供与を受け、研究に使用した。HuCC-T1 および TFK-1 細胞株は変異型 p53 を有することが報告されている。</p> | | | |
| 3. コロニー形成能試験 | | | |
| <p>100 mm dish に各細胞 2,000 個を培養した後、PI3K 選択的阻害剤 LY294002 (Sigma) を添加した。2 時間後、GammaCell 40 (¹³²Cs、線量率 0.93 Gy/min) を用いて γ 線照射し、照射 2 時間後に PBS で洗浄し、新</p> | | | |

しい培養液と交換した。γ線照射後 14 日目に dish 上のコロニーをクリスタルバイオレットおよびエオジンにて染色し、細胞数が 50 個以上のコロニーを 1 コロニーとして、dish 中のコロニー数を計測した。

4. 発現ベクター作成と遺伝子導入

J. Testa 博士 (フォックスチェイス癌センター、USA) より供与されたミスチル基を N 末端に融合した活性化型 AKT cDNA (constitutively active 型 AKT) および 179 番目のリジン残基をメチオニン残基に変異させた不活性化型 AKT cDNA (dominant negative 型 AKT) を、pcDNA3 ベクター (Invitrogen) に組み込み発現ベクターとして使用した。さらに、pEGFP 発現ベクター (Clontech) を用いて、enhanced green fluorescence protein (GFP) と融合させた発現ベクターを構築した。Gene PORTER2 (Gene Therapy System) を用いて、胆管癌細胞株に遺伝子導入を行った。

5. Western blot 法

細胞を洗浄後、lysis buffer で溶解し細胞を回収した。遠心後、上清の蛋白濃度を測定し、サンプルバッファと混和し、5 分間煮沸を行った。10% ポリアクリルアミドを用いた SDS-PAGE で電気泳動後、Hybond-C Extra メンブレン (Amersham) に転写した。ブロッキング操作を行った後、1 次抗体にはウサギ抗 AKT または phospho-AKT (Ser473) 抗体 (New England Biolabs) を 1,000 倍希釈、ウサギ抗 p53 抗体 (Santa Cruz) を 2,000 倍希釈にして使用した。2 次抗体は抗 HRP-linked Rabbit-IgG (H&L) 抗体 (New England Biolabs) を 3,000 倍希釈で反応させた後、ECL detection kit (Amersham) でシグナルの検出を行った。

6. 放射線誘発アポトーシスの検出

Chamber slide glass (Lab-Tek) を使用して両細胞を培養後、遺伝子導入細胞と非導入細胞を識別するため、GFP 融合 constitutively active 型 AKT 発現ベクターおよび GFP 発現ベクターを遺伝子導入し、24 時間後線量 5 Gy の γ 線照射を行った。照射後 24 時間培養後、洗浄し、3.5% paraformaldehyde で細胞を固定した。さらに、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 mg/ml) (Sigma) を滴下して封入した。蛍光顕微鏡下で GFP 発現細胞を観察し、DAPI 染色で核の凝集および分断化が認められる細胞をアポトーシスと判断した。GFP 発現細胞 100 個に占めるアポトーシス細胞を計測し、放射線誘発アポトーシスの割合を検討した。

7. 統計学的分析

コロニー形成能試験は同様の試験を 3 回施行した後 repeated measure ANOVA を、放射線誘発アポトーシスの検出には one-way ANOVA を用いて検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判断した。

成績

1. 胆管癌組織における phospho-AKT 発現

非癌部胆管上皮に比べ癌部において、腫瘍細胞の核に局在する phospho-AKT の強い発現を認めた。細胞質には弱い発現を認めたが、細胞膜には認めなかった。陰性コントロールでは、腫瘍細胞に陽性像を認めなかった。非癌部胆管上皮より強く染色されるものを陽性として検討したところ、切除胆管癌 19 例中 16 例 (84.2%) に phospho-AKT の発現を認めた。

2. 胆管癌細胞株の放射線感受性

HuCC-T1 および TFK-1 細胞の放射線感受性の差異を見るため、0 から 5 Gy までの γ 線を照射し、コロニー形成能試験にて細胞生存率を検討したところ、両細胞株に有意差を認めなかった。

3. 放射線照射胆管癌細胞における phospho-AKT と p53 蛋白の発現

血清飢餓 48 時間後 γ 線を照射し、Western blot 法により検討した。両細胞とも血清飢餓後 phospho-AKT 発現の低下を認め、γ 線照射によって線量依存性に phospho-AKT 発現の増加を認めた。次に、 $30 \mu\text{M}$ の PI3K 選択的阻害剤 LY294002 を添加することにより、γ 線照射により誘発された phospho-AKT 増加は両細胞においてほぼ完全に抑制された。一方、HuCC-T1 細胞では γ 線照射によって p53 蛋白発現量の変化を認めず、TFK-1 細胞では p53 蛋白発現を認めなかった。

4. LY294002 処理胆管癌細胞の放射線感受性

異なる濃度の LY294002 を添加後、γ 線を照射してコロニー形成能試験を行った。非照射細胞では、LY294002 によるコロニー形成能の低下を認めなかった。3 Gy 照射細胞では LY294002 の濃度に依存してコロニー形成能の低下を認めた。次に 0 および $50 \mu\text{M}$ の LY294002 存在下に異なる線量の γ 線を照射したところ、 $50 \mu\text{M}$ の LY294002 存在下では両細胞ともに $0 \mu\text{M}$ に比べてコロニー形成能の有意な低下を認めた。

5. Dominant negative および constitutively active 型 AKT 導入細胞における放射線照射後細胞生存率

Dominant negative 型 AKT 発現ベクターを遺伝子導入後に γ 線を照射した両細胞のコロニー形成能試験では、空ベクター導入細胞に比べてコロニー形成能の低下を認めた。一方、constitutively active 型 AKT 発現ベクターを導入した細胞では、空ベクターと比較してコロニー形成能の増加を認めた。

6. Constitutively active 型 AKT 導入細胞における放射線誘発アポトーシス

両細胞における DAPI 染色の結果、GFP 融合 constitutively active 型 AKT 発現ベクター導入細胞では GFP ベクター導入細胞に比べて放射線誘発アポトーシスが有意に抑制された。

考 按

本研究では、切除胆管癌 19 例中 16 例 (84.2%) に phospho-AKT 過剰発現を主に腫瘍細胞の核に認めた。Phospho-AKT の細胞内局在について、卵巣癌組織を用いた免疫組織学的検討では、本研究と同様に、主に腫瘍細胞の核に認めたとの報告がある。AKT は活性化されると細胞質から細胞膜近傍に移行するが、癌遺伝子産物 Tcl1 発現細胞や S 期細胞、増殖刺激を受けた細胞では核内に移行し、核内の転写因子を介して細胞増殖作用や抗アポトーシス作用を発揮することが近年明らかにされており、今回の切除標本において認められた核内という免疫組織学的局在が、胆管癌でも同様な意義を有するのか今後さらに検討が必要である。

一般に、放射線感受性を規定する因子として、これまで p53 依存性経路の重要性が報告されてきたが、近年、p53 非依存性のシグナルとして AKT が注目されている。本研究では、p53 変異によって転写活性化能を喪失した胆管癌細胞株 TFK-1 および HuCC-T1 を使用し、 γ 線照射後に p53 蛋白の蓄積が起らないことを確認した上で、放射線感受性に及ぼす AKT の役割を検討した。両細胞ではいずれも γ 線照射後 phospho-AKT 発現量が線量依存性に増加すること、 γ 線照射によって誘導される phospho-AKT 増加は LY294002 添加で抑制されることから、 γ 線照射後の phospho-AKT 増加は PI3K を介して誘導されると考えられた。さらに、PI3K 阻害による phospho-AKT 低下が放射線感受性に及ぼす影響を検討したところ、LY294002 処理した細胞ではいずれも γ 線照射後にコロニー形成能の低下を示したことから、両胆管癌細胞の放射線感受性には PI3K-AKT シグナルが重要な役割を果たしていると考えられた。

次に、活性化型 AKT が放射線抵抗性に及ぼす直接的な役割を明らかにするため、dominant negative 型または constitutively active 型 AKT 発現ベクターを胆管癌細胞に遺伝子導入し検討した。その結果、dominant negative 型 AKT 導入細胞は、ベクター導入細胞に比べて γ 線照射後にコロニー形成能の低下を示したのに対して、constitutively active 型 AKT を導入した細胞ではコロニー形成能の増加が認められた。このことから、AKT が胆管癌細胞の放射線抵抗性に関与する直接の分子であり、AKT 活性レベルの操作によって両胆管癌細胞では放射線感受性の制御が可能であることが示された。

放射線感受性には分裂死と間期死の両者が影響するため、コロニー形成能試験に加えて、放射線誘発アポトーシスの検討を行った。その結果、constitutively active 型 AKT 導入細胞では γ 線照射で誘発されるアポトーシスの抑制が認められた。活性化型 AKT は cytochrome c 放出の抑制や caspase-9 の不活化を介してアポトーシスを抑制することが報告されており、活性化型 AKT は分裂死に加えてアポトーシスによる間期死の抑制も介して、両細胞の放射線抵抗性に作用していると考えられた。

以上、本研究では、胆管癌における活性化型 AKT の発現と放射線抵抗性に関する機構を検討し、胆管癌の放射線抵抗性には AKT シグナルを介した伝達機構が深く関与していることから、活性化型 AKT が放射線感受性増強の分子標的として有用であると考えられた。

結 論

活性化型 AKT は胆管癌で高率に発現し、放射線に対して抵抗性に作用すること、放射線誘発アポトーシスを抑制すること、AKT 活性レベルの操作によって放射線感受性を制御可能であることから、胆管癌の放射線感受性増強の分子標的として有用と考えられた。本研究結果は、切除不能胆管癌に対する放射線療法の効果を最大限に発揮することに貢献するものと考えられた。




引用文献

- 1) Price BD and Youmell MB (1996): The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin sensitizes murine fibroblasts and human tumor cells to radiation and blocks induction of p53 following DNA damage. *Cancer Res* **56**: 246-250.
- 2) Ng SSW, Tsao MS, Chow S, Hedley DW (2000): Inhibition of phosphatidylinositide 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* **60**: 5451-5455.
- 3) Brognard J, Clark AS, Ni Y, Dennis PA (2001): Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res* **61**: 3986-3997.

参考論文

- 1) Mizukami Y, Ura H, Obara T, Habiro A, Izawa T, Osanai M, Yanagawa N, Tanno S, Kohgo Y (2001): Requirement of c-jun N-terminal kinase for apoptotic cell death induced by farnesyltransferase inhibitor, farnesylamine, in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **288**: 198-204.
- 2) Izawa T, Obara T, Tanno S, Mizukami Y, Yanagawa N, Kohgo Y (2001): Clonality and field cancerization in intraductal papillary-mucinous tumor of the pancreas. *Cancer* **92**: 1807-1817.

学位論文の審査結果の要旨

| | | | |
|---|---------|-----|-------|
| 報告番号 | 第 号 | | |
| 学位の種類 | 博士 (医学) | 氏 名 | 柳川 伸幸 |
| <p>審査委員長 <u>高後 裕</u> </p> <p>審査委員 <u>柳川 伸幸</u> </p> <p>審査委員 <u>油野 民雄</u> </p> | | | |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> | | | |
| <p>活性型セリン/スレオニン型蛋白リン酸化酵素 AKT による胆管癌細胞の放射線感受性増強作用—胆管癌の放射線感受性における AKT の役割</p> | | | |
| <p>胆管癌の多くは切除不能な進行癌となって発見されるため、きわめて予後不良で、放射線照射の適応となるが、大部分は放射線抵抗性である。一般に癌細胞の放射線抵抗性は癌抑制遺伝子である p53 遺伝子異常を介して生ずることが多いが、胆管癌の場合には、p53 遺伝子異常の頻度は低く、p53 を介さないシグナル伝達系が放射線抵抗性にかかわっていると推測される。AKT は PI3K の下流に位置するセリン/スレオニン型蛋白リン酸化酵素で、PI3K によりリン酸化 (活性化) され、抗アポトーシス作用、細胞増殖促進作用を発揮することから、放射線感受性においても重要な役割を担うことが推測されるが、胆管癌における発現の有無や役割は不明である。本研究では、胆管癌手術摘出標本の胆管癌細胞において免疫組織学的にリン酸化 AKT 発現がみられるか否か、また、ヒト胆管癌細胞株を用いて、胆管癌の放射線感受性におよぼすリン酸化 AKT の役割および AKT シグナルを分子標的とした胆管癌の放射線感受性増強作用について検討したもので、以下の結果を得た。</p> <p>① 旭川医科大学附属病院で診断・外科切除された胆管癌 19 例の組織を用い、正常胆管部と癌部のリン酸化 AKT の発現を免疫組織学的に検討したところ、19 例中 16 例 (84.2%) が陽性であった。</p> | | | |

- ② ヒト胆管癌由来細胞株で変異 p53 を有する HuCC-T1 と TFK-1 の 2 細胞に、 γ 線を照射すると、線量依存性に活性化 AKT 発現の増加を認めたが、p53 の発現には変化はなかった。
- ③ PI3K の選択的阻害剤を添加すると、両細胞の γ 線で誘発されたリン酸化 AKT の発現は抑制された。
- ④ Dominant negative AKT 発現ベクターを遺伝子導入後に γ 線を照射すると、両細胞のコロニー形成能は低下した。一方 constitutively active AKT 型 AKT 発現ベクターを遺伝子導入した細胞では、コロニー形成能の増加を認めた。
- ⑤ Constitutively active AKT 導入細胞では、放射線誘発アポトーシスは有意に抑制された。

本研究は、リン酸化された活性型 AKT が胆管癌で高率に発現し、放射線に対する抵抗性に関与し、放射線誘発アポトーシスを抑制すること、AKT 活性レベルの操作によって放射線感受性を制御可能であることを示した最初の報告である。得られた成績は AKT が胆管癌の放射線感受性増強の分子標的として有用であることを示し、今後、切除不能胆管癌にたいする放射線療法の効果を最大限に発揮することに貢献するものと考えられる。また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。