

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08414

研究課題名(和文)胆管周囲付属腺に着目した胆管再生および胆管癌発生機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of biliary epithelial regeneration and carcinogenesis focusing on the peribiliary glands

研究代表者

中込 良 (Nakagomi, Ryo)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：20778039

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)：これまで十二指腸乳頭部癌のマウスモデルは存在せず、その発癌機序は不明な点が多かった。今回我々は胆管周囲付属腺の働きに着目した研究の過程で、乳頭部に存在する胆管付属腺において特異的なWnt活性化ニッチが存在し、同細胞集団が胆管上皮幹細胞として機能すると同時に、乳頭部癌起源細胞ともなりうることを実験的に証明した。さらにWnt阻害剤によってマウスにおける乳頭部癌の発症を著明に抑制できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のところ、進行した十二指腸乳頭部癌に対する薬物療法は確立されていない。その理由の一つとして、十二指腸乳頭部癌は胆管・膵管・十二指腸が合流する複雑な部位に発生するため、胆管癌・膵癌・十二指腸癌のどれに準じた薬物療法を行うのがよいか分からないことが挙げられる。今回我々は新規の十二指腸乳頭部癌マウスモデルを樹立し、乳頭部の胆管周囲付属腺が癌起源細胞となり得ること、さらにWnt阻害剤によって発癌を抑制できることを見出した。さらに同細胞集団は胆管上皮幹細胞としても機能していることを明らかにした。これらの結果は、胆管再生療法および十二指腸乳頭部癌の治療法開発に重要な示唆を与える。

研究成果の概要(英文)：There has been no mouse model of ampullary carcinoma, and the mechanism of carcinogenesis has remained unclear. During the analysis of the peribiliary glands (PBGs), we found that Wnt activating niche exists in the periampullary PBGs and this cell population can function as biliary epithelial stem cells as well as cells of origin of ampullary carcinoma. In addition, treatment with Wnt inhibitor significantly suppressed ampullary carcinoma development.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆管周囲付属腺 十二指腸乳頭部癌 Axin2

1. 研究開始当初の背景

最近の解剖学的・免疫組織化学的な検討から、肝外胆管周囲に存在する胆管周囲付属腺(peribiliary gland; PBG)に胆管上皮幹細胞が存在し、胆管癌起源細胞となり得るとの説が提唱され注目されている(右図)。従来 PBG は胆汁の組成を調整する腺組織であると考えられていたため、これらの仮説は非常に興味深い。しかしながら、PBG が実際に生体内で胆管の恒常性維持や発癌に寄与していることを実験的に証明したエビデンスレベルの高い研究は存在しない。その理由として、PBG 特異的に発現するマーカーが同定されておらず、近年組織幹細胞研究で主流となっている細胞系譜解析ができないことが挙げられる。

2. 研究の目的

PBG 特異的に発現するマーカーを同定し、同細胞の細胞系譜解析を行うことによって、胆管上皮幹細胞および癌起源細胞としての可能性を検証する。

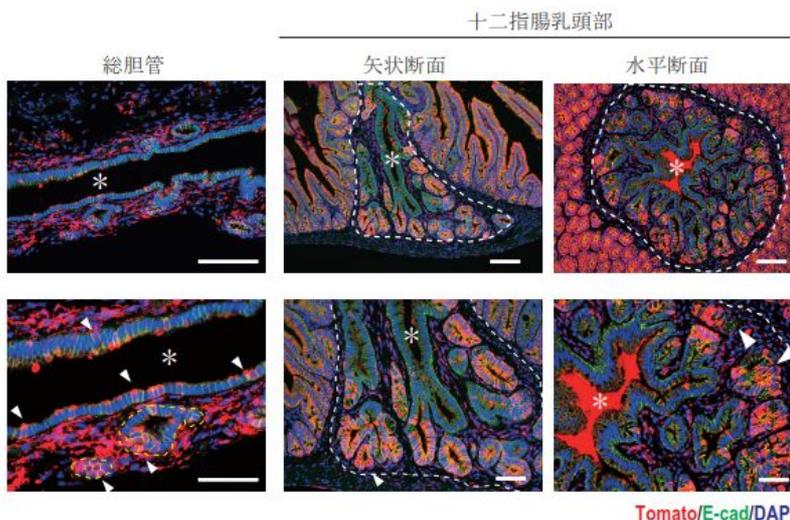
3. 研究の方法

本研究は、消化管等で幹細胞ニッチ形成・維持に重要な役割を果たしている Wnt シグナル経路に着目して研究を行った。同経路の標的遺伝子である Axin2 のプロモーター下に CreERT が挿入された *Axin2-Cre^{ERT}* ノックインマウスを、Cre 誘導性に Tomato-RFP が発現するレポーターマウス *Rosa26-Lox-Stop-Lox-tdTomato* と交配することによって(*Axin2-Tomato*)、タモキシフェン(TAM)誘導性に Axin2 陽性細胞を genetic labeling できるマウスを作製し、細胞系譜解析を行った。TAM はコーンオイルに溶解したのち、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。

4. 研究成果

Axin2 は乳頭部領域における胆管周囲付属腺で特異的に発現している

消化管等では、幹細胞ニッチ形成・維持に Wnt シグナル経路が重要であることが報告されている。そこで胆管幹細胞ニッチにおいても同経路が重要な役割を果たしているのではないかと考え、上述の *Axin2-Tomato* マウスを用いて胆道系における Wnt シグナル経路の活性化状態を解析した。右図に示すように、総胆管においては、胆管表層上皮・PBG の両者で散在性に Tomato が発現しており、明らかな局在性を認めなかった。しかしながら乳頭部においては、PBG の特に底部で Tomato が発現する一方、胆管表層上皮には全く発現していなかった。この結果は、Axin2 mRNA の in situ hybridization (ISH) によっても確認された。すなわち乳頭部においては、PBG の特に底部で Wnt 経路が活性化しており、*Axin2-Tomato* マウスは乳頭部 PBG を特異的に標識できるマウスであることが分かった。よってこれより先の実験は、特に乳頭部の胆管付属腺に焦点を絞って解析を行った。



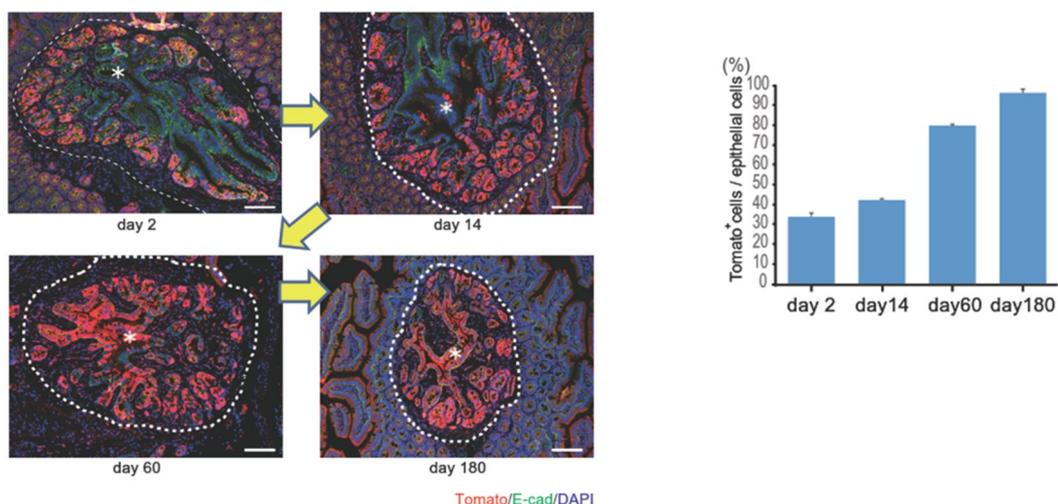
乳頭部胆管付属腺の特徴

次いで、乳頭部 PBG の特徴を各種免疫染色によって評価した。乳頭部の Axin2 陽性 PBG 細胞は、Sox9 や CD44 などの内胚葉系臓器幹細胞/前駆細胞マーカーを強く発現すると同時に、細胞増殖マーカーの Ki67 も高頻度に陽性であった。一方で、分化した腺管上皮細胞のマーカーである CK19 や腸型腺管上皮の分化マーカーである MUC2 については、胆管表層上皮では発現がみられたが、底部の PBG 細胞は発現していなかった。すなわち、乳頭部 PBG は、未分化で増殖が盛んな細胞集団を含む、胆管幹細胞ニッチとして機能している可能性が考えられた。

乳頭部 Axin2 陽性細胞の細胞系譜解析

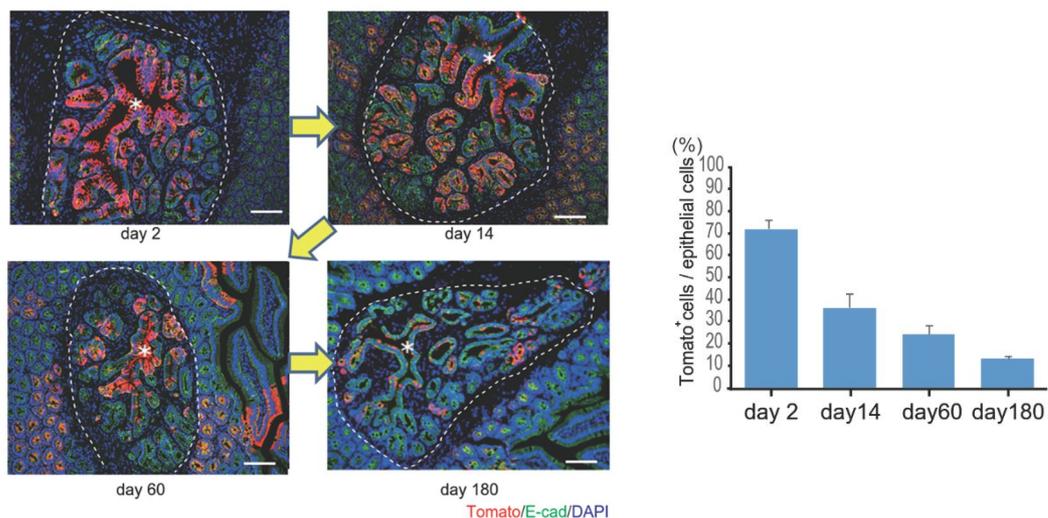
実際に Axin2 陽性細胞が胆管上皮幹細胞として機能しているかを検討するため、*Axin2-Tomato* マウスを用いて乳頭部の細胞系譜解析を行った。TAM 投与 2 日目の時点では Tomato 陽性細胞は乳頭部 PBG に限局しており、上皮細胞全体の 34%であったが、14 日後には 42%、60 日後には 80%と、時間経過とともに Tomato 陽性細胞の占める割合が次第に増えていく様子が観察された(次項図)。さらに TAM 投与 180 日後には胆管表層上皮も含めてほぼ全ての胆管上皮細胞が

Tomato 陽性細胞に置き換わっていた。すなわち、乳頭部の Axin2 陽性 PBG 細胞が、新しい胆管上皮を供給する幹細胞として機能していることが明らかとなった。



乳頭部 CK19 陽性細胞の細胞系譜解析

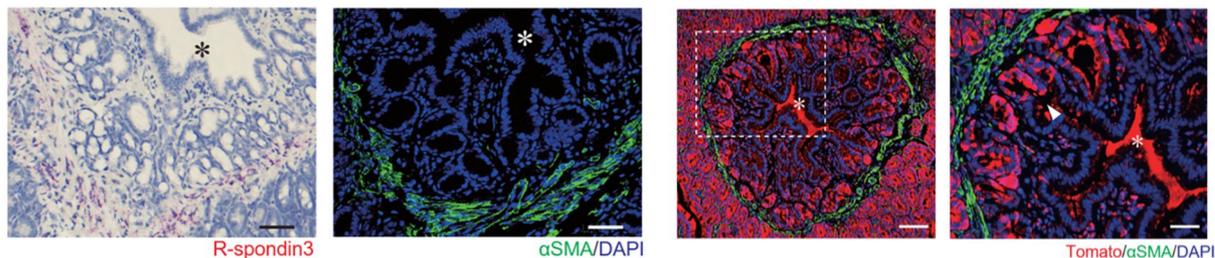
前述のように、分化した腺管上皮細胞マーカーである CK19 は Axin2 と相互排他的な発現パターンを呈していた。これに注目し、*CK19-Cre^{ERT}* マウスと *Rosa26-Lox-Stop-Lox-tdTomato* マウスを交配させ (*CK19-Tomato*)、*CK19-Cre^{ERT}* マウスにおける遺伝子改変細胞を調べてみると、胆管表層上皮と胆管付属腺上部の細胞で遺伝子改変が誘導されていた。そこで、*CK19-Tomato* マウスを用いて CK19 陽性細胞の細胞系譜解析を行った。TAM 投与 2 日目、14 日目、60 日目、180 日目の時点での Tomato 陽性細胞の挙動を追跡したところ、TAM 投与 2 日目は胆管表層上皮と胆管付属腺上部の細胞に Tomato 陽性細胞を認め、上皮細胞全体の 72%であったが、14 日後には 36%、60 日後には 24%と、時間経過とともに Tomato 陽性細胞の占める割合は次第に減少し、*Axin2-Tomato* マウスの細胞系譜解析とは正反対の様子が観察された(下図)。さらに TAM 投与 180 日後には胆管表層上皮の Tomato 陽性細胞はほとんどが消失していた。すなわち、胆管表層上皮細胞が乳頭部 PBG の底部から供給される胆管上皮によって置換されていくことがあらためて実証された。



乳頭部胆管付属腺における Wnt 経路活性化ニッチの形成機序

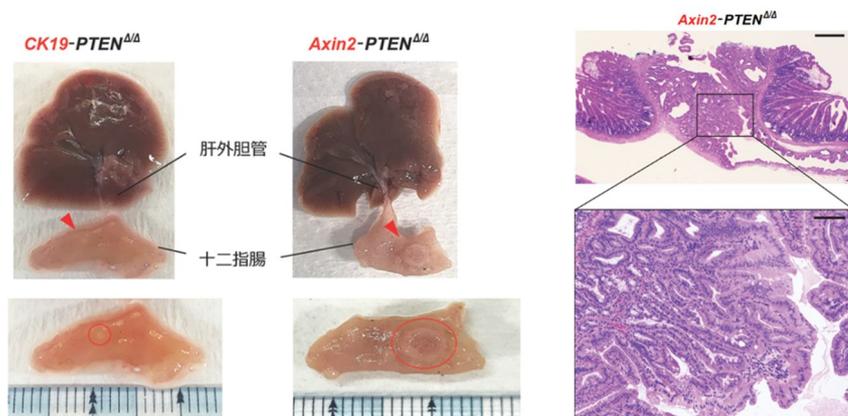
乳頭部 PBG 特異的な Wnt 活性化ニッチの形成機序を調べるため、各種 Wnt リガンドの発現を ISH によって解析した。一部の Wnt リガンドの散在性の発現を認めたものの、明らかに PBG 近傍に局在している Wnt リガンドは同定できなかった。そこで次に、Wnt 受容体である Frizzled を安定化させることで Wnt シグナル伝達のエンハンサーとして作用する R-spondin ファミリーの発現を、ISH によって検討した。すると興味深いことに、R-spondin3 が乳頭部 PBG の周囲に存在する間質細胞に限局して強く発現していることがわかった(下図)。これを H&E 染色像と対比させると、乳頭部胆管を取り囲む Oddi 括約筋に一致しているように思われた。そこで R-spondin3 を発現している細胞を連続切片によって解析したところ、 α -smooth muscle actin (α SMA) 陽性であり、平滑筋細胞もしくは同部位に存在する筋線維芽細胞であることがわかった。また *Axin2-Tomato* マウスを用いた解析でも、PBG 底部の Axin2 陽性細胞は α SMA 陽性細胞に取り囲まれていた。一方で総胆管では乳頭部と異なり、R-spondin3 の明らかな局在性は認めなかった。すなわち乳頭部 PBG 周囲に存在する Oddi 括約筋細胞および筋線維芽細胞が分泌する R-spondin3

によって、同部位特異的な Wnt 経路活性化ニッチが形成されている可能性が示唆された。同様の所見は、ヒト乳頭部の切除検体でも確認された。そこで現在、平滑筋細胞特異的 R-spondin3 欠損マウスを作製し、さらに解析を進めている。



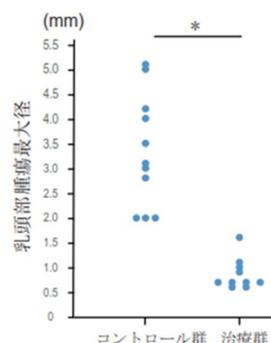
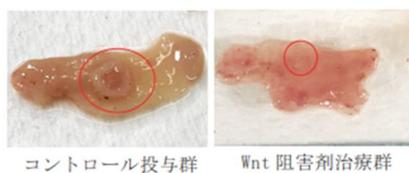
十二指腸乳頭部癌マウスモデルの樹立と起源細胞同定

次に乳頭部 PBG 細胞の癌起源細胞としての可能性について検討を行った。Axin2-Cre^{ERT} マウスを PTEN^{fl/fl} マウスと交配させることによって、ヒト胆道癌でも変異が報告されている腫瘍抑制遺伝子 PTEN を PBG 特異的にノックアウトしたマウスを作製した(Axin2-PTEN^{Δ/Δ})。また、CK19-Cre^{ERT} マウスと PTEN^{fl/fl} マウスを交配させ、胆管表層上皮特異的 PTEN 欠損マウスもあわせて作成した(CK19-PTEN^{Δ/Δ})。すると驚くべきことに、TAM 投与 3 か月後には、Axin2-PTEN^{Δ/Δ} マウスは全例(10/10 例)で十二指腸乳頭部腫瘍を発症したのに対し CK19-PTEN^{Δ/Δ} マウスでは一例も発症しなかった(0/10 例)。Axin2-PTEN^{Δ/Δ} マウスに発生した乳頭部腫瘍は、病理学的には高~中分化型腺癌であった。すなわち乳頭部の Axin2 陽性 PBG 細胞は、胆管上皮幹細胞として機能すると同時に、乳頭部癌の癌起源細胞となり得ることが明らかとなった。



Wnt 阻害剤による乳頭部癌の治療効果

次に Wnt 活性化ニッチが PBG からの乳頭部癌発症に寄与するかについて、検討を行った。Wnt リガンドは細胞外に分泌される際にアシル化転移酵素 porcupine によって脂質修飾される必要がある。そこで porcupine を阻害することによって Wnt 経路を抑制する LGK974 を用いて、発癌抑制効果を検討することとした。Axin2-PTEN^{Δ/Δ} マウスに TAM 投与 5 日目から LGK974 もしくは溶媒を連日投与し、TAM 投与 90 日目に腫瘍形成を比較した。すると驚くべきことに、LGK974 投与によって著明に腫瘍径が縮小し、8/10 例ではほぼ腫瘍としては認識できないほどであった(右図)。病理学的にも腫瘍化は著明に抑制されており、一部では腫瘍形成自体を認めないものもあった。以上から、Wnt 経路活性化ニッチは乳頭部癌の発癌過程においてきわめて重要な役割を果たすことが明らかとなった。



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・届出研究員 (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