

論文名：P21-activated kinase-2 is a critical mediator of transforming growth factor- β -induced hepatoma cell migration.

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名：佐藤 宗広

【背景】

肝がんは、肝内転移の頻度が極めて高く、予後不良な悪性腫瘍である。肝がんの大半の症例が肝硬変を併発しており、肝硬変において様々なサイトカイン・増殖因子が産生されている。このため、これらの因子が肝がんの転移様式に影響している可能性は否定できない。なかでも Transforming growth factor- β (TGF- β) は肝硬変で過剰発現する代表的な増殖因子であり、転写因子 smad2/4 やセリンスレオニンキナーゼ Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)、Akt (protein kinase B) など多彩なシグナル経路を活性化して組織の線維化や転移を促進することが知られている。しかし、これらのシグナル経路は各細胞で活性化レベルが異なるため、肝がんでも最も重要なシグナル経路は不明瞭である。そこで TGF- β シグナルの詳細な解析を通して、肝がんの転移機構を明らかにすれば、肝がん患者の予後改善に役立つことが期待される。申請者らは、肝がん転移機構に関わる TGF- β の下流シグナル経路を探索し、その機能を解析し臨床的意義を検討することにした。

【目的】

本研究の目的は、①肝がんの転移に関与する TGF- β シグナルの主要経路を探索し、②その標的因子の作用機序を解析し、③がん患者における臨床的意義を検討することである。この目的を達成するために、申請者らは、様々なシグナル阻害剤存在下の肝がん細胞株を TGF- β で刺激して、Akt が肝がんの転移に深く関与していることを見いだした。そこで本研究では Akt の代表的な標的因子である p21-activated kinase (PAK2) に焦点を絞り、その調節機構を解析し、PAK2 の臨床的意義を検討することにした。

【方法】

(1) 肝がん細胞株の遊走能調節因子の探索 (予備検討)：肝がん細胞株 HepG2, PLC/PRF/5, HLF を、様々なシグナル阻害剤存在下で TGF- β 刺激して、遊走能を比較した。

(2) Akt/PAK2 調節機構の解析：上述の予備検討の結果、Akt が肝がん細胞の遊走に強く関与していることが明らかになったため、HepG2 細胞を蛍光染色・Western Blot 解析して、TGF- β /Akt シグナルおよびその代表的な標的因子 PAK2 の活性化機構を解析した。

(3) PAK2 を介した細胞遊走能の観察：PAK2 遺伝子ノックダウン (small interfering RNA: siRNA 導入) HepG2 細胞を TGF- β 刺激して、vinculin 染色による細胞接着斑の観察を行い、細胞遊走・培養細胞創傷治癒アッセイを用いて、がん細胞の遊走能を計測した。

(4) PAK2 の臨床病理学的解析：肝がん症例 (62 例) における PAK2 セリン 20 残基におけるリン酸化 (活性化) レベルを Western Blot・免疫組織学的解析して、臨床因子との相関を解析した。

【結果】

(1) TGF- β /Akt シグナルは肝がんの遊走を促進する：3種類全ての細胞株において、Akt 阻害剤が、TGF- β 刺激による遊走能を最も強く抑制した。

(2) TGF- β は酸化ストレスを介して Akt/PAK2 を活性化する：Western Blotting の結果から、TGF- β は PAK2 を 4.5-8 倍にリン酸化（活性化）する一方で、その作用が Akt 阻害剤・抗酸化剤で著明に阻害されることが明らかになった。

(3) TGF- β /PAK2 経路は肝がん細胞遊走能を促進する：TGF- β 刺激下の HepG2 細胞は、細胞膜が突出して接着班が増加し、遊走能が約 3 倍に増強した。一方、PAK2 siRNA 導入細胞では TGF- β 刺激による接着班・遊走能の有意な増強は認められなかった ($p < 0.05$)。

(4) PAK2 の臨床病理学的解析：免疫組織染色の結果、肝がん症例 62 例中 26 例 (42%) がリン酸化（活性型）PAK2 を高発現しており、これら症例は、肝内転移 ($P = 0.005$)、静脈浸潤 ($P < 0.001$)、Edmondson-Steiner 分類腫瘍進展度 ($p = 0.023$) が有意に進行していた。無再発期間 (log-rank, 2.584, $p = 0.009$)、生存率 (log-rank, 2.634, $p = 0.008$) も有意な増悪が認められた。

【考察】

通常、がん細胞転移能を獲得する過程で、細胞骨格を再編成し細胞突起を伸長する。そして細胞底面の接着班が増加して、細胞遊走を開始する。PAK2 は、セリンスレオニンキナーゼ PAK (p21-activated kinase) ファミリーの構成因子であり、細胞骨格関連因子の制御を介してがん細胞の細胞運動・接着を調節する働きをもつことが知られている。近年、PAK2 が間葉系細胞で TGF- β /Akt シグナルの標的因子であることが明らかにされたが、興味深い事に、上皮系細胞や上皮がんでは PAK2 の活性化は認められないと報告されている。本研究において申請者らは、TGF- β /Akt/PAK2 経路が肝がんの遊走に深く関与していることを発見した。そもそも肝臓は間葉・内胚葉由来の器官なので、肝がんが間葉系細胞に類似した転移機構をもつ可能性は十分にありえる。肝がんが他の上皮がんとは異なる機構で転移するメカニズムを報告した研究はこれまでないため、PAK2 調節機構をさらに詳細に解析すれば、肝がん特有の転移様式の手がかりを得られる可能性が期待される。また本研究では、活性型 PAK2 の発現レベルが肝がんの臨床病理学的進行度と有意に相関し、予後とも相関することを見いだした。したがって、PAK2 は肝がん転移の重要な調節因子であるのみならず、臨床上でも有用な予後予測マーカーになりうるかもしれない。