

審査の結果の要旨

氏名 寺門(千野) 侑美

本研究は本研究では、発癌機序の解明や新規治療の開発に有用な新規肝内胆管癌マウスモデルを樹立し、癌の起源細胞を検討するため、肝特異的な *Kras* 活性化と *Pten* 欠損の導入により、肝内胆管癌のみを生じるマウスモデルの樹立と起源細胞の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス肝特異的活性化型 *Kras* ノックインと *Pten* ノックアウトにより両経路を共活性化した、*Alb-Cre*⁺; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pten*^{flx/flx} (*AKPP*) マウスを作製したところ、*Pten* をヘテロでノックアウトした *Alb-Cre*⁺; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pten*^{flx/+} (*AKP*) マウスと、*Kras* 変異のみの *Alb-Cre*⁺; *LSL-Kras*^{G12D/+} (*AK*) マウスと比較し、*AKPP* マウスは早期に死亡し、平均寿命はわずか 46 日であった。生後 8 週齢の *AKPP* マウスの肝臓の肉眼的所見では、肝門部を中心とした硬いびまん性腫瘍病変を認めた。組織学的検討を行ったところ、*AKPP* マウスの生後 3 週齢における肝臓は、肝内胆管を含めほぼ正常であったが、生後 7~8 週齢においては、肝門部腫瘍周辺に高度な線維化を伴う、ヒト肝内胆管癌に類似した腫瘍性病変を認めた。しかし、興味深いことに肝細胞癌様の腫瘍性病変、多臓器への転移や浸潤は全く見られなかった。
2. 胆管上皮細胞のマーカーとして知られている pan-cytokeratin (pan-Ck) と Ck19、肝細胞のマーカーとして知られている *Hnf4α* の免疫染色を行ったところ、肝腫瘍部は pan-Ck と Ck19 が陽性で、*Hnf4α* は陰性であり、腫瘍を形成している細胞は胆管上皮細胞の性質を持つことが明らかとなった。また、この腫瘍部ではヒトの肝内胆管癌で高率にみられる、*p16* の発現低下と *p16* 遺伝子プロモーター領域が高メチル化されていることが明らかとなった。
3. 肝細胞が起源細胞になりえるかどうかを解明するため、*Alb-Cre*^{ERT2/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pten*^{flx/flx} (*AERKPP*) マウスを作製し、生後 8 週齢と生後 10 日で投与したところ、生後 8 週齢の *AERKPP* マウスには肝細胞癌またはその前癌病変が、生後 10 日の *AERKPP* マウスにタモキシフェンを投与したところ、肝臓は肝門部を中心とした硬いびまん性腫瘍病変を認めた。組織学的検討からこの病変は、肝内胆管癌であることが明らかとなった。
4. 生後 8 週齢と生後 10 日の二つの条件で遺伝子組み換えが起こる細胞を検討したところ、生後 8 週齢の *AERmTmG* マウスは、遺伝子組み換えが起こる細胞は肝細胞のみであったのに対し、生後 10 日のマウスでは、肝細胞だけでなく胆管上皮細胞でも遺伝子組み換えが起こっていたことが明らかとなった。

5.胆管上皮特異的に遺伝子改変の起こる *Ck19Cre^{ERT/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flox/flox}* (*Ck19KPP*) マウスを作製し、肝臓における病理組織学的検討を行ったところ、門脈周囲において乳頭状管の肝内胆管癌前癌病変が認められ、胆管上皮細胞が起源細胞となりえることが明らかとなった。

6. 本肝内胆管癌マウスモデルの腫瘍における Notch シグナルの関与を検討したところ、Notch シグナルに必要な転写因子である *Rbpj* の発現と、下流の重要なエフェクター遺伝子として知られている *Hes1* と *Sox9* の発現が明らかとなった。

7. *Ras-Mapk* シグナル経路阻害により、*Hes1* の発現はタンパク質レベル、mRNA レベルとともに抑制されたため、*Hes1* のプロモーター、イントロン、3'UTR の *Mapk* 経路依存的転写調節領域の同定を試みたが、特定には至らなかった。

8. *AKPP* マウスの肝内胆管癌発生における *Hes1* の役割を *in vivo* で検討するため、*Hes1* の条件的ノックアウトマウス (*Hes1^{flox/flox}*) と *AKPP* マウスを交配した *Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flox/flox}; Hes1^{flox/flox}* (*AKPPHH*)マウスを作製した。*AKPPHH* マウスは、*AKPP* マウスと同様に肝門部で肝内胆管癌様病変を形成していたことから、*Hes1* はこのマウスの腫瘍形成において不可欠ではないことが明らかとなった。

9. *AKPP* マウスの肝内胆管癌発生における *Rbpj* の役割を *in vivo* で検討するため、*Rbpj* の条件的ノックアウト (*Rbpj^{flox/flox}*) と *AKPP* マウスを交配した *Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flox/flox}; Rbpj^{flox/flox}* (*AKPPRR*)マウスを作製した。生後 5 週齢において、*AKPPRR* マウスの肝門部に肝内胆管癌前癌病変と考えられる症状を認めた。一方、末梢部では肝門部で見られたような胆管の変化は見られず、胆管の著明な減少を認めた。このことから *Rbpj* は胆管形成自体に必須であることが示唆された。

以上、本論文は肝特異的活性化型 *Kras* ノックインと *Pten* ノックアウトにより両経路を共活性化した、*Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flox/flox}* (*AKPP*) マウスを作製することにより、新規肝内胆管癌マウスモデルの樹立に成功した。また、このマウスモデルから幼弱な胆管上皮細胞または肝細胞が癌起源細胞となりえることが明らかになった。また、Notch シグナルの重要な転写因子 *Rbpj* が胆管の増生と発癌にかかわることが明らかとなった。本研究は、肝内胆管癌の新規治療法や治療薬を評価するうえで重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。