

京都大学	博士（医学）	氏名	長尾 宗政
論文題目	<b>Concurrent Activation of Kras and Canonical Wnt Signaling Induces Premalignant Lesions That Progress to Extrahepatic Biliary Cancer in Mice</b> (マウス肝外胆管においてKrasおよびWntシグナルの活性化により前癌病変が形成され、胆道癌へ進行する)		
(論文内容の要旨) 胆道癌は難治性癌の一つであり、予後改善のためには新規治療法の開発が求められている。そのためには、胆道癌およびその前癌病変の発生機序を明らかにすることが重要である。近年、胆管癌および胆嚢癌の前癌病変として微小乳頭状病変である <b>biliary intraepithelial neoplasia (BillN)</b> 、乳頭状病変である <b>intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB)</b> や <b>intrahepatic cholangiocarcinoma (ICPN)</b> という概念が提唱された。しかし、胆道癌における前癌病変の発生メカニズムや、癌への進展メカニズムについては未だ十分に明らかになっていない。今回、胆管癌および胆嚢癌で遺伝子変異の比較的多い <b>Kras</b> および <b>Wnt</b> シグナルの胆道腫瘍形成における役割について解析した。 まず、胆道上皮選択的に遺伝子改変を誘導する <b>CreER</b> マウスを探索するために、胆道上皮特異的に高発現する分子を調べた。免疫染色の結果、胆道上皮細胞において <b>Hnf1b</b> が高発現していることが判明した。 <b>Hnf1βCreER; Rosa-LacZ</b> マウスを用いて細胞系譜解析を行った結果、タモキシフェン誘導性に胆管と胆嚢上皮細胞の遺伝子組み換えが可能となることを示した。次に、胆道腫瘍発生における <b>Kras</b> および <b>Wnt</b> シグナルの活性化による影響について <b>Hnf1βCreER; Kras<sup>G12D</sup>; Ctnnb1lox<sup>(ex3)/+</sup> (HKβ)</b> マウスを作成し解析を行った結果、肝外胆管に <b>BillN</b> 、胆嚢に <b>ICPN</b> がそれぞれ形成されることを見出した。腫瘍部では幽門腺マーカーである <b>GSII</b> が陽性となり、胃型の形質を持っていると考えられた。さらに、 <b>HKβ</b> マウスで形成した胆道腫瘍の <b>malignant potential</b> を検証するために <b>HKβ</b> マウスの肝外胆管および胆嚢より胆道腫瘍スフェロイドを樹立した後に免疫不全マウスに <b>xenograft</b> を行って解析した結果、24 例中 2 例の低い頻度ではあるが、胆道癌へと進展することが明らかとなった。 <b>H(Hnf1βCreER)</b> および <b>HK(Hnf1βCreER; Kras<sup>G12D</sup>)</b> , <b>Hβ(Hnf1βCreER; Ctnnb1lox<sup>(ex3)/+</sup>)</b> , <b>HKβ</b> マウスの肝外胆管より胆管スフェロイドを樹立した後に、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、 <b>HKβ</b> スフェロイドでは <b>TGFβ</b> シグナルに関連する遺伝子、および <b>c-Myc</b> の発現が上昇していた。腫瘍形成における <b>c-Myc</b> の機能的解析のため、 <b>c-Myc</b> をノックダウンもしくは薬剤にて阻害した結果、 <b>HKβ</b> スフェロイドの増殖が抑制された。一方、 <b>TGFβ</b> シグナルの腫瘍形成および癌への進展における機能的解析のため、 <b>Smad4/Tgfr2</b> のノックダウンもしくは薬剤による <b>TGFβ</b> シグナルの阻害を行った結果、 <b>HKβ</b> スフェロイドの増殖速度が上昇し、 <b>xenograft</b> の系で癌への進行が促進された。さらに、ヒトの胃型 <b>ICPN</b> の免疫染色にて <b>Kras</b> および <b>Wnt</b> シグナル、 <b>c-Myc</b> 、 <b>TGFβ</b> シグナルが高発現しており、マウスの結果はヒトでも矛盾しないことが示された。 以上より、マウス肝外胆管にて <b>Kras</b> と <b>canonical Wnt</b> 経路の活性化により <b>ICPN</b> および <b>BillN</b> が形成され、胆道癌へ進行することが明らかになった。腫瘍形成メカニズムとして、 <b>c-Myc</b> が腫瘍促進的、 <b>TGFβ</b> シグナルが腫瘍抑制的に働くことが示された。			

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、肝外胆管および胆嚢の腫瘍形成における **Kras** と **Wnt** シグナルの役割を解明するために、胆道腫瘍マウスモデル作成およびマウス胆道腫瘍スフェロイドを用いて解析を行なった。**Hnf1βCreER** マウスではタモキシフェン誘導性に胆管および胆嚢において遺伝子組み換えが可能になることを示し、**Hnf1βCreER** マウスを用いて肝外胆管および胆嚢で **Kras** および **Wnt** シグナルを活性化させることで、**BillN** および **ICPN** を形成することを見出した。これらの胆道腫瘍をスフェロイドにして **xenograft** することにより癌へ進展することを証明した。さらに、腫瘍形成のメカニズム解析のために、マウスの肝外胆管および胆嚢より樹立した胆道スフェロイドを用いて網羅的遺伝子発現解析および機能解析を行うことで、胆道腫瘍スフェロイドでは **c-Myc** は腫瘍促進的に働き、一方で **TGFβ** シグナルは腫瘍抑制的に働いていることが明らかとなった。

以上より、本研究では肝外胆管および胆嚢において **Kras** および **Wnt** シグナルの活性化により、**BillN** および **ICPN** が形成され、癌へと進展することを初めて明らかにし、胆道腫瘍が癌化するメカニズムについても新しい知見を得た。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和4年9月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。