

Abstract of Doctoral Thesis

Name ALFARISA NURURROZI

Title: Investigation of PI3K/AKT signaling pathway in canine soft tissue sarcoma

(犬の軟部組織肉腫における PI3K/AKT シグナル伝達経路の検討)

Abstract of thesis:

Soft tissue sarcoma (STS) is one of the most common cancers in dogs. Canine STS encompasses a heterogeneous group of mesenchymal neoplasia, accounting for approximately 8–15% of all canine cancers. These tumors can originate from various soft tissues, resulting in diverse histological subtypes that exhibit distinct biological behaviors and therapeutic responses. The primary challenge in canine STS is the lack of reliable prognostic markers and an incomplete understanding of its pathogenesis. This research investigates the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT) signaling pathways, as their analysis may provide insights into disease activity and potential prognostic markers. PI3K/AKT is one of the signaling pathways contributing to cell proliferation and is a crucial regulator of various critical cellular processes such as growth, survival, and metabolism. Dysregulation of the PI3K/AKT pathway due to genetic mutations or alterations in its components has contributed to tumorigenesis. Our previous investigation identified the PI3K/AKT pathway activation in STS cell lines and clinical samples. We confirmed that phosphorylation of AKT occurred in conjunction with S6 phosphorylation in three canine STS cell lines (MUMA-G, A72, and STS-YU1) based on western blotting, as compared with a mouse fibroblast cell line (NIH3T3).

The first chapter investigated the relationship between PI3K/AKT activation and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), as the dysregulation of this pathway may influence TILs density within the tumor microenvironment (TME). 59 STS samples were labeled via immunohistochemistry to calculate the density of TILs, including CD3+ T cells, CD8+ T cells, CD20+ B cells, and FOXP3+ regulatory T cells. Most canine STS samples (81.3%) contained intra-tumoral TILs, with CD3+ T cells and CD8+ T cells being the most abundant, while CD20+ B cells and FOXP3+ T-regulatory cells were comparatively limited. This TILs profile indicates that the immune response in dogs remains favorable against STS, as CD3+ and CD8+ T cells subsets are critical for cytotoxic responses against cancer. TILs density, however, was not associated with clinicopathological parameters and tumor grade.

Furthermore, a positive correlation between TILs density and the Ki-67 index, a tumor proliferation marker. Samples with a high Ki-67 index had a significantly higher abundance of CD3+ T cells, CD8+ T cells, and CD20+ B cells ($p=0.0392$, 0.0254 , 0.0380 , respectively). This finding provides initial insights into the role of PI3K/AKT pathway activation in canine STS. The abundance of CD8+ T cells was positively correlated with the activation of PI3K/AKT, indicating that samples with high levels of phospho-AKT and phospho-S6 tend to have higher CD8+ T cell densities ($p=0.0032$ and 0.0218 , respectively). These findings suggest that the PI3K/AKT signaling pathway might play a role in modulating the immune landscape. A

(About 800 words in English)

plausible mechanism is that elevated PI3K/AKT pathway activity in cancer cells indirectly enhances tumor-antigen presentation or promotes the secretion of chemokine molecules to attract immune cells to the tumor site.

The second chapter investigated the underlying mechanism as a primary contributor to PI3K/AKT dysregulation, possibly contributing to tumorigenesis in canine STS. This chapter investigated PTEN loss, *PIK3CA* mutation, and EGFR over-expression as potential PI3K/AKT pathway activation drivers. The investigation suggests that EGFR over-expression, rather than PTEN loss and *PIK3CA* mutations, is likely a primary driver of pathway dysregulation. While PTEN loss is one of the common mechanisms for PI3K/AKT dysregulation, there is no evidence of PTEN loss in canine STS samples. PTEN was expressed in all analyzed samples. Weak PTEN expression was observed in 33.3% of samples, while 66.7% showed normal expression.

Although mutations in *PIK3CA* and *EGFR* genes were detected, their low prevalence suggests they are not the primary cause of pathway dysregulation. DNA sequencing of the *PIK3CA* gene revealed a missense point mutation in exon 10 (c.554 A>C, H554P) in only one case, but no hotspot mutations were identified. Similarly, one missense point mutation in exon 21 of *EGFR* (c.868 G>A) was identified in one sample. High EGFR expression was significantly correlated with elevated phospho-AKT levels ($p<0.0001$) based on a linear regression test. EGFR was expressed in 83.3% of STS samples; in most cases (90% of EGFR-positive samples), it also showed positive immunolabeling for phospho-AKT. This result indicates that EGFR over-expression is a potential major contributor to the PI3K/AKT pathway dysregulation. When EGFR is over-expressed, it facilitates consecutive activation of the downstream PI3K/AKT signaling pathway, results in cellular changes, and disrupts normal cell regulation.

In conclusion, this study identifies EGFR overexpression as a significant feature and potential contributor to the activation of the PI3K/AKT pathway in canine STS. This finding highlights promising opportunities for the development of targeted therapies in the future. Targeting this receptor using EGFR inhibitors has been explored in human cancer therapy, and similar strategies could be repurposed for dogs. These findings underscore the need for additional research to better understand the molecular mechanisms in canine STS and validate potential therapeutic targets.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Alfarisa Nururrozi
審 査 委 員	主 査：山口大学 教 授 水 野 拓 也
	副 査：山口大学 教 授 谷 健 二
	副 査：山口大学 教 授 森 本 将 弘
	副 査：鹿児島大学 教 授 遠 藤 泰 之
	副 査：山口大学 准教授 馬 場 健 司
題 目	Investigation of PI3K/AKT signaling pathway in canine soft tissue sarcoma (犬の軟部組織肉腫における PI3K/AKT シグナル伝達経路の検討)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>軟部組織肉腫（STS）は犬で発生頻度の高い悪性腫瘍の一つである。犬の STS は間葉系由来の様々な腫瘍を包含しており、犬の悪性腫瘍全体の約 8～15%を占める。これらの腫瘍は様々な軟部組織から発生する可能性があり、その結果異なる生物学的挙動と治療反応を示す多様な組織学的サブタイプが存在する。犬の STS に対しては、外科手術が主な治療法であるが、腫瘍の浸潤性により完全切除が難しい場合や、局所再発や遠隔転移が問題となることがあり、新たな治療法の開発が必要である。また犬の STS においては、信頼できる予後マーカーがないことも問題である。ホスファチジルイノシトール-3 キナーゼ（PI3K）およびプロテインキナーゼ B（PKB、AKT）シグナル伝達経路は細胞増殖に寄与するシグナル伝達経路の一つであり、増殖、生存、代謝など様々な重要な細胞プロセスの重要な制御因子である。PI3K/AKT 経路の遺伝子変異や構成因子の変化による調節異常は、がん化に寄与している。われわれの以前の研究において、犬の STS の臨床サンプルにおいて AKT の活性化が高率に生じていることを同定した。このことから、本研究では、犬の STS と PI3K/AKT シグナル伝達経路の関係についてより詳細に調査することを目的とした。</p> <p>第 1 章では、腫瘍の治療反応性や予後と関連する可能性が考えられる腫瘍微小環境に着目し、PI3K/AKT 経路の活性化と腫瘍浸潤リンパ球（TILs）との関係を調査した。CD3+T 細胞、CD8+T 細胞、CD20+B 細胞、Foxp3+制御性 T 細胞を含む TIL の密度を算出するために、合計 59 の STS サンプルについて免疫組織化学染色を行った。その結果、多くの STS 症例（81.3%）において、腫瘍内に TILs が認められ、とくに CD3+T 細胞と CD8+T 細胞が多く、CD20+ B 細胞と Foxp3+制御性 T 細胞の数は比較的限られていた。多変量解析の結果、CD3+T 細胞と CD8+T 細胞、CD3+T 細胞と CD20+B 細胞、CD8+T 細胞と CD20+B 細胞の密度の間に高い相関が認められた。しかしなが</p>	

ら、TILs の数は、臨床病理学的パラメータや腫瘍の悪性度とは関連していなかった。一方、CD3+T 細胞数、CD8+T 細胞数、CD20+B 細胞数は AKT の活性化と有意に正の相関を示した。また、CD8+ T 細胞数は、リン酸化 AKT の下流分子であるリン酸化 S6 のレベルとも有意に正の相関を示した。さらに、CD3+T 細胞数、CD8+T 細胞数、CD20+B 細胞数は、増殖マーカーである Ki-67 指数とも相関していた。本研究より、腫瘍細胞における AKT 経路の活性化と腫瘍に浸潤する CD3+T 細胞数、CD8+T 細胞数、CD20+B 細胞数に関連があることが示唆された。これらの結果から、PI3K/AKT シグナル伝達経路は腫瘍微小環境の調節に関連している可能性が示唆された。

第 2 章では、犬の STS における AKT 活性化の異常に寄与する可能性のある因子について検討を行った。本研究では、PI3K/AKT 経路活性化の潜在的な促進因子として、PTEN 欠損、PIK3CA 突然変異、EGFR 過剰発現を検討した。PTEN の欠損は PI3K/AKT 異常の一般的なメカニズムの一つであるが、本研究で用いたサンプルすべてにおいて免疫染色によって PTEN の発現が認められ、PTEN 欠損の証拠は見つからなかった。しかし、PTEN の発現が弱い症例 (33.3%) の方が、発現が正常な症例 (66.7%) よりも、リン酸化 AKT の発現が強いことがわかった。次に AKT 経路を正に制御する PI3K のホットスポット変異 (犬 E545K および H1047R) を検討するために、腫瘍組織より抽出した DNA を用いて、PCR およびサンガーシーケンス法によって検討を行った。その結果、用いた症例においてホットスポットの遺伝子変異は認められなかった。最後に PI3K/AKT 経路の上流に存在する EGFR の発現について免疫染色によって検討を行った。その結果、83.3%の症例において EGFR 発現が確認され、また 44%において中等度から高レベルの EGFR の発現が確認された。また線形回帰検定に基づくと、EGFR の発現レベルは、リン酸化 AKT の発現上昇と有意に相関していた。この結果は、EGFR の過剰発現が PI3K/AKT 経路の調節異常の主要な原因である可能性を示唆している。

以上の研究結果から、イヌの STS において EGFR 過剰発現が重要な特徴であり、PI3K/AKT 経路の活性化に寄与する可能性があることを明らかにした。とくに、CD3+ T 細胞、CD8+ T 細胞、CD20+B 細胞数と PI3K/AKT 経路の活性化との相関は、腫瘍微小環境における免疫応答とがんシグナリングの関連を示唆する重要な発見である。また、EGFR を含む様々な因子が PI3K/AKT 経路の異常調節に寄与している可能性が示された。これらの知見は、犬の STS の病因理解を深め、新たな治療標的や予後マーカーの開発につながる可能性をもたらす。今後の研究では、これらの知見をさらに検証し、臨床応用への道筋を探ることが期待される。以上により、審査員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位を与えるに十分な内容を有するものと判断した。