

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09452

研究課題名(和文)胆管癌進展過程に酸化ストレス応答機構が果たす役割の解析

研究課題名(英文)Role of oxidative stress response in cholangiocarcinoma

研究代表者

濱田 晋(Hamada, Shin)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20451560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： Alb-CreマウスとLSL-Kras G12Dマウス、LSL-p53 R172Hマウスの交配により胆管特異的に変異Kras、変異p53を発現するマウス(AKPマウス)を作成した。更にKeap1 flox/floxバックグラウンドを追加することで胆管特異的にKeap1を欠損させ、恒常的にNrf2が活性化するAKP::Keap1マウスを作成して胆管癌を生じる頻度の差を検討した。

Keap1欠損は恒常的なNrf2の活性化を介して胆管発癌を促進することが明らかとなり、Nrf2標的遺伝子の発現増加が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、酸化ストレス応答機構の活性化は胆管発癌を促進することが明らかになった。ヒト胆管癌組織においてもKeap1欠損とNrf2標的分子の発現増加が併存する一群がみられ、胆管癌発癌過程への寄与が考えられる結果であった。

胆管癌の進展に寄与する分子機構は新たな治療標的となる可能性があり、Nrf2阻害による胆管癌治療の可能性を示唆する結果が得られたものと思われる。

研究成果の概要(英文)： We crossed Alb-Cre mouse, LSL-Kras G12D mouse and LSL-p53 R172H mouse to generate mutant Kras/p53 expressing mouse. We further introduced Keap1 floxed background into this mouse, leading to the constitutive activation of Nrf2. As a result, addition of Keap1 deletion promoted cholangiocarcinoma development, with increased expression of Nrf2 target genes.

研究分野：消化器内科

キーワード：胆管癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

検診の普及・画像診断技術の向上や発癌因子を除去する治療法の確立・化学療法・放射線療法といった補助治療の進歩により、多くの癌では5年生存率の改善がみられている。しかし、膵癌と同様に胆管癌の予後は世界的に不良なままであり、20%に満たない(CA CANCER J CLIN. 2016)。根治的治療は完全な外科的切除に限られており、化学療法や放射線療法の効果は限定的である。

胆管癌の予後改善のためには、詳細な発癌メカニズムや既存治療に対する耐性獲得機序の解明が鍵となる。癌細胞が抗癌剤や放射線に対して抵抗性を獲得するメカニズムについては、これまで多くの研究が行われてきた。我々がこれまで検討した例では、膵癌細胞において転移・浸潤に寄与するホメオボックス遺伝子、MSX2 が薬剤トランスポーターの一種である ABCG2 発現誘導を介してゲムシタピン耐性獲得に寄与していることを報告している(J Cell Physiol. 2012)。しかし、胆管癌については Akt 経路や ERK 経路の活性化が抗癌剤耐性獲得に寄与するとの報告がみられるものの(Biochem Biophys Res Commun. 2011)、膵癌に比べるとその検討数は少数にとどまっている。更なる発癌過程および耐性機序解明のためには、ヒト検体の解析だけでなく発癌過程を経時的に解析でき、発現遺伝子の改変による介入が可能な動物モデルの利用が不可欠であると考えられる。

近年、胆管癌のモデルマウスがいくつか報告されている。Albumin promoter 下に Cre recombinase を発現するマウスを利用して conditional に変異 Kras を発現し、p53 発現を欠損したマウスではヒトと類似した組織型を示す胆管細胞癌が発生する(Cancer Res. 2012)。同様に、胆管特異的な変異 Kras 発現に PTEN 欠損を付加したモデルでも胆管細胞癌が発生すると報告されている(Sci Rep. 2016)。以上の知見は Kras 変異をベースとした胆管発癌モデルの普遍性を示唆するものであり、動物モデルを用いて発癌過程や治療耐性獲得メカニズムが解析できればその効果は大きい。

細胞には様々な環境の変化へ適応するための機構が備わっている。細胞内の活性酸素種(ROS)の消去に関わるグルタチオン合成酵素や毒性物質の代謝に関わるグルクロン酸転移酵素の発現を制御する転写因子、Nrf2 はアダプター蛋白の Keap1 によりプロテオソームでの分解が促進されている。酸化ストレスの増加により Keap1 の高次構造が変化することで Nrf2 は分解を免れ、核内に移行して遺伝子発現を促進する。本機構は癌細胞でも活性化していることが明らかになっており、抗癌剤耐性や細胞増殖、代謝リプログラミングによって癌進展に寄与している(Free Radic Biol Med. 2015)。癌細胞の治療抵抗性を克服するためには Keap1-Nrf2 経路が有望な治療標的と目されており、検討が続けられている。

胆管癌のリスク因子として原発性硬化性胆管炎や寄生虫感染、有機溶剤への暴露が知られており、慢性的なストレスは胆管発癌を促進すると考えられる。ゆえに、ストレス応答や解毒に際して中心的な役割を果たす Keap1-Nrf2 経路は、胆管癌の発癌過程で重要な役割を担っている可能性がある。胆管細胞癌患者血清中での reactive oxygen metabolites が高い症例では予後が不良であることや(Free Radic Res. 2016)、不死化胆管細胞株を用いて酸化ストレス耐性株を樹立したところ細胞増殖能が亢進していることが判明していることから(Biochem Biophys Res Commun. 2015)、酸化ストレス応答機構の活性化は胆管癌発癌・耐性獲得に寄与すると推測される。

以上の状況を鑑み、胆管癌モデルマウスを用いて胆管発癌過程への Keap1-Nrf2 経路の関与を明らかにし、同経路への依存性によるサブグループ解析から治療耐性獲得機序の解明につなげることで、予後の改善が得られていない胆管癌に対する新規治療開発のブレイクスルーとする研究計画を着想した。

2. 研究の目的

本研究計画はモデルマウスを用いて胆管癌進展過程への Keap1-Nrf2 経路の関与を検討し、癌進展のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

既報にて胆管特異的に変異 Kras を発現し p53 を欠損するマウスにおいて胆管癌が生じることが明らかになっているため、Alb-Cre マウスと LSL-Kras G12D マウス、LSL-p53 R172H マウスの交配により胆管特異的に変異 Kras、変異 p53 を発現するマウス(AKP マウス)を作成した。更に Keap1 flox/flox バックグラウンドを追加することで胆管特異的に Keap1 を欠損させ、恒常的に Nrf2 が活性化する AKP::Keap1 マウスを作成して胆管癌を生じる頻度の差を検討した。

4. 研究成果

(1) Keap1 欠損付加による胆管発癌の促進

胆管特異的に変異 K-ras および p53 を発現する肝内胆管癌モデルマウス(AKP マウス)へ Keap1 flox/flox バックグラウンドを導入し、恒常的に Nrf2 の活性化が起こるモデルマウス(AKP::Keap1 マウス)の解析を実施した。本マウスでは野生型バックグラウンドのモデルマウスと比較して細胆管の著明な増加がみられ、一部のマウスでは生後 90 日以内に肺転移や腹膜播種を伴う進行胆管癌を生じた。対照的に、Nrf2 欠損バックグラウンドを導入したマウス(AKP-N マウス)では前癌病変の形成がみられなかった。以上の結果から、胆管癌進展過程において Nrf2

活性化は癌進展を促進するものと考えられた。

(2) AKP::Keap1 マウスにおける遺伝子発現プロファイルの変化

AKP マウスおよび AKP::Keap1 マウス肝組織から RNA を抽出してマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを比較したところ、AKP-K マウスではグルタチオン-S-トランスフェラーゼや ABC トランスポーターといった典型的な Nrf2 標的遺伝子の発現が有意に増加していた。これらの遺伝子に加え、胆管細胞の分化に関わる複数の分子やサイトケラチンの発現変化がみられ、細胆管の増生や発現過程への関与が考えられた。

(3) ヒト胆管癌組織における検証

マウスモデルにおいて Keap1 欠損による胆管発癌促進効果を認めたことから、ヒト胆管癌組織でも同様の変化がみられるかを検証した。免疫染色を用いてヒト胆管癌組織の KEAP1 発現・NRF2 標的遺伝子である NQO1 発現を評価した結果、一定の症例で KEAP1 発現と NQO1 発現が相互排他的であることを見出した。以上の結果はヒト胆管癌の発癌過程においても、KEAP1 発現の喪失が恒常的な NRF2 活性化につながる可能性を示唆している。

(4) AKP::Keap1 マウスへの Nrf2 欠損付加による表現型への影響

AKP::Keap1 マウスへ Nrf2 欠損バックグラウンドを追加して発癌促進効果の Nrf2 依存性を検証した。その結果、Nrf2 欠損の付加により細胆管の増生はほぼ認められなくなることが確認され、本モデルにおける発癌促進効果は Nrf2 依存的であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Nabeshima Tatsuhide, Hamada Shin, Taguchi Keiko, Tanaka Yu, Matsumoto Ryotaro, Yamamoto Masayuki, Masamune Atsushi | 4. 巻 318 |
| 2. 論文標題 Keap1 deletion accelerates mutant K-ras/p53-driven cholangiocarcinoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology | 6. 最初と最後の頁 G419 ~ G427 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00296.2019 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Masamune A, Hamada S, Yoshida N, Nabeshima T, Shimosegawa T. | 4. 巻 63 |
| 2. 論文標題 Pyruvate Kinase Isozyme M2 Plays a Critical Role in the Interactions Between Pancreatic Stellate Cells and Cancer Cells. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Dig Dis Sci. | 6. 最初と最後の頁 1868-1877 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-018-5051-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hamada Shin, Shimosegawa Tooru, Taguchi Keiko, Nabeshima Tatsuhide, Yamamoto Masayuki, Masamune Atsushi | 4. 巻 314 |
| 2. 論文標題 Simultaneous K-ras activation and Keap1 deletion cause atrophy of pancreatic parenchyma | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology | 6. 最初と最後の頁 G65 ~ G74 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00228.2017 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Hamada Shin, Taguchi Keiko, Masamune Atsushi, Yamamoto Masayuki, Shimosegawa Tooru | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 Nrf2 promotes mutant K-ras/p53-driven pancreatic carcinogenesis | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Carcinogenesis | 6. 最初と最後の頁 661 ~ 670 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgx043 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hamada S, Masamune A, Shimosegawa T. |
| 2. 発表標題 Halofuginone, a novel Nrf2 inhibitor, shows synergistic effect with gemcitabine in pancreatic cancer. |
| 3. 学会等名 DDW2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hamada S, Masamune A, Taguchi K, Yamamoto M, Shimosegawa T. |
| 2. 発表標題 Simultaneous activation of K-ras and NRF2 induce pancreatic atrophy. |
| 3. 学会等名 DDW2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 正宗 淳 (Masamune Atsushi) (90312579) | 東北大学・医学系研究科・教授 (11301) | |