

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07968

研究課題名(和文) 脂肪肝が肝内胆管発癌に及ぼす影響：新規マウスモデル樹立と発癌機序解明

研究課題名(英文) Establishment of new mouse models for investigating the effect of fatty liver on intrahepatic bile duct cancer development

研究代表者

白上 洋平 (Shirakami, Yohei)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50632816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで確立されていなかった肝内胆管癌の新規動物モデル樹立を目指した研究を行った。肥満を呈するdb/dbマウスに大腸発癌剤azoxymethaneを投与したところ、肝臓において肥満に起因する脂肪肝のほかに、細胆管の増殖性変化および異形成、胆管細胞癌の所見もみられた。野生型非肥満マウスでは、細胆管の異形成や前癌病変は認められなかった。胆管病変がみられたdb/dbマウスの肝臓では、炎症性サイトカインやIGFシグナル経路に関連する遺伝子発現が上昇しており、肝脂肪化の進展による慢性炎症が、胆管の増殖性変化を促進し肝内胆管癌の発生に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣の変化から肥満人口が増加しているが、肥満の存在によりさまざまながんの発生率が上昇することが知られている。本研究結果は、肥満に伴う肝脂肪化の進展による慢性炎症が、肝内胆管癌の発生に関与することを示唆するとともに、肥満を呈するマウスを用いた肝内胆管癌モデルがヒト胆管癌の病態を反映した新規動物モデルとして有用であり、発癌および進展機序の解明や治療法の開発に寄与する可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to establish a novel animal model for intrahepatic cholangiocarcinoma. The liver of obese db/db mice administered the colorectal carcinogen azoxymethane exhibited obesity-induced fatty liver, proliferative changes and dysplasia of the small bile ducts, as well as cholangiocarcinoma. Gene expressions related to inflammatory cytokines and IGF signaling pathway were elevated in the liver of db/db mice with bile duct lesions, suggesting that chronic inflammation caused by the development of hepatic steatosis promoted proliferative changes in bile ducts and intrahepatic cholangiocarcinoma.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝内胆管癌 脂肪肝 肥満

1. 研究開始当初の背景

原発性肝悪性腫瘍のうち肝細胞癌に次いで2番目に多い肝内胆管癌は、予後不良の疾患である。肝内胆管癌に対する治療として、根治を目的とした肝切除のほか、切除不能例には放射線治療や化学療法が行われているが、十分な効果は見込めない。その要因として、他のがん種に比べて、発癌および進展の機序について分子生物学的な研究が進んでいないことがあげられている。また、それらメカニズムの解明や治療法の開発に有用と考えられる、適切な動物モデルが確立されていないのが現状である。したがって、ヒトの病態を反映した新規動物モデルの確立を目指した研究は重要である。

近年、生活習慣の変化から肥満人口が増加しているが、肥満の存在によりさまざまながんの発生率が上昇することが知られている。肥満を基盤病態とするメタボリック症候群は非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) と深く関連しており、また、NAFLD の一部は慢性的な肝炎を引き起こし、非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) に至る。NASH は更に肝硬変へと進展し肝細胞癌を合併することから、NAFLD/NASH と肝細胞癌の関連性は明らかであり、その研究も進んでいる。一方、脂肪肝と肝内胆管癌の関係については、学会発表はあるものの、詳細に検討した論文報告はみられない。

申請者はこれまで、肥満および脂肪肝を呈する C57BLKS/J-+Leprdb/+Leprdb (*db/db*) マウスに対して、大腸癌誘発剤 azoxymethane (AOM) を投与する大腸発癌モデルを用いた研究を行ってきた。これら実験の中で、肝・腎・脾等の組織所見を解析したところ、肝臓において肥満に起因する脂肪肝のほかに、細胆管の増殖性変化が観察された。その一部では細胆管の異形成がみられ、肝内胆管癌の前癌病変であると考えられた。また、胆管細胞癌の所見も確認された。その後の申請者による予備的実験で、脂肪肝を呈する *db/db* マウスは対照である野生型マウスに比べて、上記胆管病変がより広範で悪性度が高いことが示唆された。以上より、脂肪肝の存在が胆管癌発生を促進する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

これまで、肝内胆管癌マウスモデルとして、thioacetamide (TAA) 投与を30週以上続けるものや、肝細胞特異的に *Kras* 変異と *Pten* 欠損を呈するもの等が報告されている。前者は長期間の管理が必要であり、発生する病変も前癌病変にとどまることが指摘されている。後者は改変遺伝子の複雑な組合せが必要であり、得られる個体数も少なく、汎用性が低いことが想定される。また、Alb-Cre との交配で得られるマウスであり、肝細胞でも遺伝子変異をきたすため、肝細胞癌併発の可能性など、適切な肝内胆管癌モデルとするには課題が残る。

本研究は、新規肝内胆管癌マウスモデルを樹立し、発癌分子メカニズムを解明するとともに、モデルとしての適合性を評価することを目的としている。また、肝内胆管癌の発生、進展に脂肪肝が関与するかどうかについても解析する。さらに、細胞株を用いて胆管癌の治療候補薬探索を目的とした実験も行う。

3. 研究の方法

はじめに、*db/db* マウスにおける AOM 誘発胆管癌の再現性を検証する。対照群として、AOM 非投与 *db/db* マウスのほか野生型マウスに同様の処置を行い比較検討する。また、胆管癌の発癌剤として既報にある TAA を併用することで、病変の早期発生や腫瘤形成、浸潤、転移を来す可能性についても解析する。遺伝子改変マウスを用いた発癌実験も並行して行う。肝細胞特異的にレチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor, RAR) シグナルを阻害したマウスにおいて、肝細胞癌が発生することが報告されており、レチノイドシグナルの阻害が発癌につながる可能性を示している。この遺伝子改変マウスを応用し、CK19-Cre マウスとの交配により、胆管上皮細胞特異的に RAR シグナルが阻害されるマウス (CK19-Cre:RARdn) における胆管発癌の有無を確認する。

上記マウスモデルにおいて、発癌メカニズム解析のため、肝臓における mRNA やタンパク質発現の網羅的解析および免疫組織染色を含む病理組織学的解析を行う。さらに、がんゲノムのデータベース The Cancer Genome Atlas (TCGA) に報告されている FGFR2 等の発現や変異につき、病理組織学的所見と合わせて、ヒト胆管細胞癌との類似点、相違点から発癌モデルとして適切であるか評価を行う。

細胞株の実験ではヒト胆管癌細胞株を用い、阻害薬の登場で注目されている sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) について、タンパク質発現の解析や阻害薬での処理による細胞増殖への影響について解析する。

4. 研究成果

db/db マウスに AOM を投与したところ、予備的実験結果と同様に肝臓において肥満に起因する脂肪肝のほかに、細胆管の増殖性変化および異形成が確認された。異形成は前癌病変と考えられたほか、胆管細胞癌の所見もみられた。対照群として用いた野生型非肥満マウスでは、肝脂肪化

はみられず、肝内に軽度の炎症所見と細胆管の増殖性変化はあるものの、異形成や前癌病変は認められなかった。肝内胆管病変の発生率と面積は *db/db* マウス群で有意に高値であり、また、血清の解析では肝障害と脂質異常、高血糖を認めるとともに、酸化ストレスの指標である dROM が有意に高値であった。さらに、肝組織での mRNA 発現の比較において、*db/db* マウス群で炎症性サイトカインが高値であるほか、insulin-like growth factor (IGF) シグナル経路に関連する *Igf2* の mRNA 発現が有意に亢進していた。これらの実験結果から、肝脂肪化の進展による慢性炎症が、胆管の増殖性変化を促進し肝内胆管癌の発生に寄与する可能性が考えられた。

AOM による肝内胆管病変に対して、TAA の併用が及ぼす影響について解析したところ、AOM 単独投与群に比べて、TAA 併用群では病変数の増加がみられた。また、血清 ALT 値および T-Bil 値が TAA 併用群で有意に高値であったほか、炎症性サイトカインである *Tnfa* および *Il6* の mRNA 発現の解析から、肝における炎症の増悪が示唆された。これらの実験結果からも、肝における慢性炎症が肝内胆管癌の発生に関与することが示唆された。

なお、上記腫瘍性病変は CK19 免疫染色によって胆管由来であることが確認されたほか、腫瘍性病変がみられた肝における *Fgfr2* 遺伝子発現が高値であることが確認され、ヒト肝内胆管癌での報告からもヒトの病態を反映した動物モデルであることが示唆された。

ヒト胆管癌細胞株における SGLT2 のタンパク質発現解析では、HuCCT-1 を含む数種類の細胞株で発現が確認されたが、Huh28 での発現はみられなかった。SGLT2 発現細胞株において、SGLT2 阻害薬トログリフロジンで 48 時間処理したところ、細胞増殖が抑制されており、胆管癌の増殖抑制に対して、SGLT2 阻害薬が有用である可能性が示された。

胆管上皮細胞特異的に RAR シグナルが阻害されるマウス (*CK19-Cre:RARdn*) は、レチノイドの発生および分化への関わりや、CK19 発現細胞の分布から、胎生あるいは新生致死の可能性も考えられていたが、本研究において作出に成功した。しかし、観察期間約 6 ヶ月では、特徴的な表現型および肝組織像の変化は確認されていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Shirakami Y, Iwashita T, Uemura S, Imai H, Murase K, Shimizu M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Micro-RNA Analysis of Pancreatic Cyst Fluid for Diagnosing Malignant Transformation of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm by Comparing Intraductal Papillary Mucinous Adenoma and Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 2249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10112249.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shirakami Y, Nakanishi T, Ozawa N, Ideta T, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Ibuka T, Tanaka T, Shimizu M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Inhibitory effects of a selective prostaglandin E2 receptor antagonist RQ-15986 on inflammation-related colon tumorigenesis in APC-mutant rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0251942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0251942.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomita H, Tanaka K, Hirata A, Okada H, Imai H, Shirakami Y, Ohnishi K, Sugie S, Aoki H, Hatano Y, Noguchi K, Kanayama T, Niwa A, Suzui N, Miyazaki T, Tanaka T, Akiyama H, Shimizu M, Yoshida K, Hara A.	4. 巻 34
2. 論文標題 Inhibition of FGF10-ERK signal activation suppresses intraductal papillary neoplasm of the bile duct and its associated carcinomas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 108772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.108772.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki T, Shirakami Y, Mizutani T, Maruta A, Ideta T, Kubota M, Sakai H, Ibuka T, Genovese S, Fiorito S, Taddeo VA, Epifano F, Tanaka T, Shimizu M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel FXR agonist nelumal A suppresses colitis and inflammation-related colorectal carcinogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79916-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kato J, Maruta A, Shirakami Y, Mizutani T, Ozawa N, Ideta T, Takada J, Kubota M, Sakai H, Ibuka T, Araki H, Shimizu M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Advanced appendiceal goblet cell carcinoids with intestinal obstruction: two case reports.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 1205-1212.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-020-01232-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai H, Miwa T, Ikoma Y, Hanai T, Nakamura N, Imai K, Kitagawa J, Shirakami Y, Kanemura N, Suetsugu A, Takai K, Shiraki M, Shimizu M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of diffuse large B-cell lymphoma after sofosbuvir-ledipasvir treatment for chronic hepatitis C: A case report and literature review.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2020.2071.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato J, Shirakami Y, Mizutani T, Kubota M, Sakai H, Ibuka T, Shimizu M.	4. 巻 21
2. 論文標題 Alpha-Glucosidase Inhibitor Voglibose Suppresses Azoxymethane-Induced Colonic Preneoplastic Lesions in Diabetic and Obese Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21062226.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato J, Shirakami Y, Ohnishi M, Mizutani T, Kubota M, Sakai H, Ibuka T, Tanaka T, Shimizu M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Suppressive effects of the sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on colorectal tumorigenesis in diabetic and obese mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncol Rep.	6. 最初と最後の頁 2797-2805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7357.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maeda T, Sakai H, Ozawa N, Sugiyama T, Takada J, Kubota M, Ibuka T, Shirakami Y, Araki H, Shimizu M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Acute cytomegalovirus infection in an immunocompetent patient with ulcerative colitis: A case report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Ther Med.	6. 最初と最後の頁 2271-2277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.7823.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sueoka E, Watanabe T, Mashima T, Shirakami Y, Komori A, Matsuo K, Yoshikawa HY, Cho KA, Park TJ, Seimiya H, Kim EG, Suganuma M, Chung J.	4. 巻 145
2. 論文標題 Meeting report of the 14th Japan-Korea joint symposium on cancer and aging research: current status of translational research and approaches to precision medicine.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cancer Res Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 1263-1271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-019-02887-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki T, Kato T, Ohnishi R, Yasuda S, Sano K, Shirakami Y, Shimizu M, Murakami N.	4. 巻 6
2. 論文標題 Clinical Characteristics of Nursing- and Healthcare-Associated Tuberculosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diseases.	6. 最初と最後の頁 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diseases6040101.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirakami Y, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Ibuka T, Yoshimi K, Kuramoto T, Tanaka T, Shimizu M, Seishima M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Inhibitory effects of pentoxifylline on inflammation-related tumorigenesis in rat colon.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 33972-33981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26119.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shirakami Y, Shimizu M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Possible Mechanisms of Green Tea and Its Constituents against Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules.	6. 最初と最後の頁 2284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23092284.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Qin XY, Suzuki H, Honda M, Okada H, Kaneko S, Inoue I, Ebisui E, Hashimoto K, Carninci P, Kanki K, Tatsukawa H, Ishibashi N, Masaki T, Matsuura T, Kagechika H, Toriguchi K, Hatano E, Shirakami Y, Shiota G, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S.	4. 巻 115
2. 論文標題 Prevention of hepatocellular carcinoma by targeting MYCN-positive liver cancer stem cells with acyclic retinoid.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 4969-4974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1802279115.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 白上洋平、宮崎恒起、出田貴康、境 浩康、田中卓二、清水雅仁
2. 発表標題 FXR agonist nelumal A による大腸炎および大腸発癌の抑制
3. 学会等名 日本レチノイド研究会 第31回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白上洋平、水谷 拓、小澤範高、出田貴康、久保田全哉、境 浩康、清水雅仁
2. 発表標題 ラット肝硬変モデルにおいて高脂肪食は肝線維化と肝癌発生を促進する
3. 学会等名 第27回日本がん予防学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白上洋平、加藤潤一、水谷 拓、小澤範高、出田貴康、清水雅仁
2. 発表標題 糖尿病治療薬による大腸発癌の抑制
3. 学会等名 第26回日本がん予防学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白上洋平、岩下拓司、清水雅仁
2. 発表標題 ワークショップ3「消化器疾患のバイオマーカー研究」 膵嚢胞液中のマイクロRNA解析によるIPMNの悪性化診断
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白上洋平、清水雅仁、清島 満
2. 発表標題 ラット肝硬変モデルにおいて高脂肪食は肝線維化と肝癌発生を促進する
3. 学会等名 JDDW2018 (第22回日本肝臓学会大会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白上洋平、加藤潤一、水谷 拓、河内隆宏、境 浩康、富田弘之、田中卓二、清水雅仁
2. 発表標題 Effects of fatty liver on development of intrahepatic cholangiocarcinoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白上洋平、境 浩康、清水雅仁
2. 発表標題 ミニシンポジウム「核内受容体とそのリガンドの化学・生物学・医学」 核内受容体とそのリガンドの医学
3. 学会等名 第29回日本レチノイド研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白上洋平、小原功輝、出田貴康、河内隆宏、久保田全哉、境 浩康、清水雅仁
2. 発表標題 糖尿病治療薬が肥満に関連する肝疾患に及ぼす影響
3. 学会等名 第5回肝臓と糖尿病代謝研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白上洋平、河内隆宏、久保田全哉、田中卓二、清水雅仁
2. 発表標題 糖尿病治療薬による肥満に関連する肝発癌の抑制
3. 学会等名 第25回日本がん予防学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shirakami Y, Kato J, Mizutani T, Kochi T, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M
2. 発表標題 Anti-diabetic Agents for Cancer Prevention
3. 学会等名 The 14th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shirakami Y, Ideta T, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M, Seishima M
2. 発表標題 Non-alcoholic steatohepatitis-related hepatocarcinogenesis is suppressed in mice lacking hepatic retinoid storage
3. 学会等名 Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shirakami Y, Obara K, Kubota M, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M, Seishima M
2. 発表標題 Effects of the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor tofogliflozin on hepatoma cell lines and liver tumorigenesis.
3. 学会等名 109th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------