

令和 6 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07887

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Cell fate analysis of Zone 3 hepatocytes and their potential as a cancer origin

研究代表者

和気 泰次郎(Wake, Taijiro)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：60895267

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)：Wnt/ カテニン経路の下流因子Axin2プロモーター下にCreを発現するマウス(Axin2-CreERT)を用いて、zone3肝細胞を持続的にgenetic labelingできる手法を確立し、Zone3には発癌ポテンシャルの高い細胞集団が存在する、肝発癌にはWnt/ カテニン活性化ニッチが寄与しWnt阻害剤により発癌抑制できる可能性がある、肝障害下のAxin2陽性細胞は旺盛な増殖能を有すると同時に発癌起源にもなり得る、肝癌のmetabolic phenotypeは発癌母地ではなく発癌の過程で獲得される、の4つの点を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のように、zone別の肝発癌リスクを解析した研究は非常に少なく、肝発癌過程を理解するうえで非常に重要な示唆を与える。また現在、肝発癌を予防する薬剤は存在しないが、今回の研究で示されたWnt/ カテニン活性化ニッチを標的とした肝発癌抑制策は、今後の臨床応用に向けてさらなる検討を行う価値があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established a method for persistent genetic labeling of Zone 3 hepatocytes using mice expressing CreERT under the Axin2 promoter (Axin2-CreERT). Our findings highlight four key points: There is a cell population in Zone 3 with high carcinogenic potential; Liver carcinogenesis is promoted by Wnt/ -catenin activation niche and potentially be suppressed by Wnt inhibitors; Under liver injury, Axin2-expressing hepatocytes significantly contribute to liver regeneration and possess high neoplastic potential; The metabolic phenotype of hepatocellular carcinoma is acquired during the carcinogenic process, rather than from the site of cellular origin.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝細胞癌 発癌起源

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓はその解剖学的位置から、門脈周囲の zone1、肝静脈周囲の zone3、その間の zone2 の 3 つに分けられ、それぞれ異なる機能を有する。しかし肝再生や発癌への寄与において、zone による違いがあるのかはわかっていない。申請者は、Zone3 肝細胞は、①発癌の重要な driver である  $\beta$  カテニン経路が恒常的に活性化し、②薬物代謝・解毒酵素を多く発現し酸化ストレスの主な発生源であり、③脂質合成が活発で主要な脂質蓄積の場であるため酸化的 DNA 傷害が生じるリスクが高い、ことなどから、高い発癌ポテンシャルを持つのではないかと仮説を立て、研究を進めてきた。そしてこれまでに、Wnt/ $\beta$  カテニン経路の下流因子 Axin2 プロモーター下に Cre を発現するマウス(Axin2-CreERT)を用いて、zone3 肝細胞を持続的に genetic labeling できる手法を確立した。

### 2. 研究の目的

上述の手法を用いて zone3 肝細胞の細胞系譜解析を行い、zone3 肝細胞の肝障害時の挙動と発癌起源としての可能性を探索すると同時に、Wnt/ $\beta$  カテニン経路活性化ニッチを標的とした、新たな肝癌予防法の開発に挑戦する。

### 3. 研究の方法

#### Axin2 陽性細胞の細胞系譜解析

Axin2-CreERT 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 を生後 2 週齢の Axin2-Tomato マウスに腹腔内投与し、3 週齢で TAM を投与することによって Tomato 陽性細胞を標識し、8 か月後に腫瘍部と非腫瘍部の解析を行った。DEN+HFD モデルでは、同プロトコルに加えて、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 PIK3CA 過剰発現マウスであり(Kudo, J hepatol)、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(CD-HFD)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 CD-HFD(リサーチダイエツト社)を給餌し、40 週後に解析を行った。

##### ④HFD+MUP-uPA 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。また本モデルでは生後 5 週齢で TAM を投与する実験も行った。

### 4. 研究成果

#### Axin2-CreERT マウスを用いた zone3 肝細胞の genetic labeling

まず、Axin2-CreERT 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 71.0%、3 週齢で TAM を投与すると 35.7%、4 週で 22.0%、5 週で 6.9% と加齢とともに減少していった。よって生後 3 週の時点を 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(図 1)。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。

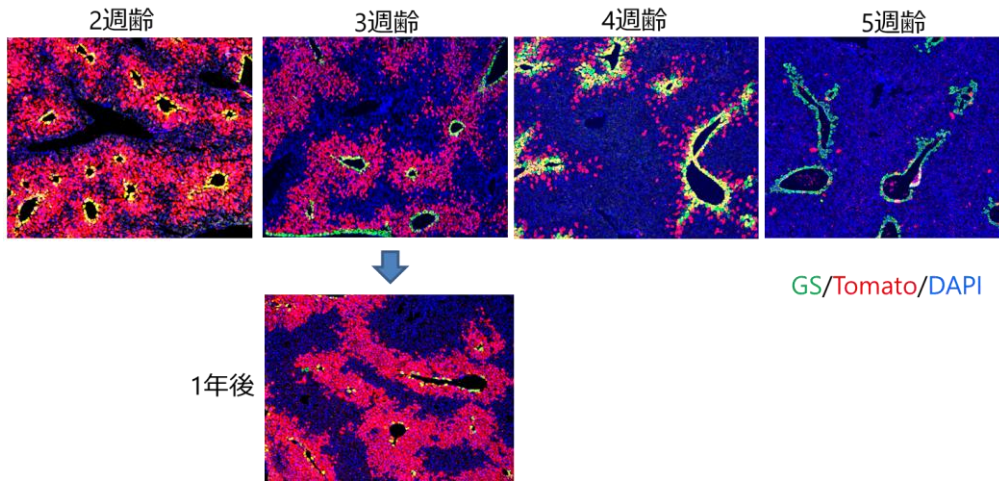


図 1. Axin2 陽性細胞の加齢に伴う変化と 3 週齢で標識後の細胞系譜解析

### 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(CD-HFD)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%、CD-HFD: 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 39%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(図 2, 3)。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(9.9 個 v.s.10.6 個)、Tomato 陰性腫瘍の数が有意に増加していた(8.4 個 v.s.1.9 個)。

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%)、HFD を負荷することで RFP 陽性領域が減少していた(28%)。興味深いことに CD-HFD モデルでも非腫瘍部の Tomato 陽性領域は減少していた(22%)。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%)。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。これらの結果から、zone3 肝細胞は高い発癌ポテンシャルを持つ一方で、非腫瘍部の再生様式の違いが zone3 由来肝細胞癌の頻度の違いを生んでいると推察された。

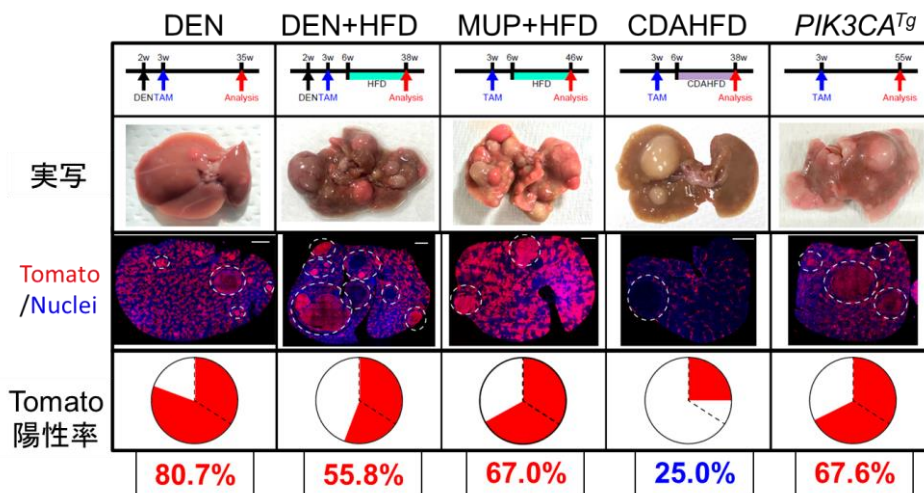


図 2. 各種肝癌モデルにおける Axin2 陽性細胞の細胞系譜解析

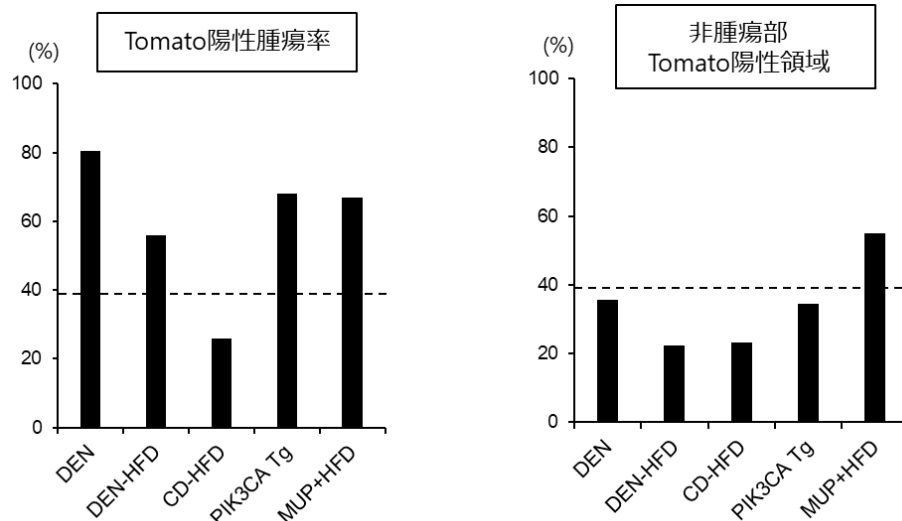


図3. 各種肝癌モデルにおける Tomato 陽性腫瘍率と非腫瘍部の Tomato 陽性領域率

#### Wnt/ $\beta$ カテニン経路を標的とした発癌抑制の可能性

$\beta$ カテニンの活性化型変異は肝細胞癌の約30%にみられ、特に発癌初期に同経路の活性化が重要である可能性が示唆されている。一方で、DEN誘発性肝癌は $\beta$ カテニン経路の変異はないことが報告されており、事実今回我々が作製したモデルにおいても、 $\beta$ カテニン活性化の下流因子で同経路活性化のサロゲートマーカーである glutamine synthetase (GS)の発現は認められなかった。しかしながら5か月齢のDEN投与 Axin2-Tomato マウスにおける中心静脈周辺の前癌病変を観察してみると、Tomato 陽性の前がん病変において GS が共発現していた。これらの所見から、zone3におけるWnt/ $\beta$ カテニン活性化ニッチが、肝発癌の初期プロセスに重要な役割を果たしている可能性を考えた。そこで野生型マウスに対して2週齢でDENを投与し、2か月齢から5か月齢の肝癌 promotion phase と考えられる期間にWnt阻害剤 LGK974 を投与、8か月齢で肝発癌に与える影響を検討した。その結果、肝発癌が有意に抑制された(図4)。したがって、中心静脈周囲のWnt/ $\beta$ カテニン活性化ニッチが zone3 からの発癌に重要な役割を果たしており、同経路の阻害が発癌抑制に有望な可能性が示唆された。

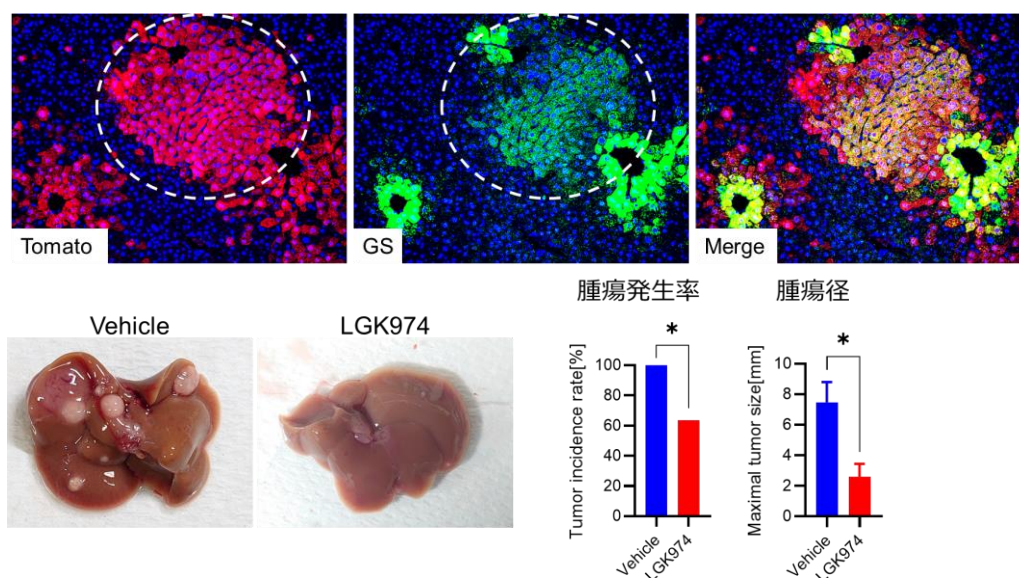


図4 前癌病変におけるGS発現とWnt阻害剤による発癌抑制効果

#### 肝障害時のAxin2陽性細胞の細胞系譜解析

次に肝障害下におけるAxin2陽性細胞の意義について解析を行った。5週齢のMUP-uPAマウスにRosa-lox-stop-lox-Tomatoレポーターマウスを交配させ解析したところ、Axin2陽性細胞は6%から10%へ増加し、さらにzone3に限らず、zone1やzone2にも存在することがわかった。次の



で Axin2 陽性細胞を標識した MUP-uPA マウスに高脂肪食を摂取させ、NASH 肝癌モデルを作製し、細胞系譜解析を行った。9 か月後に解析した結果、肝細胞の 80%以上が Tomato 陽性細胞によって置換され、さらにできた腫瘍の 80%以上が Tomato 陽性であった (図 5)。すなわち、肝障害下の Axin2 陽性細胞は、旺盛な増殖能を有すると同時に、発癌起源にもなり得ることが明らかとなった。

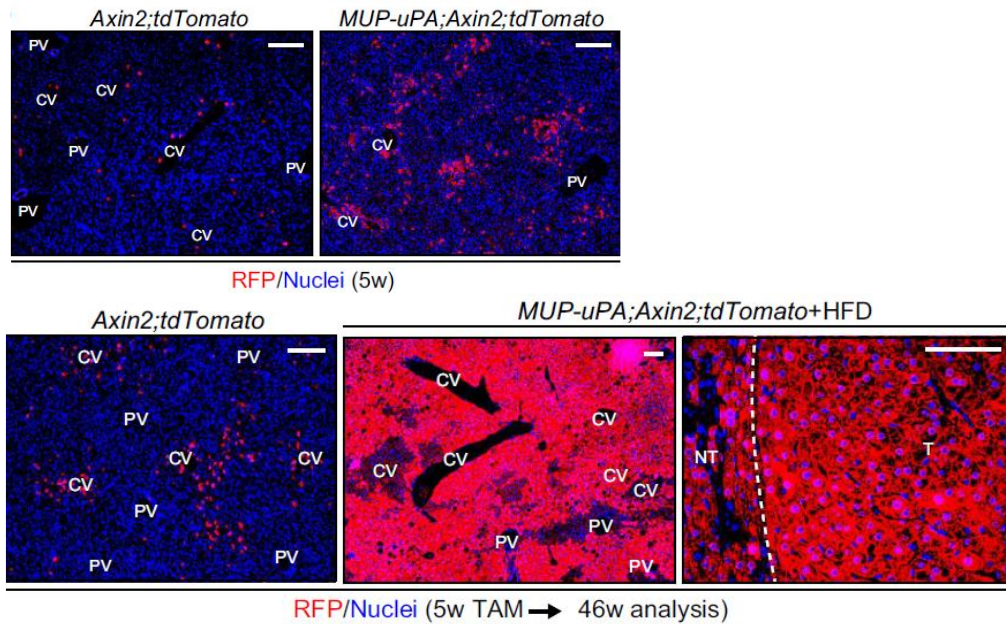


図 5. MUP-uPA マウスを用いた肝障害時の Axin2 陽性細胞の細胞系譜解析

#### 発癌起源部位と metabolic phenotype との関係性

近年肝細胞癌を metabolic zonation の観点から分類する研究が行われており、例えば肝細胞癌をその発現パターンから zone1 signature と zone3 signature の subclass に分けて解析すると、zone1 signature のほうが予後がよいと報告されている。しかしながらそのような metabolic phenotype が発癌の過程で獲得されたものなのか、発癌母地に由来するものなのかは明らかとなっていない。そこで今回の研究で作成した様々なマウスモデルに生じた腫瘍の metabolic phenotype を解析し、発癌母地とその発現パターンを解析した。すると今回検討した肝腫瘍のほとんどが E-cadherin や CPS1 といった zone1 marker を発現する一方で、GS や CYP2E1 といった zone3 マーカーを発現しておらず、zone1 signature に分類された。さらにこの傾向は Tomato 陽性の zone3 由来肝癌でも、Tomato 陰性の zone1-2 由来肝癌でも同様であった (図 6)。したがって、肝癌の metabolic phenotype は発癌母地ではなく、発癌の過程で獲得されるものであることが明らかとなった。

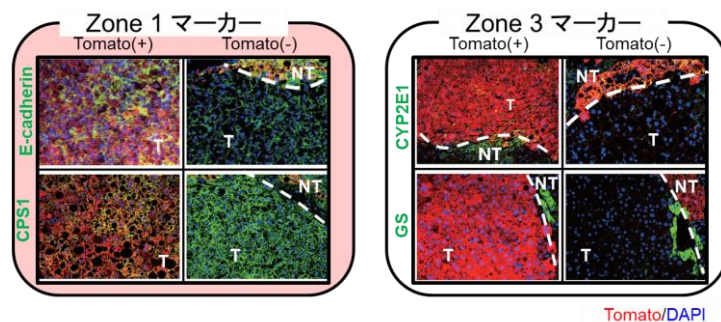


図 6. 肝細胞癌における metabolic phenotype と発癌起源部位との関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川 勇人
2. 発表標題 肝細胞癌における微小環境解析の最新知見
3. 学会等名 第82回癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hayato Nakagawa
2. 発表標題 Genomic and molecular profiling-based personalized medicine for liver cancer.
3. 学会等名 APASL Oncology（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究分担者	中川 勇人  (Nakagawa Hayato)  (00555609)	三重大学・医学系研究科・教授    (14101)	

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