

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05928

研究課題名(和文)胆管発がん過程におけるSOX9発現肝細胞の意義

研究課題名(英文) Impact of SOX9 expressing hepatocytes on cholangiocarcinogenesis

研究代表者

高須 伸二 (Takasu, Shinji)

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官

研究者番号：00597891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌発生過程におけるSOX9発現肝細胞の役割を明らかにすることを目的に、フラン誘発ラット胆管癌前がん病変の発生過程において認められるSOX9発現肝細胞の生物学的特徴を検証した。SOX9陽性肝細胞は胆管線維症が発生する前より認められ、その数は病変の進展に伴い増加した。一方、肝病変が認められなかった領域では、SOX9陽性肝細胞は認められなかった。しかし、SOX9発現肝細胞と胆管上皮細胞マーカーの発現との関連性は乏しかった。SOX9発現肝細胞はフラン誘発胆管病変の発生や進展に関連する可能性が疑われたが、その役割についてはさらなる検証が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内胆管癌の発生機序に係る研究は注目されており、大規模な疫学的研究やゲノム解析から慢性肝炎や肝硬変といった肝疾患が重要であることが示されているが、肝疾患から胆管癌が発生する過程の全容はよくわかっていない。本研究は動物モデルにおける胆管癌の前がん病変におけるSOX9発現肝細胞の役割を検討したものであり、今後の動物モデルを用いた胆管発がん研究に関する知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of SOX9-expressing hepatocytes in the cholangiocarcinogenesis, biological characteristics of SOX9-expressing hepatocytes in the furan-induced preneoplastic lesions in rat cholangiocarcinogenesis were examined. SOX9-positive hepatocytes were observed before the development of cholangiofibrosis, and number of SOX9-positive hepatocytes was increased along with the progress of the lesions. In contrast, no SOX9-positive hepatocytes were found in the non-lesional area. However, no clear association was found for the expression of bile duct epithelial cell markers in the SOX9-positive hepatocytes, suggesting that SOX9-expressing hepatocytes might be associated with the development and progression of furan-induced bile duct lesions, however, their role required further investigation.

研究分野：毒性病理学

キーワード：肝臓 ラット SOX9 胆管線維症 フラン 胆管

## 1. 研究開始当初の背景

近年、大規模ながんゲノム解析から肝細胞癌と肝内胆管癌で共通した遺伝子変異が複数発見されたことから、両者は同じ細胞から発生している可能性が指摘された。また、胆管癌で発見された遺伝子変異のパターンが慢性肝炎や肝硬変などの肝障害を背景に発生した肝細胞癌と特に一致していたことから、肝障害は胆管癌に関しても重大な発生要因であることが提唱された。このように、肝障害は胆管癌の重大なリスク要因であることは広く知られているものの、その発生機序の全容は解明されていない。

慢性障害の肝臓では、傷ついた肝臓を修復するための特殊な細胞が出現することが知られており、転写因子 SOX9 を発現する肝細胞は肝細胞と胆管細胞の両方に分化しながら損傷した肝臓を再生する細胞であると考えられている。この細胞は高い細胞増殖能と多分化能を持っていることから、がんの起源となる可能性も疑われたが、このような細胞が胆管癌の発生や進展に与える影響についてはあまり検証されていない。

これまでに、ラットに肝細胞癌と胆管癌の両方を誘発するフランを投与して発生した肝前がん病変の中に SOX9 や CK19 といった胆管上皮マーカーを発現する細胞が混在しており、このような細胞は胆管癌が発生しない発がん物質では存在しないことを報告した<sup>1)</sup>。さらに、フランを投与したラットの肝臓において、胆管癌の前がん病変である胆管線維症の周囲に SOX9 を発現する肝細胞が出現することを見出した。そこで、本研究では、胆管癌の発生機序を理解するために、肝障害で認められる現象に着目し胆管がん発生過程における役割を明らかにすることを試みた。

## 2. 研究の目的

フラン投与により生じる胆管癌の前がん病変の胆管線維症の周囲において、SOX9 を発現する肝細胞が出現する事実に着目し、フラン誘発の胆管がん発生過程における SOX9 発現肝細胞の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

6 週齢の雄性 F344 ラットにコーン油に混じたフランを 30 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した。対照群にはコーン油を与えた。フラン投与開始 1 日、3 日、7 日、14 日、21 日および 28 日後に肝臓を採取し、病理組織学的検査に供した。また、SOX9 発現肝細胞を免疫組織化学的に検索し、その出現率を経時的に評価した。さらに、SOX9 発現肝細胞における細胞マーカーの発現を免疫組織化学的に検討した。

## 4. 研究成果

フラン投与後の肝臓について病理組織学的検査を実施した結果、投与 1 日後の肝臓では肝臓漿膜面直下および小葉中心性の肝細胞壊死が認められ、投与 3 日後では炎症細胞浸潤が認められた。投与 7 日後からは卵円型細胞の増殖がみられ、14 日以降には肝細胞の空胞化、21 日以降には胆管線維症の発生が認められた (Fig. 1)。

SOX9 の免疫組織化学的解析の結果、SOX9 陽性肝細胞は卵円形細胞増生や胆管線維症が生じるより前の投与 1 日目から傷害部位周囲に認められた。その後、SOX9 陽性肝細胞は病変に進展にともない増加し、胆管増生や卵円形細胞増生、胆管線維症などの病変の周囲において認められた (Fig. 2)。その出現頻度は経時的に増加し、胆管線維症好発部位の尾状葉

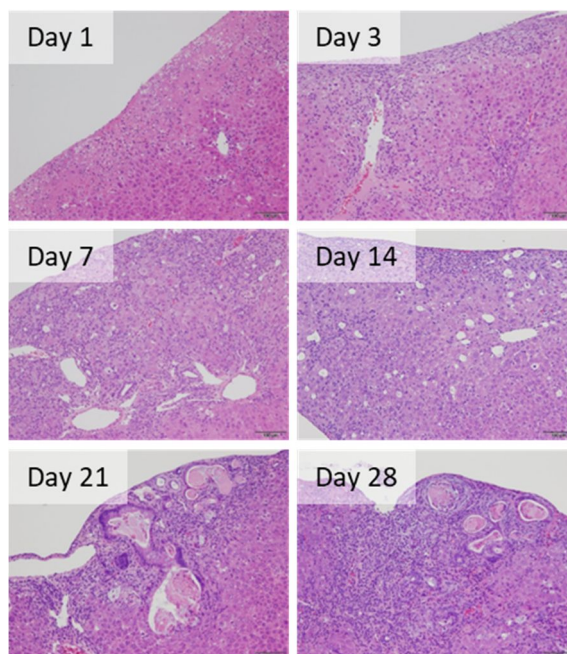


Fig. 1. Representative findings for the liver of rats administered furan for 28 days.

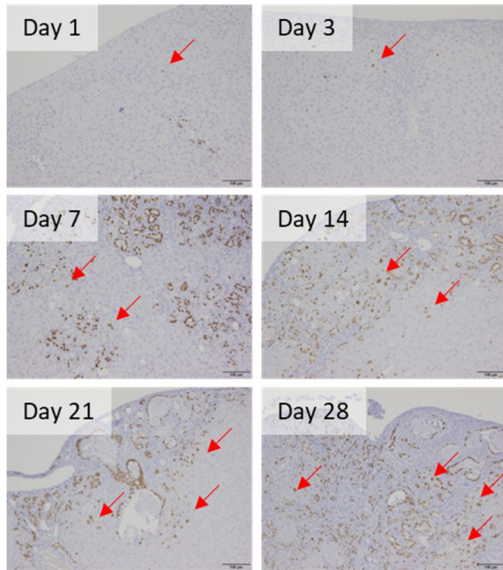


Fig. 2. Representative immunohistochemical findings for the liver of rats administered furan for 28 days. Arrow; SOX9 positive hepatocytes.

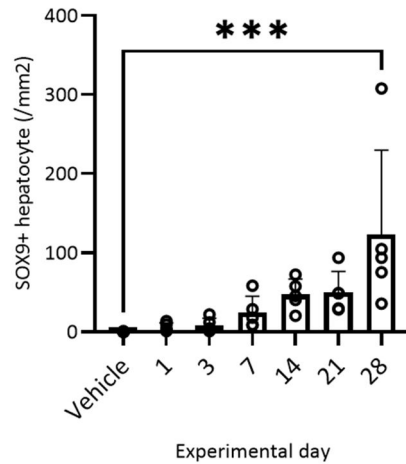


Fig. 3 The number of SOX9 positive hepatocyte in the caudate lobe of liver of rats administered furan for 28 days. \*\*\*Significantly different from the vehicle group at  $p < 0.001$ .

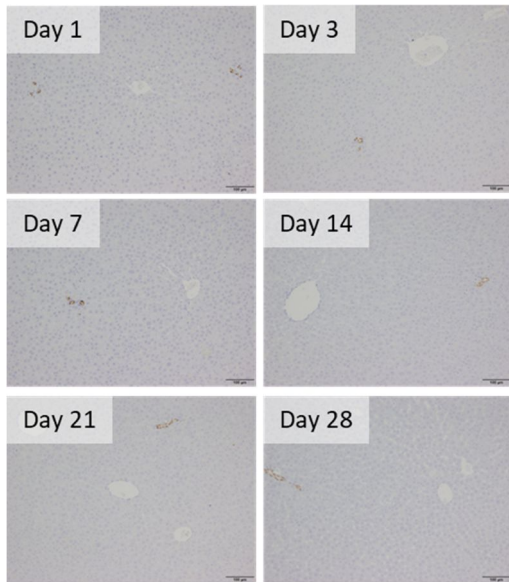


Fig. 4. Representative immunohistochemical findings for the non-lesional area in liver of rats administered furan for 28 days.

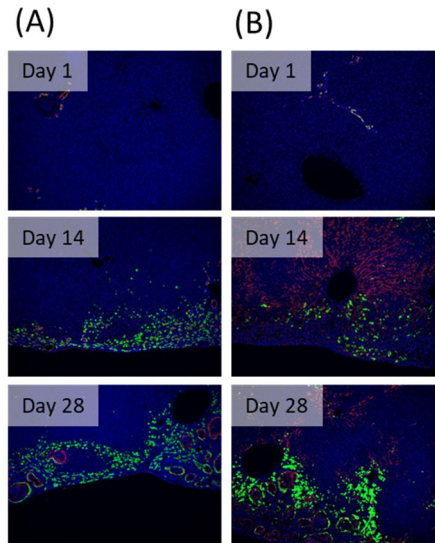


Fig. 5. Immunohistochemical findings for SOX9 positive hepatocyte found in the liver of rats administered furan. (A) SOX9, green; CK19, red. (B) SOX9, green; EpCAM, red.

における SOX9 陽性肝細胞数はフラン投与 28 日後において有意な高値を示した (Fig. 3)。対照的に、非病変部では SOX9 陽性肝細胞は認められなかった (Fig. 4)。このことから、SOX9 発現肝細胞はフラン誘発胆管病変の発生や進展に関連する変化である可能性が示唆された。

一方、SOX9 発現肝細胞の免疫組織化学的検討では、胆管線維症周囲で認められた SOX9 発現肝細胞において胆管上皮細胞マーカーの CK19 の発現は認められず、EpCAM の発現との関連も乏しかった (Fig. 5)。また、本実験条件下では SOX9 の発現亢進が見られたものの肝前がん病変の形成は認められなかった。

以上より、SOX9 発現肝細胞の出現はフラン誘発胆管病変の発生や進展に関連する可能性が示唆されたものの、その役割については明らかにすることができなかったことから、さらなる検証が必要であると考えられた。また、今回認められた SOX9 の発現は肝前がん病変で認められた SOX9 の発現とは異なる機序で誘導されている可能性が考えられた。

#### < 引用文献 >

1) Takasu S, Ishii Y, Kijima A, Ogawa K, Nakane S, Umemura T. Furan induced characteristic glutathione S-transferase placental form-positive foci in terms of cell kinetics and gene expression. *Toxicol Pathol.* 48(6):756-765. 2020.

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------