

京都大学	博士 (医学)	氏名	松森友昭
論文題目	<i>Hes1</i> is essential in proliferating ductal cell-mediated development of intrahepatic cholangiocarcinoma. (<i>Hes1</i> 遺伝子は細胆管由来の肝内胆管癌の発生に重要な役割を果たす)		
(論文内容の要旨)			
<p>これまでのゲノム解析により、KRAS、TP53 遺伝子の変異が肝内胆管癌(ICC)のドライバー変異であり、これらの変異が増殖活性の高い肝内の細胞に生じることが ICC の発生に重要であるとされている。一方、正常な肝内胆管の形成には Notch シグナル経路が重要な役割を担っており、下流分子の一つである Hes1 が特に重要とされている。一方で、Hes1 は正常な肝内胆管のみならず ICC にも発現することが知られているが、ICC の発生、進展における Hes1 の関与、役割については未だ不明である。また、ICC が肝内のどの細胞から発生するのかについては議論のあるところである。細胆管細胞 (proliferating ductal cells: PDCs) は肝細胞・胆管細胞両方への分化能を有する未分化な細胞とされており、肝炎などにより肝細胞や胆管細胞が障害された際の修復を行う細胞として出現することが知られている。PDCs では Notch シグナル経路が活性化していることから、PDCs が ICC の起源細胞となっている可能性が充分考えられる。本研究は ICC の発生過程における Hes1 の役割について、主に PDCs の形成に着目し、独自のマウスモデルを用いて解明することを目的とした。</p> <p>まず、ICC の発生に関わる Hes1 の役割を解析するため、Alb-Cre マウスを用いて肝臓特異的に変異 <i>Kras</i> および変異 <i>Kras</i> と変異 <i>Trp53</i> 遺伝子を発現させた、AlbcreK、AlbcreKP マウスを作成した。それぞれのマウスでは ICC と HCC が高率に発生し、本研究における肝発癌モデルとして使用した。これらのマウスで Hes1 遺伝子を欠損(<i>Hes1^{flf}</i>)させたところ、正常肝組織の発生、HCC の形成には影響を与えなかったが、ICC の形成は著明に抑制され、Hes1 遺伝子は ICC の発生に深く関与していることが示唆された。また、ICC 発生の減少と相関して PDCs の形成も有意に抑制されていることが判明した。AlbcreK: Hes1^{flf} マウスの背景肝組織を用いて RNA-sequencing を行ったところ、Hes1 遺伝子の欠損により RAS/ERK pathway や E2F pathway といった発癌に関与する分子経路の活性が抑制されており、Hes1 遺伝子はこれらの pathway を制御することで ICC の発生に関与している可能性が示唆された。</p> <p>続いて、AlbcreKP マウスと Notch 遺伝子を過剰発現するマウスを交配して AlbcreKP: RosaNotchOE/+ マウスを作成し、その表現型を解析したところ、Hes1 が強陽性の ICC 及び PDCs の形成が著明に促進された。一方、Hes1 遺伝子を欠損させた AlbcreKP: RosaNotchOE/+ : Hes1^{flf} マウスでは ICC、PDCs の形成が有意に抑制された。このことから、PDCs、ICC の形成に Notch シグナルが深く関わっており、その下流因子の中で特に Hes1 遺伝子が重要な役割を担っていることが示唆された。</p> <p>次に、PDCs の形成における Hes1 遺伝子の役割を解明するため、PDCs 特異的に遺伝子導入が可能である Epcam-CreERT2 マウスを用いて解析を行った。DDC 食を摂取させ肝炎を惹起し、PDCs 特異的に Hes1 遺伝子を欠損させた EpcamcreERT2: Hes1^{flf} マウスでは、コントロールマウスと比較し PDCs の形成が抑制された。</p> <p>さらに PDCs 特異的に変異 <i>Kras</i>、変異 <i>Trp53</i>、Notch シグナルの過剰発現を導入した EpcamcreERT2KP: RosaNotchOE/tdTomato マウスにて lineage tracing を行ったところ、PDCs 由来の pre-malignant lesion が形成され、それより ICC が形成されることが示された。このことから、PDCs の形成に Hes1 遺伝子が重要な役割を担っており、PDCs における Hes1 発現が ICC の形成に強く関与する可能性が示唆された。</p> <p>最後に、ヒト ICC の切除検体における HES1 の発現について免疫化学染色にて解析したところ、ICC の背景肝組織には多数の PDCs の増生を認め、PDCs、ICC の両方に HES1 が高度に発現していることが確認された。マウスモデルにおける解析結果と同様に、ヒトにおいても PDCs の増殖は ICC の形成と密接な関係があり、その過程で HES1 が重要な</p>			

役割を担っていることが示唆された。

以上より、Hes1 遺伝子は PDCs の形成および PDCs 由来の ICC の形成に重要な役割を担っており、Hes1 は今後 ICC の治療における新規の標的分子となる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

肝内胆管癌(ICC)の形成には Notch シグナルが関与するとされている。Hes1 は Notch シグナルの最も重要な下流因子の一つであり、ICC に強く発現するがその役割は不明である。肝細胞・胆管細胞双方への分化能を持つ細胆管細胞 (PDC) には Notch シグナルが活性化していることから、本研究では Hes1 が ICC 発生過程において果たす役割について、特に PDC の形成に着目し解明することを目的とした。

肝細胞特異的に変異 *Kras/Trp53* を発現するマウスモデルでは、PDC の増加を伴って肝細胞癌(HCC)と ICC の発生を認めるが、*Hes1* 欠損により PDC の形成と ICC の発生は抑制された。また、このマウスに Notch シグナルを強発現(NotchOE)させると PDC 形成と ICC の発生は促進され、*Hes1* を欠損させることにより両者とも抑制された。

PDC 特異的に *Hes1* を欠損させたマウスに肝炎刺激を加えると、コントロール群と比較し PDC の形成は抑制された。また、PDC 特異的に変異 *Kras/Trp53* を導入し、NotchOE させたマウスで lineage tracing を行うと、PDC を起源に ICC が形成されることが明らかとなった。

以上より、Hes1 は PDC 形成と ICC の発生に重要な役割を果たし、Notch-Hes1 axis の活性化は PDC を起源とする ICC の発生に強く関与する可能性が示唆された。

以上の研究は肝内胆管癌の病態解明に貢献し、ICC の新規治療の開発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、令和3年3月5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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降