

令和 3 年 5 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07994

研究課題名(和文) 新規遺伝子改変マウスモデルを用いた混合型肝癌の起源細胞・発生機序解明

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanisms and cellular origins of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma using hepatocellular carcinoma-specific gene recombination system in mice

研究代表者

内野 康志 (Uchino, Koji)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：00748725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：3週齢のAxin2-CreERTマウスにタモキシフェンを投与することで、肝細胞全体のうち肝静脈側約1/3、すなわちzone3をgenetic labelできる方法を確認した。5つの肝癌マウスモデルを用いて細胞系譜解析を行った結果、zone3は発癌ポテンシャルが高い細胞集団を多く含んでいる可能性が示唆された。しかし病態によって肝再生様式が大きく変化し、結果としてzone1や2からの発癌が促進される場合があることも明らかとなった。また肝癌細胞特異的遺伝子改変誘導を目的として、AFP-CreERTマウスの樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、zone3肝細胞をgenetic labelingすることによって、肝細胞癌がどのzoneからできやすいのかを明らかにするという、全く新しい視点から行われた研究である。本研究結果から、zone3は発癌ポテンシャルが高い細胞集団を多く含んでいる可能性が示唆された。zone3肝細胞は肝静脈内皮細胞からのWntシグナルを受けて同経路が活性化した状態にあるが、Wnt-カテニン経路の活性化は肝発癌の特に初期段階に重要であると報告されており、同経路の阻害が肝癌予防に有用な可能性が示唆された。また今回新たに樹立されたAFP-CreERTマウスは肝病態の解明に非常に有用なツールになると期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined changes in the zonal distribution of the Wnt target gene Axin2 over time using Axin2-CreERT2;Rosa26-Lox-Stop-Lox-tdTomato mice (Axin2;tdTomato). We found that following tamoxifen administration at 3 weeks of age, approximately one-third of total hepatocytes that correspond to zone 3 were labeled in Axin2;tdTomato mice. Cell fate analysis revealed that zone 3 hepatocytes maintained their own lineage but rarely proliferated beyond their liver zonation during homeostasis; this indicated that our protocol enabled persistent genetic labeling of zone 3 hepatocytes. Using this system, we found that zone 3 hepatocytes generally had high neoplastic potential. However, the frequency of zone 3 hepatocyte-derived tumors varied depending on the regeneration pattern of the liver parenchyma in response to liver injury. Furthermore, we established a new transgenic mouse line, AFP-CreERT mouse, that expresses CreERT under the regulation of AFP promoter.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝細胞癌 癌起源細胞 混合型肝癌 肝再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

混合型肝癌は、通常の肝細胞癌に比して予後不良であり、その発癌機序解明は重要な命題である。従来肝細胞・胆管細胞両方向への分化を示すという観点から、肝幹細胞や肝前駆細胞を起源とする発癌である可能性が示唆されてきた。一方肝幹・前駆細胞がどこに存在するかについては、肝細胞と小葉間胆管の境界部にあたる Hering 管や肝障害時に出現する増生細胆管が、その解剖学的位置や動物モデルの解析、*ex vivo* における肝細胞・胆管細胞への両方向分化能などから、最も有力な候補と考えられ、門脈域から肝静脈域へと肝細胞が供給されると推察されてきた。しかしながら最近の *inducible Cre* を用いた *genetic lineage tracing* 技術によるマウスモデルの解析から、①定常状態では肝細胞は肝静脈周囲 *Axin2* 陽性細胞から門脈域に向かって供給される、②肝細胞障害時には門脈周囲 *Sox9* 陽性細胞から肝静脈方向へ向かう再生が生じる、③Hering 管を含めた胆管系細胞からの肝細胞への分化は限定的であり癌化の頻度も少ない、④成熟肝細胞が肝内胆管癌の起源となり得る、ことが報告されている。これらはそのままヒトにあてはまらない可能性もあるが、従来の肝再生・発癌における概念を再考するには十分である。そこで我々は、肝細胞癌の多くは幹細胞よりも成熟肝細胞から発生し、さらに肝細胞癌から胆管細胞癌への分化転換の結果として、混合型肝癌が形成されると仮説を立てた。また肝障害の中でも、脂肪肝や NASH では *zone3* 肝細胞に脂肪蓄積が生じやすいことから、同部位において DNA 損傷が生じ発癌起源になりやすいのではないかと考えた。

2. 研究の目的

これらの背景のもと、本研究は同仮説を検証するため様々なマウスモデルを構築し、肝再生機構から肝癌起源細胞同定、そして混合型肝癌の形成機序解明を試みることにした。

3. 研究の方法

Zone3 肝細胞の細胞系譜解析

Axin2-Cre^{ERT} マウスと *Rosa-lox-stop-lox-Tomato* レポーターマウスを交配させ(*Axin2-Tomato*)、コーンオイルに溶解したタモキシフェン(TAM)を 200mg/kg の容量で腹腔内投与した。*Tomato* の発現は病理標本を用いた RFP の免疫染色によって評価した。

肝癌マウスモデル

①化学発癌剤 diethylnitrosamine(DEN)および DEN+高脂肪食(HFD)モデル

PBS で希釈した DEN 25mg/kg を生後 2 週齢の *Axin2-Tomato* マウスに腹腔内投与したのち、3 週齢で TAM を投与することによって *Tomato* 陽性細胞を標識、8 か月後に腫瘍部と非腫瘍部の *Tomato* 陽性細胞腫瘍数および非腫瘍部の *Tomato* 陽性細胞肝細胞数を解析した。DEN+HFD モデルでは、同プロトコールに加えて、生後 6 週齢から HFD の給餌を開始した。

②PIK3CA トランスジェニックマウスモデル(PIK3CA Tg)

PIK3CA Tg マウスは当研究室で樹立された肝特異的 mutant PIK3CA 発現マウスであり、PI3K 経路の活性化によって著明な脂肪蓄積を生じ、1 年の経過で肝腫瘍を自然発症する。本研究では、PIK3CA Tg と *Axin2-Tomato* を交配させたマウスを作成し、3 週齢で TAM を投与したのち、12 か月齢で解析を行った。

③コリン欠乏高脂肪食(CDAHFD)モデル

生後 3 週齢の *Axin2-Tomato* マウスに TAM を投与後、6 週齢から CDAHFD(リサーチダイエツト社)を給餌し、40 週後に解析を行った。

④MUP-uPA+HFD マウスモデル

Axin2-Tomato と MUP-uPA マウスを交配させたマウスに生後 3 週齢で TAM を投与、6 週齢から HFD を給餌し、10 か月齢で解析を行った。

AFP-Cre^{ERT} マウスの作成

Bacterial artificial chromosome (BAC)を用いて、AFP プロモーター制御下に *Cre^{ERT}* を発現させるマウスを作成した。AFP-Cre^{ERT} マウスを *Rosa-lox-stop-lox-Tomato* レポーターマウスと交配させ(*AFP-Tomato*)、TAM(200mg/kg)を腹腔内投与することによって AFP 陽性細胞を標識した。

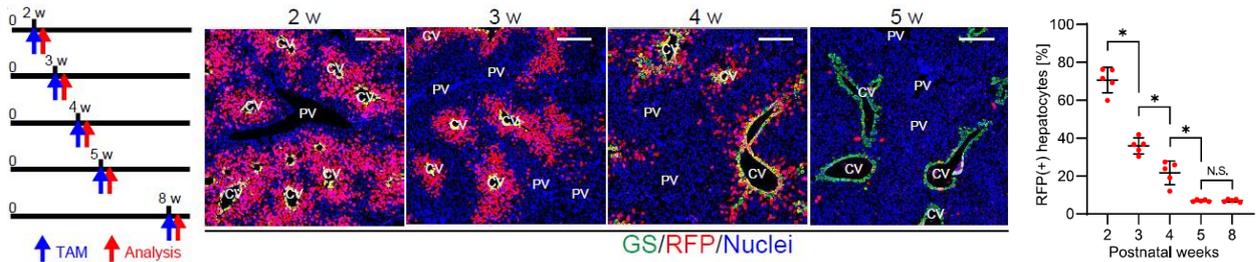
4. 研究成果

①細胞系譜解析を用いた *zone3* 肝細胞の肝障害時の挙動と発癌起源としての可能性

Axin2-Cre^{ERT} マウスを用いた *zone3* 肝細胞の *genetic labeling*

まず、*Axin2-Cre^{ERT}* マウスと *Rosa-LSL-Tomato* マウスを交配させた *Axin2-Tomato* マウスに対して様々な週齢で TAM を投与し、その発現状況を解析した。既報同様 *Axin2* 陽性細胞は肝静脈周囲に存在していたが、その領域は週齢によって変化し、生後 2 週齢で TAM を投与すると肝静脈域から門脈域に向かって 72%、3 週齢で TAM を投与すると 35%、4 週で 21%、5 週で 7%と加齢

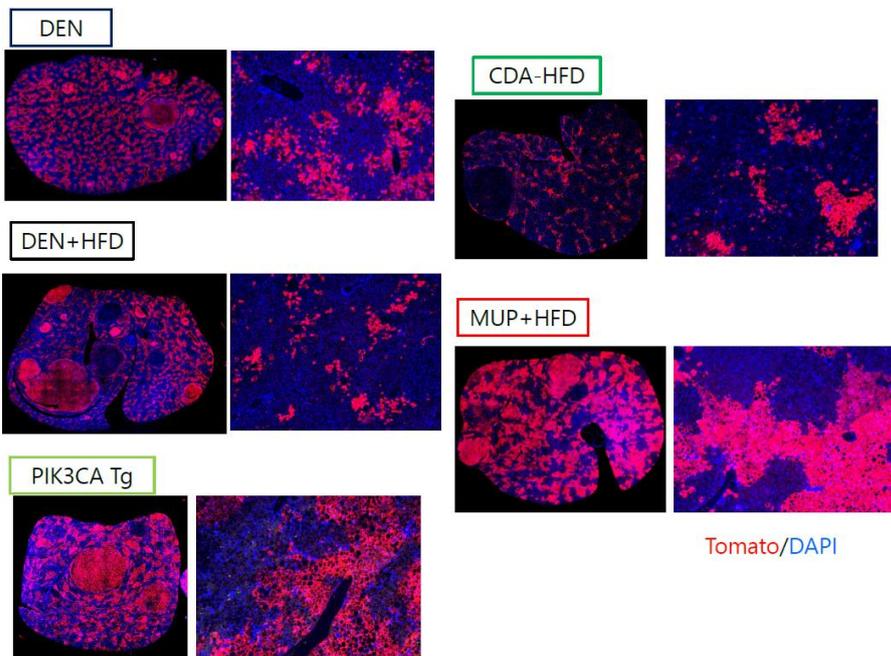
とともに減少していった。よって生後3週の時点でTAMを投与すると、肝細胞全体のうち肝静脈側約1/3、すなわちzone3が標識できることがわかった。しかしこの条件下では既報と異なり、1年間経過してもTomato陽性細胞の割合はほとんど変化しなかった。すなわちこの条件でTAMを投与することで、zone3肝細胞を持続的に標識できることが明らかとなった(下図)。以後このプロトコルを用い、各種肝発癌モデルにて実験を行った。



肝癌マウスモデルを用いた zone3 肝細胞の発癌起源としての可能性の探索

次に3週齢で zone3 肝細胞を標識後、DEN、DEN+高脂肪食(HFD)、HFD 負荷 MUP-uPA マウス、PIK3CA Tg マウス、コリン欠乏高脂肪食(CDAHFD)の5種類の肝癌マウスモデルを作成し、RFP陽性腫瘍率(zone3由来腫瘍率)を算出した。RFP陽性腫瘍率は、DEN: 80.7%、DEN+HFD: 55.8%、MUP+HFD: 67.0%、PIK3CA Tg: 67.6%、CDAHFD: 25.0%で、各 zone から均一に発癌すると仮定するとTomato陽性腫瘍率は35%前後となるはずであり、CD-HFDモデルを除いていずれも zone3由来肝癌の確率が高いことがわかった(下図)。またDENとDEN+HFDを比較すると、既報通り8HFD負荷によって肝腫瘍形成は促進されたが、1匹あたりのTomato陽性腫瘍数には差がなく、Tomato陰性腫瘍の数が有意に増加していた。

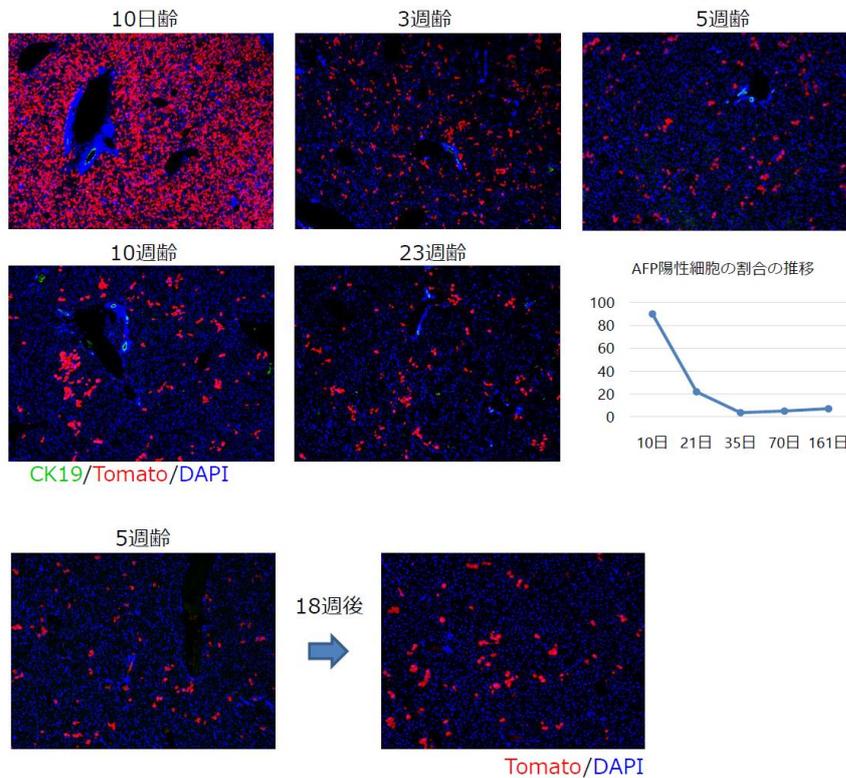
そこで非腫瘍部を見てみると、DEN単独ではTomato陽性細胞領域は変化しなかったが(35.1%)、HFDを負荷することでRFP陽性領域が減少していた(28.3%)。興味深いことにCDAHFDモデルでも非腫瘍部のTomato陽性領域は減少していた(22.1%)。すなわち脂肪肝やNASHによってzone3肝細胞死が生じると、zone1,2からzone3方向への再生反応が惹起され、結果としてzone1,2由来発癌が促進されると考えられた。一方PIK3CA Tgは、脂肪肝発癌モデルであるが細胞死や炎症が少なく、非腫瘍部のTomato陽性領域は1年後も変化しなかった(37.4%)。このことが本モデルでzone3由来肝腫瘍が多かった理由の一つと考えられた。またMUP+HFDでは、非腫瘍部のTomato陽性領域は様々な像を呈しており、Tomato陽性細胞がzone1まで到達している部位もあれば、zone3周辺から消失している部分も見られた。MUP-uPAマウスは5週齢ピークとする一過性の急性肝炎を発症し、その後HFDを負荷することでNASH様の病態となるが、急性肝炎時には全てのzoneにおいて肝細胞死が生じるため、様々な方向へ再生が生じる結果としてこのような分布になると考えられた。今後さらに詳細なメカニズムを検討していく予定である。



AFP-Cre^{ERT} マウスの樹立と解析

肝臓におけるAFPの発現は、胎齢9日目ごろから発現し胎生期には強い発現を認めるが、生後次第に減少していくことが知られている。そこでAFP-Tomatoマウスに様々な週齢でTAMを投

与したところ、下図に示すように生後 10 日目には肝臓全体に Tomato が発現していたが、その数は次第に減少し 5 週齢でほぼプラトーに達することがわかった。この結果から、今回作成した AFP-CreERT マウスはうまく機能しているものと考えられた。また adult の状態でも 10%程度 AFP を発現している細胞が存在していたことから、同細胞の細胞系譜解析を行った。5 週齢で TAM を投与して AFP 陽性細胞を標識後、18 週間経過したところで解析してみたところ、AFP 陽性細胞はその領域をわずかに増大させていた。すなわち AFP 陽性肝細胞は長命でかつ分裂によって恒常性維持に寄与している可能性が示唆された。今後は、肝障害時の AFP 陽性細胞の機能解析や肝癌細胞特異的な遺伝子改変の導入、さらには混合型肝癌の誘導など、肝病態を解き明かすための有力なツールとして活用していく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	中川 勇人 (Nakagawa Hayato) (00555609)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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