博士論文（要約）

論文題目　　肝内胆管癌における IDH 変異の意義

氏　　名　　藤原　弘明

論文の内容の要旨

論文題目　　肝内胆管癌における IDH 変異の意義

氏名　　　　藤原　弘明

肝内胆管癌は肝細胞癌に次いで 2 番目に多い肝癌であり、予後不良である。疾患頻度には地域差があり、タイを始めとした東アジアに多いが、これにはリスクファクターの一つである肝吸虫症が関係している。近年報告された胆管癌の全エクソン解析では、肝吸虫症の有無により変異遺伝子のパターンが異なることが明らかになっているが、Isocitrate dehydrogenase (IDH) 変異は肝吸虫非感染例に多い遺伝子変異として同定されており、その頻度は 10-30%と言われている。

IDH は TCA 回路において、イソクエン酸からα-ケトグルタル酸（α-KG）を産生する酵素であり、主に細胞質に存在する IDH1 と、ミトコンドリアに存在する IDH2、２つのアイソフォームが存在する。変異型 IDH は、野生型 IDH の代謝産物であるα-KG を D-2-ヒドロキシグルタル酸（D-2HG）に変換するが、D-2HG は生体内に存在する様々なα-KG 依存性還元酵素の活性を阻害することが知られている。α-KG 依存性還元酵素には、ヒストン脱メチル化酵素である KDM ファミリーや、DNA 脱メチル化酵素である TET ファミリーなど、エピジェネティック修飾に関係する酵素が含まれているため、その活性は遺伝子発現調節において重要な働きを担っている。このようなエピジェネティック修飾の変化を背景に、IDH 変異は発癌過程における driver gene として働くと考えられている。

IDH 変異は、膠芽腫や急性骨髄性白血病(AML)で同定されており、それぞれ多くの先行研究がある。膠芽腫では grade2、3 の神経膠腫から発生した secondary glioblastoma において 70-80%と高い頻度で見られ、予後は IDH 野生型と比較して良好である。ヒト星細胞では IDH1 変異により、ヒストン H3 のリジン残基や多くの遺伝子の DNA メチル化が進行し、星細胞マーカーの消失とともに、神経細胞マーカーの発現上昇を認め、エピジェネティック修飾を介した分化異常と発癌の関連が示唆されている。一方、AML では IDH 変異を 10-30％程度に認め、核型やその他の遺伝子変異（NPM1、FLT3-ITD）で分類されるいくつかのサブグループにおいては予後不良因子との報告がある。骨髄系前駆細胞特異的に IDH1 変異を発現させたノックインマウスでは、高齢になるほど成熟した細胞が減少し、幼若な細胞の割合が増加するが、単独では AML を発症しないことが報告されている。

発癌における遺伝子変異の意義を解明する上で、上記のような遺伝子改変動物は非常に

重要なツールであるが、解析にやや時間がかかるのが難点である。そんな中、様々な臓器及び組織由来の細胞を、原発部位の特性を保ちつつ長期間継代する、オルガノイドを利用した癌研究が近年注目されている。当初は小腸を始めとした消化管で発達した技術であるが、肝臓においても同様にオルガノイドを作製することができる。マウスの肝臓由来オルガノイドは、培養条件によっては肝細胞系の遺伝子発現が若干誘導されるものの、基本的には胆管上皮由来の細胞である。即ち肝臓オルガノイドへの変異遺伝子発現によって、主として肝内における胆道系細胞への影響を検討することが可能である。

IDH 変異をマウス胎児由来肝芽細胞に発現させると、HNF4α発現抑制に伴い肝細胞への分化が抑制されるとの報告はあるが、胆道系細胞への影響は明らかでない。また既報では肝特異的に IDH2 変異、KRAS 変異を両方発現させたマウスは肝内胆管癌を発症するが、ヒトではこの組み合わせは極めて稀である。その意味で、ヒトでの IDH 変異陽性肝内胆管癌の解析に適した実験モデルマウスは未だ報告が無い。

以上のような背景を鑑み、我々は肝内胆管癌の発癌における IDH 変異の胆道系細胞への影響を明らかにすることを研究の目的とした。まず、野生型マウスの肝臓からオルガノイドを樹立し、その性質の評価を行った。オルガノイドより抽出した mRNA から cDNA を合成し定量的リアルタイム PCR で解析したところ、胆道系マーカーが優位に発現していた。肝細胞系マーカーは殆ど発現が見られなかったが、NOTCH 阻害剤や ALK5 阻害剤の追加等、培養条件の変更で若干の発現上昇を認めた。この結果は既報とも矛盾せず、我々が今回得たオルガノイドは、主は胆道系の細胞であると考えられた。

次に、レンチウイルスを用いて、野生型及び変異型ヒト IDH1 を安定発現させたオルガノイドを作製した。それぞれ特異的なプライマーを用いた逆転写 PCR で、mRNA レベルでの発現を確認するとともに、メタボローム解析によって IDH1 変異株における変異特異的代謝産物 2HG の産生を確認し得た。

続いて我々は、変異 IDH1 発現オルガノイドの表現型について検討した。まず、オルガノイド形成における影響を調べるため、IDH1 野生株と変異株を 3000 個ずつ plating し、day7 におけるオルガノイド形成数（≧100μm）を計測した。その結果、変異株では野生株と比較して有意にオルガノイド形成数が増加した。この結果は継代を繰り返しても同様であり、IDH1 変異はオルガノイドの自己複製能を高めることが示された。

IDH 変異特異的代謝産物である 2-HG は、α-KG 依存性ヒストン脱メチル化酵素の阻害を介して細胞のヒストン修飾プロファイルに影響する。そこで我々は、オルガノイドの自己複製能増強を誘導する背景としてエピゲノム異常が関与している可能性を検討するため、変異型 IDH1 発現オルガノイドの細胞内でのグローバルなレベルでのヒストン修飾プロファイルについて、ウェスタンブロッティング法を用いて解析した。その結果、IDH1 変異株において、9 番目のリジン残基がトリメチル化されたヒストン H3 (H3K9me3)をはじめ、H3K4me3、H3K27me3 でも増加を認めた。この結果から既報同様、マウス肝臓由来オルガノイドにおいても 2-HG を介した、αKG 依存性ヒストン脱メチル化酵素抑制によるヒストンメチル化の異常が存在することが示唆された。

上記の結果を踏まえ、IDH1 変異によって発現が変化した遺伝子群を明らかにするために、IDH1 変異株と野生株の各 2 対より RNA を回収し網羅的発現アレイ解析を行った。有意に二倍以上の増加あるいは低下を示すものを抽出したところ、複数の遺伝子群で発現上昇或は低下を認め、代謝や分化、増殖に重要な遺伝子が含まれていた。これらは変異型 IDH1 の有力な標的遺伝子候補であり、今後、その機能について validation を行っていく予定である。

IDH1 変異による自己複製能増強が、腫瘍発生と関連するかどうかを検討するため、ヌードマウスを用いた肝オルガノイドの皮下移植実験を行った。IDH1 変異株及び野生株を 2×10^6 個ずつヌードマウスの皮下へ移植し、18 週まで経過観察したが、両群とも腫瘍は形成されなかった。この結果から、IDH 変異単独では胆道系細胞の形質転換には至らず、既報同様癌化にはその他の oncogene の合併が必要であると考えられた。

最後に、*in vivo* における IDH1 変異の影響について検討するため、遺伝子改変動物を作製し解析を行った。変異型ヒト IDH１（R132S）の配列を、ベクター（pCALNL5）の CAG-loxp-stop-loxp 配列の下流に ligation して得たコンストラクトから、loxp-stop-loxp-IDH1mut マウス（LSL-IDH1mut）を作製した。このマウスを Albumin promotor 下で Cre recombinase を発現する Alb-Cre マウスと交配させて得られた、Alb-Cre;LSL-IDH1mut マウスを解析に用いた。対照群として Alb-Cre マウス、LSL-IDH1mut マウスと共に 30 週齢で sacrifice し、摘出した肝臓のタンパク質をウェスタンブロッティング法にて解析したところ、Alb-Cre;LSL-IDH1mut マウスにおける変異型 IDH1(R132S)の特異的発現を確認し得た。免疫組織染色でも発現を認めたが、ヘマトキシリン・エオジン染色では 3 者の肝細胞及び胆管細胞に形態的差異は認めなかった。発癌に関連した変化を検討するため、増殖シグナル因子（p-Erk、pStat-3）等を中心に免疫組織染色を行ったが、有意な差は認めなかった。この結果は、オルガノイドにおける検討で、IDH1 変異単独では形質転換に至らなかったこととも一致する。

以上、肝内胆管癌の発癌における IDH 変異の意義について、*in vitro* 及び *in vivo* での解析を行った。IDH 変異は正常肝において単独での発癌には至らないものの、胆道系細胞から構成されるオルガノイドの自己複製能増強という、発癌と関連し得る重要な変化をもたらすことが明らかになった。今後は、網羅的解析で明らかになった遺伝子群の機能解析を進める他の oncogene を合併した際の影響について検討していく予定である。