

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	山 岡 竜 也
論文題目	CD90 expression in human intrahepatic cholangiocarcinoma is associated with lymph node metastasis and poor prognosis  （ヒト肝内胆管癌における CD90 発現はリンパ節転移と予後不良に關与する）		

（論文内容の要旨）
【目的】肝内胆管癌は肝原発の悪性腫瘍として肝細胞癌に次いで多い。他の多くの悪性腫瘍で新規治療が開発され予後も改善している一方で、肝内胆管癌は診断、治療ともに難しく依然として予後不良な疾患である。CD90の発現は肝細胞癌など多くの癌種で予後不良因子として報告されている。しかし肝内胆管癌におけるCD90発現に関する報告はほとんどない。そのためヒト肝内胆管癌におけるCD90発現の意義について検討することを本研究の目的とした。
【方法】京都大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科において肝内胆管癌に対し切除手術が施行された77例の手術検体を用いてCD90の発現を原発巣及びリンパ節転移巣に対して免疫組織学的染色を行い、臨床病理学的所見や予後との関連について検証した。さらにヒト肝内胆管癌の細胞株を用いて、フローサイトメトリーで単離したCD90陽性/陰性細胞の転移能に関する特性について検証を行った。
【結果】肝内胆管癌切除症例においてCD90の発現は77例中25例でみられた。臨床病理学的所見との関連においては、リンパ節転移との有意な相関関係が認められた。さらにリンパ節転移陽性と診断されたリンパ節についてもCD90で免疫染色を行ったところ、原発腫瘍でCD90陽性細胞を認めた症例では転移リンパ節においてもCD90陽性細胞が有意に高頻度に観察された。Kaplan-Meier分析ではCD90陽性症例は陰性症例と比較して無再発生存期間、全生存期間ともに有意に予後不良であった。そして単変量解析および多変量解析ではCD90発現は独立予後規定因子の一つであった。CD90発現細胞の転移能について <i>in vitro</i> で分析を行うためヒト肝内胆管癌の細胞株（RBE,SSP-25）を用いた。Wound healing assay、migration assayにおいて、フローサイトメトリーで分離したCD90陽性細胞は、陰性細胞と

比較し有意に高い遊走能を示した。転移に関わる細胞機構とされるEpithelial-Mesenchymal Transition（EMT）に関する遺伝子発現を定量PCRで確認したところ、CXCR4やMMP7の高発現を示した。CD90陽性細胞に対しsiRNAによるCD90発現のノックダウンによりこれらの発現はCD90発現とともに低下した。CXCR4とMMP7はWnt/ $\beta$ -catenin signaling pathwayの標的遺伝子と報告されており癌の進展に重要な役割を果たしていると考えられている。CD90陽性/陰性細胞のWnt/ $\beta$ -catenin signaling活性について活性化 $\beta$ -cateninの免疫染色ならびにTCF/LEF Luciferase assayで解析したところ、CD90陽性細胞で有意にWnt/ $\beta$ -catenin signaling活性が上昇していた。一方でWnt/ $\beta$ -catenin signaling pathwayの阻害薬であるICG-001をCD90陽性細胞に作用させると、CXCR4やMMP7の発現が低下した。これらの結果より、CD90陽性細胞はWnt/ $\beta$ -catenin signaling pathwayの活性化を通してCXCR4やMMP7の高発現を認めており、高い転移能を有していると考えられた。

【結論】肝内胆管癌においてCD90発現細胞は*in vitro*ではWnt/ $\beta$ -catenin signalingを介してEMT関連遺伝子を高発現し高い転移能を有していた。その結果*in vivo*ではリンパ節転移のリスクが高くなり予後不良に関与すると考えられた。

（論文審査の結果の要旨）

肝内胆管癌は診断・治療ともに難しく予後不良な疾患である。CD90発現は様々な癌種において予後不良因子として報告されているが、肝内胆管癌におけるCD90発現に関する報告はほとんどない。

本学位授与申請者は、肝内胆管癌の手術標本においてCD90の発現を免疫染色によって確認し、臨床病理学的所見においてCD90発現とリンパ節転移との相関があることを示した。CD90陽性症例は無再発生存期間・全生存期間において予後不良であり、CD90発現が予後不良因子であることを示した。

さらに、肝内胆管癌の細胞株を用い*in vitro*での実験を行なった。Wound healing assay、migration assayによりCD90陽性細胞が高い遊走能を持つことが示された。さらにCD90陽性細胞で上皮間葉転換関連遺伝子であるCXCR4、MMP7が高発現していた。これらの遺伝子発現はsiRNAによるCD90のノックダウンで低下した。CXCR4とMMP7はWnt/ $\beta$ -catenin signaling経路の標的遺伝子であるが、CD90陽性細胞ではWnt/ $\beta$ -catenin signaling経路が活性化しており、阻害剤によりこれらの遺伝子発現が低下することが確認された。

以上の研究は肝内胆管癌におけるCD90発現の意義の解明に貢献し今後の肝内胆管癌の基礎研究の発展に寄与するところが多い。

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、平成31年2月4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。