

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15291

研究課題名(和文) ヒト肝細胞を用いた肝発癌モデルの開発と、発癌遺伝子変異に依存した治療薬の解明

研究課題名(英文) Development of a liver carcinogenesis model using human hepatocytes and searching suitable anti-cancer drugs considering mutated genes.

研究代表者

疋田 隼人 (Hayato, Hikita)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20623044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：TK-NOGマウスに肝障害を誘導後に脾臓より経門脈的にヒト肝細胞を投与するとヒト肝細胞キメラマウスが作製でき、ヒト肝細胞由来の腫瘍は生じない。しかし特殊な条件下で培養したヒト肝細胞を投与すると一部に腫瘍化を認めた。腫瘍はHLA陽性で、ヒト肝細胞由来であった。ヒト肝細胞癌に組織像も似ており、この腫瘍部と培養前のヒト細胞、投与直前のヒト肝細胞のエクソームシーケンスを行い比較した。その結果、ヒト腫瘍部でNRasにミスセンス変異(Q61L)を認めた。この変異は様々ながんで最も高頻度に生じるNRas活性化型変異である。投与したヒト肝細胞のNRas変異が腫瘍化の原因の1つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Humanized chimeric mice can be prepared by introducing primary human hepatocytes into the TK-NOG mice from the spleen via the portal vein after inducing hepatic injury, and tumors derived from human primary hepatocytes do not occur. However, when human hepatocytes cultured under the special condition were transplanted, tumors were observed in part. The tumors were derived from human hepatocytes because they were positive for HLA. The histology of the tumors was similar to that of human hepatocellular carcinoma. We compared the tumors with human cell before culturing and human hepatocytes just before administration by exome sequence. As a result, the missense mutation (Q61L) was observed in NRas in the tumors. This mutation is the most commonly occurring NRas activating mutation in various cancers. NRas mutation in human hepatocytes administered was considered to be one of the causes of tumorigenesis.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

近年の次世代シーケンサーによる肝細胞癌の遺伝子解析により、肝細胞癌では p53、カテニンなどの遺伝子変異が高率であることが解明されてきた (Guichard C, et al. Nat Genet. 2012.)。しかしこれらの変異は肝発癌に関与しているのかは不明である。マウスを用いて肝細胞特異的に p53 を欠損させると肝発癌を誘導すると報告されていることから (Katz SF, et al. Gastroenterology 2012) p53 変異は肝発癌に関与することは想定されるが、種差を超えたヒトの肝細胞で、p53 変異により肝発癌が誘導されるかは未だ明らかではない。また、いずれの変異もない肝細胞癌も半数ほど存在し、発癌誘導遺伝子の候補は他にも存在すると考えられる。一方で、肝細胞癌に対して、有意に生存率を延長させる分子標的治療薬としてはソラフェニブしか臨床応用されていないのが現状である。しかし臨床試験で肝細胞癌患者の生存率向上を示せなかった他の分子標的薬も症例によっては強い効果を示し、効果の差が発癌原因遺伝子に起因している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

申請者はすでに、肝切除検体から初代培養肝細胞を単離し、ガンシクロビルで肝障害を持続的に誘導された免疫不全マウス (TK-NOG マウス) に投与することで、ヒト肝細胞キメラマウスを作成する技術を習得している。そこで本研究課題では、移植するヒト培養肝細胞を修飾することで、ヒト肝細胞癌の形成を検討する。形成された肝細胞癌の全ゲノム解析を、次世代シーケンサーを用いて行って遺伝子変異を特定することで、肝細胞癌を誘導する癌遺伝子変異を同定する。発癌原因遺伝子変異の違いに起因する分子標的薬の効果の差を検討できる新規ヒト肝発がんモデルマウスの開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

8 週齢の TK-NOG マウス (NOD.Cg-Prkdc scidIl2rg tm1Sug Tg (Alb-UL23) 7-2/ShiJic) にガンシクロビル (6mg/kg) を腹腔内投与し、肝障害を誘導した後に脾臓より経門脈的に初代培養ヒト肝細胞を投与することでヒト肝細胞キメラマウスの作成に成功した。この方法で作成したヒト肝細胞キメラマウスからは移植した初代培養ヒト肝細胞由来の腫瘍化は認めなかった。同様に、TK-NOG マウスにガンシクロビルで肝障害を誘導した後に脾臓より経門脈的に、

特殊な条件下で培養したヒト肝細胞を投与すると、ヒト肝細胞キメラマウスが作成できたが、一部に移植したヒト肝細胞由来の腫瘍化を認めた。この腫瘍部と培養前のヒト細胞、投与直前の初代培養ヒト肝細胞のエクソームシーケンスを行い比較検討した。シーケンスサイブラリー作製については Agilent XT-Auto System (アジレント・テクノロジー社) を用いた。シーケンス解析については条件として解析塩基長は 100、手法はペアエンド法を用いた。クラスター形成は cBot を使い、シーケンス解析は HiSeq2500 を使用した。体細胞変異解析についてはエクソームシーケンス結果を Trimmomatic でリードクリーニングを行い、BWA-MEM でマッピングを行なった上で解析を行なった。

4. 研究成果

8 週齢の TK-NOG マウスにガンシクロビルを腹腔内投与し、肝障害を誘導した後に脾臓より経門脈的に初代培養ヒト肝細胞を投与することでヒト肝細胞キメラマウスの作成に成功した。この方法で作成したヒト肝細胞キメラマウスからは移植した初代培養ヒト肝細胞由来の腫瘍化は認めなかった。同様に、TK-NOG マウスにガンシクロビルで肝障害を誘導した後に脾臓より経門脈的に、特殊な条件下で培養したヒト肝細胞を投与すると、ヒト肝細胞キメラマウスが作成できたが、一部に移植したヒト肝細胞由来の腫瘍化を認めた。生じた腫瘍について免疫染色を行うと腫瘍は HLA 陽性であり、腫瘍はマウス肝細胞由来の肝臓癌ではなく、移植したヒト肝細胞由来であることが解明された。肉眼像、組織像はヒト肝細胞癌に肉眼像、組織像共に酷似しており、生じた腫瘍は、ヒト胆管癌やヒト肝芽腫でなくヒト肝細胞癌と考えられた。ヒトの肝細胞で肝発癌をきたす発癌誘導遺伝子の検討のため、この腫瘍部と培養前のヒト細胞、投与直前の初代培養ヒト肝細胞のエクソームシーケンスを行い、体細胞変異解析を行った。体細胞変異解析に際して行ったマッピングは 99.5-99.97% と良好なマッピング

率であった。その結果、ヒト腫瘍部において認める塩基置換パターンは C>T/G>A が他の塩基置換パターンに比べて多く、圧倒的に多数を占めていた。この塩基置換パターンは、乳癌、肺癌、胃癌、結腸・直腸癌、神経膠腫、皮膚癌といったあらゆる臓器の癌においても圧倒的に多数を占める塩基置換パターンであると報告されている。また変異影響についてはナンセンス変異、スプライシング変異、フレームシフト変異はごく少数であり、サイレント変異、ミスセンス変異が多数を占めた。また腫瘍部に生じた遺伝子変異の中で発癌遺伝子に着目すると、ナンセンス変異、スプライシング変異、フレームシフト変異では発癌遺伝子に変異を認めなかった。一方で今回生じた腫瘍のミスセンス変異は発癌遺伝子に多く認め、特筆すべきは NRas にミスセンス変異 (Q61L) を認めた。このミスセンス変異は皮膚癌や大腸癌で多く報告されている最も高頻度に生じる NRas 活性化型変異である。培養前のヒト細胞には認めず、投与直前の初代培養ヒト肝細胞において認められていた。そのため腫瘍化の原因として、投与したヒト肝細胞の NRas 活性化型変異が原因の 1 つではないかと考えられた。CRISPR/Cas9 システムを用いると簡便にゲノム編集を行うことができるが、当研究室ではこの手法を用いて p53 欠損肝細胞の作製に成功している。CRISPR/Cas9 システムは過剰発現についても可能である。今後、NRas 過剰発現初代培養ヒト肝細胞を作製し、TK-NOG マウスにガンシクロビルで肝障害を誘導した後に脾臓より経門脈的に投与することで、ヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝発癌モデルマウスの作製を目指していきたい。またヒト肝細胞キメラマウスにトランスポゾンを用いたハイドロダイナミックインジェクション法での遺伝子導入やレンチウイルスベクター、アデ

ノ関連ウイルスベクターでのウイルス感染による遺伝子導入を用いて、より簡便なヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝発癌モデルマウスの作製を目指していきたい。また肝細胞癌は複数の遺伝子変異の結果、発癌することが多いと報告されている。NRas ミスセンス変異以外の発癌を誘導する遺伝子変異を同様の方法や CRISPR ライブラリーを導入した初代培養ヒト肝細胞癌を TK-NOG マウスに移植し、生じた腫瘍に対して次世代シーケンサーを用いて、エクソームシーケンス解析を行うことにより検索・同定し、NRas 活性化型変異と同時に遺伝子導入することにより、より簡便で短期間で作製できるヒト肝細胞キメラマウスでのヒト肝発癌モデルマウスの作製を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

2015 年 5 月 18 日-20 日 第 63 回日本実験動物学会総会 川崎
ミニシンポジウム ヒト型臓器モデルによる医学/創薬研究の新展開 「肝細胞キメラマウスを用いたウイルス肝炎の創薬研究」 5 月 18 日 疋田隼人、竹原徹郎

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

疋田 隼人 (Hayato Hikita)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20623044

(2)研究分担者

巽 智秀 (Tatsumi Tomohide)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20397699

(3)研究協力者

村井一裕 (Kazuhiro Murai)
大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生