

[課程－２]

審査の結果の要旨

氏名 加藤 裕之

本研究は膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)由来浸潤癌と通常型膵癌の差異を検討するため、臨床検体より IPMN 関連病変、通常型膵癌、正常膵管のオルガノイドモデルを構築し、生物学的差異と分子生物学的差異、特にエピゲノム制御の差の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. IPMN 由来浸潤癌由来のオルガノイドは、管腔構造が保たれたオルガノイドを形成し、通常型膵癌のオルガノイドと比して成長が緩徐な傾向にあり、CD133 陽性細胞の割合が有意に少なかった。浸潤癌由来のオルガノイドであればマウス皮下への高い腫瘍生着能を有していた。Gemcitabine への感受性には一定の傾向はなかった。
2. Whole exome sequence を用いて遺伝子変異を解析すると、前癌病変の IPMN と浸潤癌の間には遺伝子変異の蓄積やコピー数変化に顕著な差が見られる一方、IPMN 由来浸潤癌と通常型膵癌の間には遺伝子変異に決定的な差は見られず、いずれの癌においても *KRAS* 変異に加えて、*TP53*, *CDKN2A*, *SMAD4* の genomic な機能喪失が癌化に重要であることがわかった。ニッチ依存度を評価すると、このことを支持するように前癌病変の IPMN と浸潤癌では変異に応じたシグナルのニッチ非依存能獲得が見られたものの、IPMN 由来浸潤癌と通常型膵癌では明らかな差は指摘できなかった。
3. RNA sequence によるトランスクリプトームから層別化を試みると、unsupervised clustering では IPMN 由来浸潤癌同士は互いに似たような遺伝子発現型であるものの、通常型膵癌との明確な差を示すことができなかった。そこで、IPMN 由来浸潤癌に発現が有意である 218 の Differentially expressed genes (DEG)を抽出すると、それらは膵臓に限らず内胚葉系細胞の様々な分化段階に関与する遺伝子群であることがわかった。この知見は、パブリックデータベースに登録されている多数の膵癌組織検体の発現データを用いても再現性が得られた。
4. 臓器特異的な遺伝子に発現の差が見られたため、続いてエピゲノム制御に注目し ATAC sequence を行うと、IPMN 並びに IPMN 由来浸潤癌と通常型膵癌にはクロマチン構造に差があることがわかった。さらにオープンクロマチン部位に結合する転写因子候補を Footprint 解析にて抽出すると HNF1B と CTCF が IPMN 由来浸潤癌において有意に結合

していることが示唆された。

5. HNF1B の機能を追求すべくノックダウン実験を行うと、IPMN 由来浸潤癌では継続培養が困難となることがわかった。また HNF1B の target となる遺伝子をパブリックの ChIP sequence のデータより抽出すると、HNF1B 自身を含めて IPMN 由来浸潤癌特異的な DEG の一部についてはその近傍に HNF1B の結合部位を有することが示された。

6. CTCF の ChIP sequence を行うと、Footprint 解析を支持するように通常型膵癌よりも IPMN 由来浸潤癌でより多くの CTCF 結合部位が同定された。具体的には *HNF1B* や、IPMN 由来浸潤癌の DEG 近傍に IPMN 由来浸潤癌特異的な CTCF 結合部位が同定され、CTCF が *HNF1B* をはじめとする IPMN 由来浸潤癌での DEG の発現に関与していることが示唆された。実際 CTCF をノックダウンすると、CTCF のノックダウン効率と有意に相関して *HNF1B* の発現低下が見られた。

本研究はオルガノイドモデルを用いて IPMN 由来浸潤癌では内胚葉系の様々な分化段階に関わる遺伝子の発現が亢進していることを見出し、その背景として IPMN 由来浸潤癌と通常型膵癌にはクロマチン構造の差があることを明らかにした。さらに責任分子として HNF1B および CTCF を見出していることから、さらにその下流を探索することで、IPMN 由来浸潤癌特異的な治療 target を同定できる可能性を提示している。

以上、本論文は起源細胞・発癌様式の異なる膵癌の層別化を試みた研究であり、最難治癌である膵癌治療の層別化・最適化に向けて重要な貢献をなすと考えられる。

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。