

審査の結果の要旨

氏名 早田 有希

本研究は胆道系における幹細胞ニッチおよび発癌起源の解析を試みたものである。

最近の胆道系の幹細胞に関する研究で注目されている胆管周囲に存在する小さい腺組織である胆管周囲付属腺と、他の消化管の幹細胞ニッチ形成に重要とされる Wnt/ β -catenin シグナル経路に着目して下記の結果を得ている。

1. まず、マウスの総胆管および十二指腸乳頭部における胆管付属腺の分布を検討した。

胆管付属腺は肝門部から下部胆管においては総胆管周囲に散在性に認められたが、十二指腸乳頭部近傍ではより密に存在することがわかった。次に、Wnt/ β -catenin シグナル経路の胆管における活性化状態を同経路の標的遺伝子である Axin2 に着目して解析した。Axin2 陽性細胞を特異的に遺伝子改変誘導できる Axin2-Tomato マウスを作成し、総胆管及び乳頭部における Axin2 の発現パターンを検討すると、乳頭部の胆管付属腺の特に底部で Wnt/ β -catenin 経路が活性化しており、Axin2 はマウス乳頭部胆管付属腺を特異的に標識できる細胞マーカーであることが分かった。よってこれより先の実験は、特に乳頭部の胆管付属腺に焦点を絞って解析を行った。

2. 各種抗体での染色の結果から、乳頭部の胆管付属腺に存在する Axin2 陽性細胞は、幹細胞系マーカー、細胞増殖マーカーの陽性頻度が Axin2 陰性細胞と比較して高率であり、乳頭部の Axin2 陽性胆管付属腺細胞は胆管幹細胞として機能している可能性が示唆された。実際に Axin2 陽性細胞が胆管上皮幹細胞として機能しているかを検討するため、Axin2-Tomato マウスを用いて乳頭部の細胞系譜解析を行ったところ、胆管付属腺底部に存在していた Axin2 陽性の胆管幹細胞が成熟胆管上皮細胞に分化することによって、胆管表層に新たな上皮細胞を供給していく様子が観察された。すなわち同細胞は乳頭部胆管上皮の幹細胞を含む細胞集団であることを証明した。

3. Axin2 は Wnt/ β -catenin 経路の応答遺伝子である。乳頭部胆管付属腺特異的に Wnt/ β -catenin 経路を活性化させているニッチファクターを ISH で解析した。Wnt シグナル伝達のエンハンサーとして作用する R-spondin3 が胆管付属腺底部の周囲に存在する間質細胞に局限して強く発現していることがわかった。これを H&E 染色像と対比させると、乳頭部胆管を包み込むようにして存在している Oddi 括約筋に一致しているように思われた。すなわち乳頭部胆管付属腺周囲に存在する Oddi 括約筋細胞および筋線維芽細胞が分泌する R-spondin3 によって、同部位特異的な Wnt/ β -catenin 経路活性化ニッチが形成されている可能性が示唆された。

4.最近のヒト乳頭部癌の網羅的解析の結果に基づき、ヒト乳頭部癌で遺伝子変異が比較的高頻度に認められることが報告されている PI3K シグナル経路を抑制的に制御している *PTEN* に着目し、*Axin2* 陽性胆管付属腺細胞特異的に *PTEN* をノックアウトするマウスを作成し(*Axin2-PTEN^{ΔΔ}*)、乳頭部癌の発癌起源となりうるか検討した。*Axin2-PTEN^{ΔΔ}* マウスは全例で乳頭部癌の発癌を認めたが、同時に乳頭部において *Axin2* とは相補的な発現パターンを示す *CK19* 陽性胆管表層上皮細胞特異的に *PTEN* をノックアウトするマウスでは乳頭部腫瘍の形成は一例も認めなかった。このことから乳頭部の *Axin2* 陽性胆管付属腺細胞は、組織幹細胞であると同時に、乳頭部癌の癌起源細胞となり得ることが明らかとなった。

5.*Axin2-PTEN^{ΔΔ}* マウスにおける十二指腸乳頭部癌においても β -catenin の核内移行が広範囲に認められ、腫瘍細胞でも Wnt/ β -catenin シグナル経路が活性化していることが示唆されたため、乳頭部癌からオルガノイドを作成し、培養液から R-spondin を除去してたところ、乳頭部癌オルガノイドがほとんど形成されなかった。この結果から、R-spondin を介した Wnt シグナルの増強が、乳頭部癌形成にきわめて重要な役割を果たすことがわかった。これを受けて、Wnt シグナル経路活性化を抑制する作用を持つ LGK974 を用いて、発癌抑制効果を検討することとした。*Axin2-PTEN^{ΔΔ}* マウスに LGK974 を連日投与することで著明に乳頭部腫瘍径が縮小した。Wnt 経路を標的とした分子標的療法の有効性は、ヒト大腸癌への臨床応用を目指して現在は臨床試験も行われているが、十二指腸乳頭部癌もそのターゲットの候補となると期待される。

以上、本論文はマウスの十二指腸乳頭部胆管付属腺特異的な細胞マーカーとして *Axin2* を同定し、細胞系譜解析を行うことによって直接的に胆管付属腺が幹細胞ニッチ、癌起源として機能していることを証明し、かつ十二指腸乳頭部癌マウスモデルを樹立することができた。さらに同マウスモデルを用いて、Wnt 活性化ニッチを標的とした十二指腸乳頭部癌に対する新たな治療戦略を提案した。本研究から得られた結果は、胆管再生機構解明および難治癌である十二指腸乳頭部癌の機序解明の一助となると期待される。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。