

## 審査の結果の要旨

氏名 藤原 弘明

本研究は肝内胆管癌における新規遺伝子異常である Isocitrate dehydrogenase (IDH) 変異の機能的意義について、正常肝内胆管の3次元培養系であるオルガノイド培養法を用いて解析したものであり、以下の結果を得ている。

1. マウス肝臓から樹立したオルガノイド（以下、肝オルガノイド）にレンチウイルスを用いて変異型ヒト IDH1 を安定発現させると、野生型を発現させた肝オルガノイドと比較してオルガノイド形成能が有意に上昇することが示された。継代を繰り返しても同様の傾向が再現されるため、IDH1 変異が胆道系細胞の自己複製能を増強させることが示された。
2. ウェスタンブロッティング法を用いたヒストン修飾の解析では、変異型 IDH1 を発現させた肝オルガノイドにおいて、H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3 の増加が示された。IDH1 変異の発現によって、肝オルガノイドのヒストン修飾が変化することが示された。
3. cDNA を用いた網羅的発現解析では、野生型と比較して、変異型 IDH1 を発現する肝オルガノイドにおいて発現が上昇或いは低下する遺伝子が複数認められた。これらの遺伝子は IDH1 変異の有力な標的候補であると考えられた。
4. 変異型 IDH1 を発現させた肝オルガノイドを野生型と共にヌードマウスの皮下へ移植したが、腫瘍は形成されなかった。IDH1 変異単独では形質転換に至らず、発癌には他の oncogene の合併が必要と考えられた。
5. CAG-loxp-stop-loxp 配列の下流に変異型ヒト IDH1 を組み込んだコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスを作成した (LSL-IDH1mut)。このマウスを、アルブミンのプロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Alb-Cre) と交配させて、肝特異的 IDH1 変異発現マウス (Alb-Cre;LSL-IDH1mut) を作成した。Alb-Cre;LSL-IDH1mut マウスでは、肝細胞及び肝内胆管細胞の両方に変異型 IDH1 の発現を認めたが、30 週齢の段階では対照群 (Alb-Cre) と比較して形態変化や明らかな腫瘍形成は認めなかった。発癌に重要なシグナル経路についても免疫染色を行ったが両群で明らかな差は無く、IDH1 変異単独では形質転換に至らないというオルガノイドでの検討結果と一致した。

以上、本論文はマウス肝臓から樹立したオルガノイドにおいて、IDH1 変異によってその自己複製能が増強されることを明らかにした。本研究はこれまで未知であった IDH 変異による胆道系細胞への影響、発癌メカニズムの解明に重要な貢献を為すと考え

えられ、学位の授与に値するものと考えられる。