

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06904

研究課題名(和文)混合型肝癌の発生機序の究明-肝前駆細胞の増殖のみに依存したマウス肝切除後の肝再生

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis of mixed-type hepatic cancer; hepatic-progenitor-cell-dependent liver regeneration induced by hepatectomy in transgenic mice

研究代表者

佐々木 直也 (Sasaki, Naoya)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70783249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：原発性肝癌は主に肝細胞癌と胆管細胞癌に大分されるが、肝細胞癌と胆管細胞癌両者の性質を併せ持つ混合型肝癌は予後が不良である。正常肝組織の肝細胞と胆管細胞は肝前駆細胞から発生することから、混合型肝癌は肝前駆細胞が癌化したものであるとの仮説を立てた。この仮説を実証するために、肝前駆細胞が過度に自己増殖を行う遺伝子改変マウスを作成した。成体マウスの肝臓は、大量肝切除後には成熟肝細胞および肝前駆細胞の両者が増殖して失われた肝組織を再生するが、この遺伝子改変マウスは成熟肝細胞の自己増殖が阻害されている。現在このマウスを用いて、肝切除時の肝再生様式の解析を行っているところである。

研究成果の概要(英文)：Primary hepatic cancer mainly consists of hepatocellular carcinoma and bile duct carcinoma. Rarely mixed-type hepatic cancer has both of these pathological characteristics, and it is known as poor-prognosis hepatic cancer. In normal liver, hepatic cells and bile duct cells are derived from hepatic progenitor cells. We hypothesized that the mixed-type hepatic cancer is originated from hepatic progenitor cells. To substantiate the hypothesis, we successfully generated transgenic mice in which hepatic progenitor cells highly proliferate. After massive hepatectomy in normal adult mouse, both mature hepatocytes and progenitor cells proliferate to compensate the hepatic volume loss. But in our transgenic mice, proliferation of the mature hepatocytes is suppressed, thus only the progenitor cells proliferate after hepatectomy. Now we are analyzing the hepatic regeneration pattern in the transgenic mice.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌幹細胞 肝癌 肝再生 発癌 遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

原発性肝癌は主に肝細胞癌と胆管細胞癌の二種類に大分され、それぞれ肝細胞あるいは胆管細胞由来の悪性腫瘍と考えられている。肝細胞癌は一般にアルコール性肝障害や脂肪性肝障害(NASH/NAFLD)等の慢性炎症、あるいはウイルス性肝炎を発生母地とすることが多い。一方、稀に混合腫瘍や同時性異所性に二種類の癌を併発する症例や、病理学的に胆管細胞マーカーであるCK19を発現する肝細胞癌あるいは、逆に肝細胞癌マーカーであるAFPを発現する胆管細胞癌も存在し、いずれも予後不良である。これらの腫瘍は、成熟肝細胞及び胆管細胞に分化する前の肝前駆細胞に由来するもの、あるいは成熟肝細胞あるいは胆管細胞由来の癌が逆分化してできたものと仮定されるが、これを証明するのは困難である。本研究で混合型肝癌の発生機序を解明することで、肝癌治療の選択肢が広がることが期待される。

一方、筆者はこれまでRING型ユビキチンリガーゼの一つである、Cullin 4-Ring-ubiquitin Ligase (CRL4)複合体について研究してきた。このCRL4複合体はリンカータンパクDamaged-DNA binding protein 1(DDB1)と、WD40リピート構造を持つ約100種類超のDDB1結合タンパク(DWD protein)を内蔵する。CRL4-DDB1複合体は異なるDWD40タンパクをレセプターとして採用することで、数多くのユビキチン化基質に対応し、DNA修復、幹細胞の分化成熟に重要な役割を果たしていると考えられ

ている。

上記のようにDDB1タンパクはCullin 4を土台としたユビキチン化酵素と、DWDレセプタータンパクをつなぐ重要なパーツであるが、in vivoでの機能は未だ解明されていない。Ddb1遺伝子をノックアウトしたマウスは胎児致死性であり、おそらく受精から胎生早期に致死性のイベントが起きると考えられる。DDB1の機能解析のため様々な臓器特異的ノックアウトマウスが作られており、特に脳前駆細胞(Nestin-Cre)や卵母細胞(Gdf9-Cre)で、神経前駆細胞及び卵母細胞の分化成熟が阻害され、その過程でp53の活性化によるアポトーシスが関与していることが報告されている。同様に肝成熟細胞特異的なDDB1ノックアウトマウス(Albumin-Cre)についての報告もあり、野生型と同様に成長するが生後約1.5年で肝腫瘍を形成するというものであった。このマウスの肝臓では一部にDDB1陽性の肝組織が存在し、また肝腫瘍もDDB1陽性であると報告されており、彼らは何らかの理由でノックアウトされない肝細胞が出現し、これらが癌化すると考察している。

In vivoにおける肝再生実験は、肝臓中の成熟肝細胞及び肝前駆細胞のいずれもが自己増殖能を持つため解析が困難であった。本実験では、成熟肝細胞の自己増殖が阻害された遺伝子改変マウスを用い、肝切除後の肝細胞供給源がアルブミン未発現の肝前駆細胞のみという条件下で肝再生を解析することができる。このマウス(Ddb1^{lox/lox}; Alb-Cre)では肝腫瘍が自然発生するこ

とが報告されているが、そのメカニズム、腫瘍の発生由来や病理学的性質については検証がなされていない。本研究は生化学的アプローチで解明されなかった CRL4-Ddb1 ユビキチンリガーゼ複合体の機能と肝腫瘍発生メカニズムを、肝部分切除という外科学的な介入を加えて、肝再生を促進させることにより究明するものである。

2. 研究の目的

本研究では、成熟肝細胞の増殖が阻害された遺伝子改変マウスを用い、幼若な肝前駆細胞の自己増殖及び分化のみに依存した肝切除後の肝再生を検証する。またこのマウスは肝腫瘍を形成することが報告されているが、この肝腫瘍は、過度の細胞分裂回数を経た肝前駆細胞が癌化したものという仮説を立てた。この仮説が正しければ、肝部分切除により肝前駆細胞の分裂が促進され、癌化する機会が多くなると予想される。また肝前駆細胞由来の肝癌は、肝細胞および胆管細胞両方の性質を持つ混合型肝癌であると考えられる。

この遺伝子改変マウスの肝部分切除によって促進される肝再生、腫瘍形成及び、肝腫瘍の病理学的性質について検証することで、混合型肝癌の発生機序を明らかにすることができる考えた。

3. 研究の方法

成熟肝細胞特異的 Ddb1 ノックアウトマウスの入手

成熟肝細胞特異的 Ddb1 ノックアウトマウスでの肝切除による肝再生誘導実験

肝切除後の肝再生様式の評価

肝切除後の腫瘍形成能及び生存期

間の観察・解析

肝腫瘍の病理組織的解析

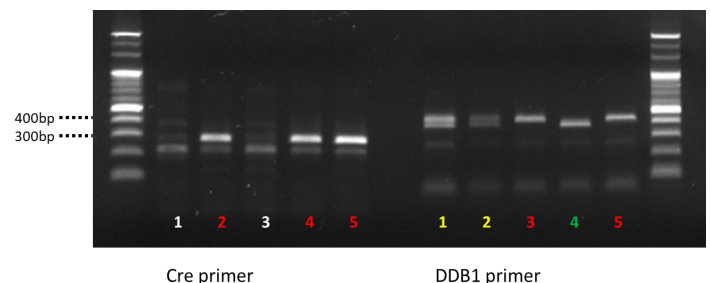
4. 研究成果

成熟肝細胞特異的 Ddb1 ノックアウトマウスの入手

研究代表者前職のノースカロライナ大学チャペルヒル校、Xiong ラボと MTA を締結し、実験用マウスを入手した。2017/3/2 に京都大学動物実験施設に無事搬入された。6 月に SPF 化したマウスを入手できた。マウスを繁殖し、肝特異的 Ddb1 ノックアウトマウス (DDB1 flox/flox; Alb-Cre) とそのコントロール (DDB1 flox/flox) の系統を樹立した。

ゲノム PCR で loxP 遺伝子で挟まれた Ddb1 遺伝子と Cre リコンビナーゼ遺伝子を確認することができた (図 1)。このマウスは少なくとも生後 6 ヶ月は野生型と比べ、見た目の表現型や発育に差はなく、外見上区別することはできないが、ノックアウトマウスではアルブミンを産生する肝細胞で Ddb1 遺伝子が Cre リコンビナーゼにより切除されるため、DDB1 蛋白を合成することができない。

現在これらの 2 系統のマウスの繁殖、長期飼育実験、表現型解析実験、肝切除の予備実験を行っている。



(図 1) 遺伝子改変マウスの遺伝子型解析
Lane 5 が DDB1 flox/flox; Alb-Cre

予定していた肝特異的 Ddb1 ノックアウトマウス(DDB1 flox/flox; Alb-Cre, lane #5) とコントロール (DDB1 flox/flox, lane #3)を樹立することができた。

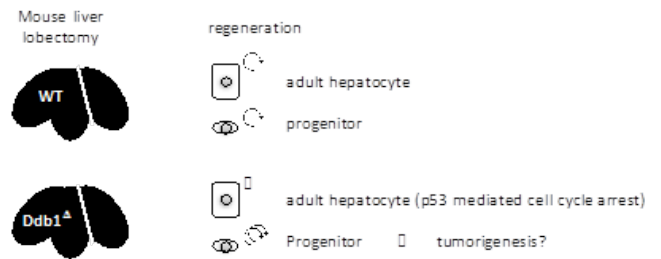
哺乳類での実験では遺伝子ノックアウトが何らかの理由で不十分であることが多々あるため、本実験用により強力なノックアウトマウスの系統を樹立している。これは前述の Xiong ラボから頂いた、Ddb1 遺伝子の機能に必要な部分を削除したもの(Ddb1 Δ)であるが、Ddb1 遺伝子は生存に必須のものなのでこのマウスはヘテロのものしか誕生しない。Ddb1 flox と Δ のヘテロマウスは Ddb1 遺伝子を1アレルしか持たないためノックアウトのもれを減らすことができると思われる。

一方 Cre 遺伝子のホモのマウスは誕生する確率が低く、また誕生しても体が小さく弱いことがこれまでに観察されており、Cre リコンビナーゼそのものに毒性があることが予測された。そのため Cre リコンビナーゼの影響も考慮した実験を行うために本実験は肝特異的 Ddb1 ノックアウトマウス (DDB1 flox/ Δ ; Alb-Cre)とコントロール2系統 (DDB1 flox/wt; Alb-Cre と DDB1 flox/ Δ) のマウスを用いる。

成熟肝細胞特異的 Ddb1 ノックアウトマウスでの肝切除による肝再生誘導実験

マウスの部分切除は技術的には、系統的肝切除によって容積として 10-90%の切除が可能である。Ddb1 ノックアウトマウスでは成熟肝細胞は増殖しないため、野生型マウスと比べて耐術能が低い

と考えられる (図 2)。



(図 2) 肝切除実験の模式図。

肝特異的 Ddb1 ノックアウトマウス (図下) は肝切除後の肝再生が肝前駆細胞のみに依存すると予測した。

予備実験として数匹の成熟肝細胞特異的 Ddb1 ノックアウトマウスを用い、安全に術後生存が得られる最大肝切除容量を決定すべく、30-70%肝部分切除を行い周術期の安全性を確認する。

手術は全身麻酔で行う。動物実験は必要最小頭数のマウスを用い、全て「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に基づいて行う。

現在野生型マウスで肝切除予備実験を施行中である。50%肝切除まではほぼ安全に行うことができた。

肝切除後の肝再生様式の評価。
肝特異的 Ddb1 ノックアウトマウスと対照群 (同腹の Ddb1flox/flox マウス) との比較を行う。肝切除後 1-4 週間後にマウスを犠死させ、肝臓を摘出する。標本は適宜切り分け、病理組織学的解析用(ホルマリン固定および凍結切片用に埋包・凍結)、タンパク解析用(凍結)

遺伝子解析用(凍結)に保存する。
成熟肝細胞特異的 Ddb1 ノックアウトマウスまたは対照群マウスの切除肝及び残肝標本の免疫染色(Ddb1, Alb, AFP,

CK19, Ki67, gamma-H2A.X 等、TUNEL 染色、Sirius Red 染色)により肝再生能、細胞損傷を評価する。上記の抗体、特殊染色については使用経験があり、鋭敏かつ特異的に染色できることを確認済みである。

現在、ウエスタンブロットおよび免疫染色の至適条件の評価中であり、肝特異的 Ddb1 ノックアウトマウスの頭数がそろい次第、比較実験を開始する予定である。

④ 肝切除後の腫瘍形成能及び生存期間の観察・解析。

肝切除後、長期(1年以上)の再性能、生存期間、腫瘍形成の有無について、生存期間観察あるいは定時的(生後 9, 12, 15 か月目)に犠死させて肝の病理組織的評価を行う。文献的には生後 2 年以内に約 70%のマウスが肝腫瘍により死亡するとされている。

当実験には長い観察期間が必要なため、同腹でオスのノックアウトおよび対照マウスは優先してこの実験に割り振っている。

肝腫瘍の病理組織的解析。

肝腫瘍が認められた場合、腫瘍の病理組織学的解析を原発性肝癌取扱い規約(第 6 版)に基づいて行う。成熟肝細胞特異的 Ddb1 ノックアウトマウスでは増殖能を持つのは肝前駆細胞のみなので、これが癌化した場合は肝細胞癌、胆管細胞癌あるいは混合腫瘍のいずれも発生する可能性がある。しかし Alb 産生細胞は Ddb1 遺伝子が削除され、増殖能を失わずなので、Alb を産生する高～中分化型肝細胞癌が増大する可能性は低いと予測される。

この実験は④に付随して行うため、データは得られていない。

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)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐々木 直也 (SASAKI, Naoya)

京都大学肝胆膵移植外科学教室

客員研究員

研究者番号 : 70783249