

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08277

研究課題名(和文)ミトコンドリア光活性による胆管癌発生経路の可視化と分子学的解析

研究課題名(英文) Visualization and molecular analysis of cholangiocarcinogenesis pathway by mitochondrial photoactivity

研究代表者

高原 楠昊 (Takahara, Naminatsu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10750622

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)：胆管癌の分子学的、生物学的特性には未だ不明な点が多い。胆管癌患者の組織から樹立したオルガノイドを用いて、胆管癌細胞が5-ALA依存性の光活性を呈することを見出した。この活性は癌特異的であった。このオルガノイドにおける光活性を指標とし、遺伝子変異蓄積による胆管細胞の癌化過程を可視化・解析するツールとして活用した。胆管癌での5-ALA依存性の光活性につながる原因として細胞内ポルフィリン代謝の構成因子の発現異常、さらには関連するエピジェネティクス制御異常を検討した。並行して胆管癌で見出されるドライバ変異候補を非腫瘍部胆管細胞に導入し、癌化の誘導の有無を5-ALA依存性の光活性を指標に評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでヒト胆管癌の研究ツールとしては数少ない細胞株に限られ、症例ごとの進展様式の違いを反映する細胞モデルや、正常・前がん状態の胆管細胞の培養系も存在しなかった。本研究では倫理委員会の承認のもと、胆管癌患者由来の腫瘍部と隣接非腫瘍部のそれぞれの組織からオルガノイド培養系を樹立することに成功した。このオルガノイドモデルを遺伝子変異の蓄積と胆管癌発生過程との相関を可視化・解析するツールとして活用した結果、新たな胆管癌に対する治療概念につながる成果を得つつある。

研究成果の概要(英文)：The molecular characteristics of cholangiocarcinoma remain unclear. The definitive driver mutations for therapeutic target molecules are not yet known. Although KRAS, SMAD4, ARID1A, GNAS, ELF3, and ARID1B have been reported as candidate driver genes for extrahepatic cholangiocarcinoma, the contribution of each mutation to carcinogenesis has not been fully investigated.

In this study, we found that cholangiocarcinoma cells exhibit 5-ALA-dependent photoactivity. This activity was cancer-specific. We investigated the expression of components of intracellular porphyrin metabolism and related epigenetic dysregulation as the cause of 5-ALA-dependent photoactivity in cholangiocarcinoma. In parallel, candidate driver mutations found in cholangiocarcinoma were introduced into nonneoplastic cholangiocytes and evaluated for induction of tumorigenesis using 5-ALA-dependent photoactivity as an indicator.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆管癌

## 1. 研究開始当初の背景

胆管癌の分子学的、生物学的特性には未だ不明な点が多い。他の胆道癌と同様に未だ十分な治療の選択肢がなく、治療標的となる分子についても決定的なドライバー変異が明らかでない。診断においても胆管内の正確な癌進展範囲の決定には画像診断上の困難が多い。例えば肝外胆管癌のドライバー遺伝子候補として、KRAS, SMAD4, ARID1A, GNAS, ELF3, ARID1Bなどが報告されているが、各変異の発癌への寄与について十分検討されているとは言えない。さらには胆管癌の発育形態における結節型あるいは平坦型、また粘膜内あるいは粘膜下などの進展様式の違いに関連する遺伝子変異プロファイルも殆ど解明されてはいない。

上記を解明するための実験系の問題点として、これまでヒト胆管癌の研究ツールとしては数少ない細胞株に限られ、症例ごとの進展様式の違いを反映する細胞モデルや、正常・前がん状態の胆管細胞の培養系も存在しなかった。そこで我々は倫理委員会の承認のもと、胆管癌患者由来の腫瘍部と隣接非腫瘍部のそれぞれの組織からオルガノイド培養系を樹立することに成功した。よって本研究では、このオルガノイドモデルを遺伝子変異の蓄積と胆管癌発生過程との相関を可視化・解析するツールとして活用する。

## 2. 研究の目的

ヒト胆管細胞の癌化における形質転換及び特異的な浸潤形態の獲得に様々な遺伝子変異がどう関与するかについて、樹立したヒト胆管細胞オルガノイドを用いて検討する。

従来から細胞腫瘍化の判定には免疫不全マウスへの移植によりその腫瘍形成能と病理形態を観察することが用いられるが、多くの場合で数か月もの時間を要するという短所がある。その点を克服する本研究の学術的独自性(工夫点)として、前検討で見出した「腫瘍特異的ミトコンドリア光活性を癌化指標マーカーとして応用する」点がある。具体的には、胆道癌オルガノイドにポルフィリン合成経路の最初の生成物である-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid; 5-ALA)を投与すると375-445nmの青色可視光の照射により赤色に発光するが、非腫瘍胆管オルガノイドでは発光が全く見られない、という知見に基づいている。この現象はALAからミトコンドリア内で代謝されたプロトポルフィリン (Pp)の異常蓄積によるものと考えられ、既に同様の特性を示す悪性脳神経膠腫や膀胱癌においては光線力学的診断・治療手段として臨床の有効性が示されている。

本研究は胆管癌においても見出されたこのALA依存性発光を用いることで、腫瘍化段階を簡便に短時間で予測できるのみならず、*in vivo*における進展様式の可視化にも応用可能な新たなヒト胆管癌評価系を構築することを目的とする。

## 3. 研究の方法

胆道癌患者由来の腫瘍部と隣接非腫瘍部の組織からそれぞれ樹立された胆管細胞オルガノイドにおいて、5-ALA処理後に375-445nmの青色可視光照射を行ったところ、胆管癌オルガノイドでのみ、励起された赤色発光を示すことを見出した。本研究で腫瘍化マーカーとして用いるALA依存的な光活性は、胆管癌細胞においてミトコンドリア内でのPpの分解能が低下し細胞内に蓄積することを示唆している。マーカーとしての分子学的裏付けを得るために、まずは原因となる責任因子を明らかにする。具体的にはPpの蓄積につながる可能性のあるポルフィリン代謝の因子について、その異常発現の有無を非腫瘍胆管細胞との比較において探索・同定する

#### 4 . 研究成果

腫瘍部と隣接非腫瘍部の組織からそれぞれ樹立された胆管細胞オルガノイドは異なる形態を呈することを見出した。また腫瘍由来のオルガノイドは 5-ALA の代謝物質としてプロトポルフィリン IX を非腫瘍部由来のオルガノイドと比較して優位に蓄積する(40-71% vs. < 4%,)ことが明らかになった。一方で両者の光活性の差はポルフィリン代謝にかかわる遺伝子群の発現とは明らかな相関を見出さなかった。これらのことは胆道癌特異的な 5-ALA 依存性光活性メカニズムの存在を示唆し、その解明は診断学的応用への足掛かりになりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Fujiwara Hiroaki, Takahara Naminatsu, Tateishi Keisuke, Tanaka Mariko, Kanai Sachiko, Kato Hiroyuki, Nakatsuka Takuma, Yamamoto Keisuke, Kogure Hirofumi, Arita Junichi, Nakai Yousuke, Kasuga Masato, Ushiku Tetsuo, Hasegawa Kiyoshi, Koike Kazuhiko	4. 巻 35
2. 論文標題 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic activity in patient-derived cholangiocarcinoma organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 484 ~ 490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.suronc.2020.10.011	査読の有無 無
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	立石 敬介  (Tateishi Keisuke)  (20396948)	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