

京都大学	博士 (医学)	氏名	並川実桜
論文題目	Simultaneous activation of Kras-Akt and Notch pathways induces extrahepatic biliary cancer via the mTORC1 pathway (胆道上皮において Kras-Akt と Notch シグナルを活性化させると、mTORC1 経路を介して肝外胆管癌が形成される)		
(論文内容の要旨) 胆道癌は 5 年生存率 7-20% と予後不良であり、新たな治療法の開発が望まれる。胆道癌の発癌と進行には多くの分子経路が関わっていると報告されており、Notch シグナルもその中の一つであるが、その詳細な役割は不明であった。本研究では肝外胆管・胆嚢腫瘍形成における Notch シグナルの機能を解明することを目的とした。 胆管・胆嚢上皮選択的に Kras 及び Notch シグナルを活性化させた <i>Hnf1b-CreERT2</i> ; <i>Kras^{LSL-G12D}</i> ; <i>Rosa26^{LSL-Notch1C}</i> (<i>HKN</i>) マウスを解析した結果、肝外胆管及び胆嚢に胆道上皮内腫瘍 (BillN) の形成を認めた。 <i>Hnf1b-CreERT2</i> (<i>H</i>)、 <i>Hnf1b-CreERT2</i> ; <i>Kras^{LSL-G12D}</i> (<i>HK</i>)、 <i>Hnf1b-CreERT2</i> ; <i>Rosa26^{LSL-Notch1C}</i> (<i>HN</i>)、 <i>HKN</i> マウス胆管・胆嚢上皮からスフェロイドを樹立し、NOD-SCID マウスに皮下移植したところ、 <i>HKN</i> 胆道スフェロイドのみ 4/20 例 (20%) で生着して管状腺癌を形成した。これより <i>HKN</i> マウスの BillN 病変は前癌病変であることが示された。 <i>H</i> , <i>HK</i> , <i>HN</i> , <i>HKN</i> マウスから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を行った結果、 <i>HKN</i> マウス胆道上皮では mTORC1 経路の遺伝子群の発現が亢進していた。 京都大学医学部附属病院の肝外胆管癌 50 例、胆嚢癌 28 例の術後標本を用いて、activated NOTCH1 と p-S6 の免疫染色を行った結果、activated NOTCH1 陽性の肝外胆管癌症例では p-S6 高発現が 68% と有意に多く、ヒト肝外胆管癌においても NOTCH と mTORC1 経路に正の相関関係があることが判明した。 ヒト胆管癌、胆嚢癌細胞株 5 種類について、Notch シグナル活性化の有無をウェスタンブロットで調べた結果、HuCCT-1 と TFK-1 では cleaved NOTCH1 の発現を認め、Notch シグナルが活性化していた。この 2 種類の細胞株では p-S6 と p-4EBP1 の発現も高く、mTORC1 経路が亢進していた。これらの細胞に mTOR 阻害剤を投与したところ、 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で増殖が抑制された。 さらに、Notch が mTORC1 経路を活性化させるメカニズムを調べた。Notch の下流因子の一つである Myc の発現を調べたところ、 <i>HKN</i> 胆道スフェロイド及び <i>HKN</i> 胆管・胆嚢上皮では Myc の発現が亢進していた。次に、mTORC1 を負に制御する TSC 複合体に着目した。Akt は TSC 複合体の中の TSC2 をリン酸化することで、TSC 複合体の活性を低下させ、mTORC1 経路を活性化させている。そこで、Myc が TSC2 をリン酸化することで mTORC1 経路を活性化させているという仮説を立てた。Notch が活性化していないヒト胆管癌細胞 K KU-100 に対して、Notch1 intercellular domain を過剰発現させるプラスミドを導入したレンチウイルスを感染させた結果、p-S6K, p-S6, p-4EBP1 の発現が上昇し、mTORC1 経路が活性化した。さらに、HuCCT-1 と TFK-1 に対して、shRNA を用いて Myc を抑制した結果、p-TSC2 や mTORC1 経路の下流因子の発現が低下した。これらの結果から、Notch は Myc による TSC2 のリン酸化を介して mTORC1 を活性化させていると考えられた。 以上より、胆管・胆嚢上皮において Kras と Notch シグナルを活性化させると、mTORC1 経路を介して肝外胆管癌が形成されることが明らかになり、Notch シグナルの活性化したヒト肝外胆管癌に対しては、mTOR 阻害剤が新規治療法となる可能性が示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

胆道癌の発癌と進行に Notch シグナルが関わっていると報告されているが、その詳細な役割は不明であった。本研究では、肝外胆管・胆嚢腫瘍形成における Notch シグナルの機能を解明することを目的とした。胆管・胆嚢上皮において Kras 及び Notch シグナルを活性化させた *Hnf1b-CreERT2*; *Kras^{LSL-G12D}*; *Rosa26^{LSL-Notch1C}* (*HKN*) マウスでは、肝外胆管及び胆嚢に malignant potential のある胆道上皮内腫瘍 (BillN) が形成された。*HKN* マウス胆道上皮では mTORC1 経路の遺伝子群の発現が上昇し、活性化を認めた。そのメカニズムとして、Myc を介した TSC2 のリン酸化が重要であることが示された。ヒト肝外胆管癌においても、activated NOTCH1 と p-S6 の発現に有意な正の相関関係を認めた。さらに、Notch シグナルの活性化したヒト胆道癌細胞に mTOR 阻害剤を投与したところ、*in vitro* および *in vivo* で増殖が抑制された。

以上より、胆管・胆嚢上皮において Kras と Notch シグナルを活性化させると、mTORC1 経路を介して肝外胆管癌が形成されることが明らかになり、Notch シグナルの活性化したヒト肝外胆管癌に対しては、mTOR 阻害剤が新規治療法となる可能性が示唆された。

以上の研究は、胆道癌の分子機序の解明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 5 年 12 月 21 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。