

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16004

研究課題名（和文）肝内胆管癌に対するPI3K阻害薬及びWee1阻害薬の臨床応用に係る基盤研究

研究課題名（英文）Investigation for clinical application of PI3K inhibitor and Wee1 inhibitor in intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

金子 卓（Kaneko, Takashi）

横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教

研究者番号：70588152

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：PIK3CA変異型、PTEN欠損型の2系統の新規肝内胆管癌マウスモデルを創出した。いずれの系統もTP53欠損を並存させることにより肝の腫瘍性病変の出現を認め、免疫組織化学染色の結果、肝内胆管癌と判断された。PIK3CA変異を有するHuh28細胞株で、KRAS変異を有するHuCC1細胞株に比して低濃度のAlpelisibでの増殖阻害効果が確認され、PIK3CA変異型胆道癌に対するAlpelisibの有効性が示唆された。また、Alpelisib、Adavosertibの2剤併用実験では、いずれの細胞株においても相乗的な増殖抑制効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ胆道癌の薬物治療開発は困難を極めており、がんゲノムプロファイルに基づくPrecision medicineの恩恵も限定的である。本研究では、PI3K経路亢進・Tp53欠損型の胆道癌に着目し、PIK3CA変異型、PTEN欠損型の2系統のPI3K亢進型の肝内胆管癌マウスモデルを創出した。また、培養細胞株を用いた検討により、Alpelisib、Adavosertibの2剤が相乗的な増殖抑制効果を示した。本研究を将来的なPI3K阻害薬とWee1阻害薬の臨床応用へと展開し、Precision medicineの実装化が期待される。

研究成果の概要（英文）：Two novel mouse models of intrahepatic cholangiocarcinoma, PIK3CA mutant and PTEN-deficient, were generated. Both strains showed neoplastic lesions in the liver due to co-existing TP53 deficiency, which were confirmed to be intrahepatic cholangiocarcinoma by immunohistochemical analysis. The PIK3CA mutated Huh28 cell line showed growth inhibition with a lower concentration of alpelisib than the KRAS mutated HuCC1 cell line, suggesting that alpelisib is effective against PIK3CA mutated biliary tract carcinoma. The combination of Alpelisib and Adavosertib showed synergistic growth inhibition in both cell lines.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆道癌 PI3K阻害薬 Wee1阻害薬 マウスモデル PIK3CA PTEN TP53 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

胆道癌の2023年罹患数予測は23,700人で、全癌罹患数予測の2.2%(第15位)を占める比較的稀な癌種であるが、死亡予測数は18,300人と日本の癌死因の第6位を占める。世界的に増加傾向にあり、我が国を始めとするアジアや南米で特に罹患率が高いことが知られている。これまでに、ゲムシタビン、シスプラチン、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合薬といった殺細胞性の抗がん剤レジメンや、ゲムシタビン、シスプラチン療法に抗PD-L1抗体であるデュルバルマブを上乗せしたGCD療法が開発されてきたが、未だ予後不良の難治癌である。

胆道癌におけるゲノム異常は、大腸癌や膵癌などに比して多様性に富むことが知られ、高度に個別化したプレシジョン・メディシンの必要性が提唱されてきた(J Clin Oncol. 2022;40(24):2716-2734)。本邦においても、2019年より標準治療終了あるいは終了見込みの固形癌患者を適応として、がんゲノムプロファイリング検査が保険承認され、検査結果に基づくコンパニオン診断薬としてFGFR2融合遺伝子陽性胆道癌に対するペミガチニブ、NTRK1/2/3融合遺伝子陽性の固形癌に対するエヌトレクチニブ及びラロトレクチニブ、また、上述のGCD療法の保険承認後の臨床的意義は乏しいが、TMB-H (Tumor mutation burden High) 及びMSI-H (Microsatellite instability High) の固形癌に対するペムプロリズマブがコンパニオン化されてきた。しかしながら、胆道癌におけるこれらの遺伝子変化の頻度は各々、FGFR2融合遺伝子: 10-20%程度、NTRK1/2/3融合遺伝子: 極めて希少、TMB-H及びMSI-H症例: 2-5%程度とされ、薬剤到達性は未だ低い現状にあり、一刻も早い薬剤・レジメン開発が求められている。

## 2. 研究の目的

肝内胆管癌に対する大規模なゲノム解析が実施され、新規治療標的分子の同定が進められてきたが、PTEN, PIK3CA, PIK3R1, AKT, LKB1等の、PI3K経路の亢進を導く遺伝子の変異や増幅を認めるケースは相当数(11.8-22.2%程度)存在することが報告されている(Nat Commun. 2014;5:5696)。PI3K経路は、細胞増殖やエネルギー代謝に深く関わる癌化経路の一つとして知られてきたが、最近、FDAにおいて新規PI3K阻害薬のAlpelisibが乳癌に対して認可され、今後のPrecision medicineの実装においては有望な治療標的の一つとして期待されている。

またTP53は、かつてより癌抑制遺伝子の一つとして知られ多くの癌種において変異が報告され、肝内胆管癌においても最多変異遺伝子として報告されている(38.2%, Nat Commun. 2014;5:5696)。Tp53を標的とした薬剤開発は困難を極めてきたが、最近、Tp53欠損腫瘍に対するWee1阻害薬(Adavosertib)の有用性が報告されている。Tp53機能欠損細胞ではDNA損傷応答(DNA Damage Response: DDR)時にG1 check pointが機能せず、G2/M check pointのみに依存するが明らかとなっているが、Wee1阻害薬(Adavosertib)は、G2/M check pointの中心を担うWee1を阻害することで、DNA修復を阻害してアポトーシスへと導くことを狙った新機軸の阻害薬であり、シスプラチンや放射線治療等との併用が模索されている。

本研究課題では、未だ困難を極める進行胆道癌の化学療法において、Precision medicineの実践を図るべく、PI3K経路亢進・Tp53欠損型の肝内胆管癌に着目しPI3K阻害薬の臨床応用、並びにWee1阻害薬の臨床応用に向けた基盤研究の実施を主たる目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1.新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデルの創出

肝内胆管上皮細胞においてプロモータ活性を有するCreマウスと、ROSA26-LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>マウス、PTEN floxマウス、TP53 floxマウスの交配実験を行い、病理組織学的検討を行った。

### 2. RNAseq解析によるPI3K亢進型胆道癌の分子基盤の解明

1.にて創出した新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデルより樹立した3次元オルガノイド細胞株に対し、RNAseq解析を行い、その遺伝子発現プロファイルの比較・検討を行なった。

### 3.ヒト培養胆道癌細胞株、及び新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデル由来オルガノイドを用いた薬剤実験

ヒト培養胆道癌でPIK3CA変異・TP53変異を有するHuh28と、KRAS変異・TP53変異を有するHuCCT1、及び新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデルより樹立した3次元オルガノイド細胞株に対し、PI3K阻害薬(Alpelisib)、Wee1阻害薬(Adavosertib)の薬剤実験を行い、細胞増殖抑制効果を検討した。

## 4. 研究成果

### 1.新規PI3K亢進・Tp53欠損型胆道癌マウスモデルの創出

Foxa3-Creマウスと、ROSA26-LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>マウス、PTEN floxマウス、TP53 floxマウスの交配実験を行った結果、Foxa3-Cre; ROSA26-LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>; TP53<sup>flox/flox</sup>マウス、Foxa3-Cre; PTEN<sup>flox/flox</sup>; TP53<sup>flox/flox</sup>マウスの2系統の肝内胆管癌マウスモデルを創出した。いずれ

の系統も *TP53* 欠損を並存させることにより 4-5 ヶ月齢で肝に多発の腫瘍性病変の出現を認め、免疫組織化学染色の結果、腫瘍細胞は Pan-CK(AE1/AE3) 陽性・CK7 陽性、Albumin 陰性であり、肝内胆管癌と判断された。 *Foxa3-Cre; ROSA26-LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>* マウス、 *Foxa3-Cre; PTEN<sup>fl/fl</sup>* マウスは、いずれも脂肪肝を認めるのみで、4-5 ヶ月齢での腫瘍形成を認めなかった。 また、 *Foxa3-Cre; TP53<sup>fl/fl</sup>* マウスでは、明らかな形態学的異常を認めなかった。 *Foxa3-Cre; ROSA26-LSL-Pik3ca<sup>H1047R/+</sup>; TP53<sup>fl/fl</sup>* マウス、 *Foxa3-Cre; PTEN<sup>fl/fl</sup>; TP53<sup>fl/fl</sup>* マウスの腫瘍組織では、Akt Ser473 のリン酸化が認められ、PI3K 経路の亢進が示唆された(Figure 1)。 また、 *PIK3CA* 変異型、 *PTEN* 欠損型の両系統より腫瘍オルガノイド細胞株を樹立し、NOD-SCID マウスの皮下への着生を確認した(Figure 2)。

*PIK3CA* 変異型、 *PTEN* 欠損型の 2 系統の PI3K 亢進型の肝内胆管癌マウスモデルは、いずれも背景に脂肪肝を伴うことから、胆管上皮細胞特異的なプロモータ活性を有する *K19-Cre* マウスを用いた同様の交配実験を行うとともに、食餌性脂肪肝が腫瘍発生にもたらす影響について、現在、追加の検討を行なっている。

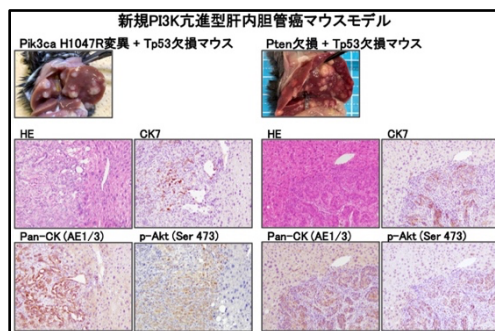


Figure 1: 新規 PI3K 亢進・Tp53 欠損型胆道癌マウスモデル

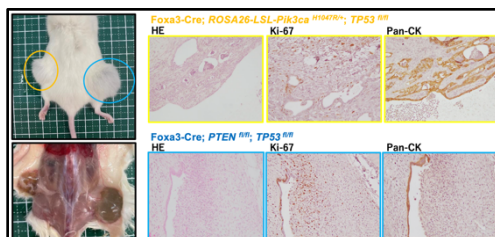


Figure 2: NOD-SCID マウスの皮下移植実験

## 2. RNAseq 解析による PI3K 亢進型胆道癌の分子基盤の解明

マウス正常肝内胆管癌オルガノイドと、上記の *PIK3CA* 変異型、 *PTEN* 欠損型の 2 系統のマウス肝内胆管癌オルガノイドより RNA を抽出し、RNAseq 解析を実施した。いずれの系統も PI3K 経路標的遺伝子の発現変化を認めた。現在、両者の詳細な比較と、腫瘍化に係る責任遺伝子の検討を行なっている。

## 3. ヒト培養胆道癌細胞株、及び新規 PI3K 亢進・Tp53 欠損型胆道癌マウスモデル由来オルガノイドを用いた薬剤実験

Alpelisib, Adavosertib に対する 50%増殖阻害濃度 (GI50) を WST-8 assay により検討した結果、各々、Huh28 細胞株で Alpelisib(GI50): 0.96  $\mu$  M, Adavosertib(GI50): 0.63  $\mu$  M, HuCCT1 細胞株で Alpelisib(GI50): 2.25  $\mu$  M, Adavosertib(GI50): 0.09  $\mu$  M であった。

*PIK3CA* 変異を有する Huh28 細胞株では、*KRAS* 変異を有する HuCCT1 細胞株に比して低濃度の Alpelisib での増殖阻害効果が確認され、*PIK3CA* 変異型胆道癌に対する Alpelisib の有効性が示唆された。一方、Adavosertib については、Huh28 細胞株に比して HuCCT1 細胞株の方が、より低濃度で増殖阻害効果が確認された。DNA 複製ストレスが惹起された腫瘍細胞は Wee1 阻害薬に脆弱であることが知られていることから、Huh28 細胞株に比して HuCCT1 細胞株の増殖サイクルが短いことに起因する可能性を現在検討している。

また、Alpelisib, Adavosertib の 2 剤併用実験では、いずれの細胞株においても相乗的な増殖抑制効果が確認された(Figure3)。

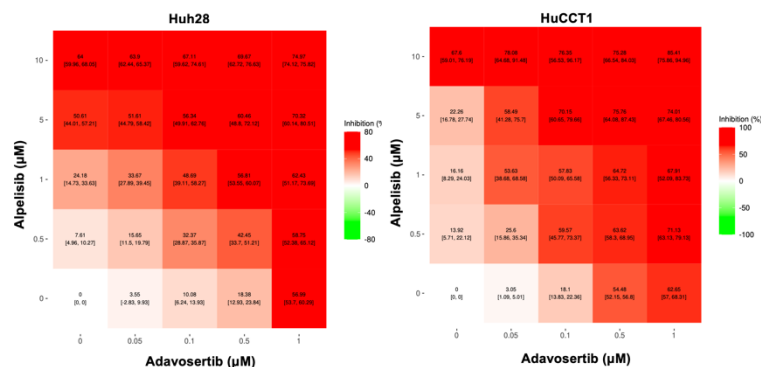


Figure 3: Huh28 及び HuCCT1 に対する Alpelisib と Adavosertib 併用による増殖阻害

新規 PI3K 亢進・Tp53 欠損型胆道癌マウスモデル由来オルガノイドでは、*PIK3CA* 変異型は、*PTEN* 欠損型に比して低濃度の Alpelisib で増殖抑制効果がもたらされる傾向を確認しており、現在、複数のオルガノイド細胞株を樹立して検証を行なっている。また、*PIK3CA* 変異型、*PTEN* 欠損型の 2 系統のマウスモデルへの薬剤投与実験を開始している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishii Tomohiro, Kaneko Takashi, Murakami Ayumi, Ueda Michio, Sugimori Kazuya, Kawana Ichiro, Maeda Shin	4. 巻 55
2. 論文標題 New image-enhanced cholangioscopy for the diagnosis of cholangiocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endoscopy	6. 最初と最後の頁 E139 ~ E140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-1956-0967	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 -

1. 著者名 Kaneko Takashi, Sugimori Kazuya, Endo Kazuki, Nishimura Masaki, Tozuka Yuichiro, Miwa Haruo, Maeda Shin	4. 巻 55
2. 論文標題 Usefulness of the two-devices-in-one-channel technique for difficult bile duct intubation in patients without periampullary diverticulum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endoscopy	6. 最初と最後の頁 E76 ~ E77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-1930-6258	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 -

1. 著者名 Miwa Haruo, Numata Kazushi, Sugimori Kazuya, Kaneko Takashi, Maeda Shin	4. 巻 48
2. 論文標題 Vascular evaluation using transabdominal ultrasound for gallbladder polyps	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 159 ~ 173
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10396-020-01008-8	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Miwa Haruo, Sugimori Kazuya, Ishii Tomohiro, Funaoka Akihiro, Tsuchiya Hiromi, Suzuki Yoshimasa, Sugimori Makoto, Nishimura Masaki, Tozuka Yuichiro, Komiyama Satoshi, Sato Takeshi, Kaneko Takashi, Numata Kazushi, Maeda Shin	4. 巻 60
2. 論文標題 Multiple-line Chemotherapy for a Patient with Unresectable Mucinous Cystic Neoplasm of the Pancreas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2607 ~ 2612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.6755-20	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Haruo Miwa, Kazuya Sugimori, Hiromi Tsuchiya, Masaki Nishimura, Yuichiro Tozuka, Takashi Kaneko, Shin Maeda	4. 巻 10
2. 論文標題 Safe removal of lumen-apposing metal stent using argon plasma coagulation after EUS-guided cyst gastrostomy (with video)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endoscopic Ultrasound	6. 最初と最後の頁 309 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/EUS-D-20-00211	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ishii Tomohiro, Kaneko Takashi, Suzuki Yuichi, Nishimura Masaki, Sugimori Kazuya, Kawana Ichiro, Maeda Shin	4. 巻 -
2. 論文標題 Salvage technique for endoscopic stent removal using a thin-tipped balloon catheter during endoscopic ultrasound-guided hepaticoduodenostomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endoscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1694-3617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 金子卓, 杉森一哉, 遠藤和樹, 土屋洋省, 西村正基, 三箇克幸, 戸塚雄一朗, 佐藤健, 入江邦泰, 三輪治生, 沼田和司, 前田愼	4. 巻 42
2. 論文標題 非切除悪性肝門部胆管閉塞に対するinside stentの有用性.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 1433-1440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Haruo Miwa, Kazuya Sugimori, Yuto Matsuoka, Kazuki Endo, Masaki Nishimura, Yuichiro Tozuka, Takashi Kaneko, Shin Maeda
2. 発表標題 Utility of EUS-HGS for biliary obstruction with pancreatic cancer
3. 学会等名 53rd Japan pancreatic association annual meeting/ 26th International pancreatic association annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子卓, 杉森一哉, 加藤由子, 角田翔太郎, 松岡裕人, 遠藤和樹, 土屋洋省, 杉森慎, 西村正基, 戸塚雄一朗, 小宮山哲史, 三輪治生, 菊地祐太郎, 熊本宣文, 武田和永, 沼田和司, 前田慎
2. 発表標題 膵切除術後の早期合併症に対する内視鏡的治療の実際.
3. 学会等名 第103回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子卓
2. 発表標題 術前化学療法の際に最適な胆道ドレナージとは?
3. 学会等名 第58回日本胆道学会学術集会 ランチョンセミナー3
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋 洋省, 杉森 一哉, 松岡 裕人, 遠藤 和樹, 杉森 慎, 西村 正基, 戸塚 雄一朗, 小宮山 哲史, 三輪 治生, 金子 卓, 菊地 祐太郎, 熊本 宣文, 武田 和永, 沼田 和司, 國崎 主税, 前田 慎
2. 発表標題 当院での切除不能胆道癌に対するがんゲノム医療の実際.
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松岡 裕人, 杉森 一哉, 遠藤 和樹, 土屋 洋省, 杉森 慎, 西村 正基, 戸塚 雄一朗, 小宮山 哲史, 三輪 治夫, 金子 卓, 沼田 和司, 前田 慎
2. 発表標題 75歳以上の高齢者に対するInterventional EUSの安全性の検討.
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉森 慎, 前田 慎, 澤田 敦史, 平澤 欣吾, 三輪 治生, 金子 卓, 野崎 昭人, 杉森 一哉, 沼田 和司, 稲山 嘉明, 國崎 主税
2. 発表標題 新規PIK3CA変異型十二指腸腫瘍マウスモデルの創出とPI3K阻害薬の検討.
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三輪 治生, 杉森 一哉, 松岡 裕人, 遠藤 和樹, 土屋 洋省, 西村 正基, 戸塚 雄一朗, 金子 卓, 沼田 和司, 前田 慎
2. 発表標題 US-HGSのガイドワイヤー操作法におけるLoop techniqueの有用性.
3. 学会等名 JDDW2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子卓, 土屋洋省, 杉森慎, 西村正基, 戸塚雄一朗, 三輪治生, 杉森一哉, 沼田和司, 前田慎
2. 発表標題 高分化型膵神経内分泌腫瘍(膵NET)の経過観察例の実態.
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子卓, 杉森一哉, 前田慎
2. 発表標題 膵疾患に対するEUS診療の現況と新たな展開
3. 学会等名 第101回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村正基, 杉森一哉, 前田慎, 湯川達, 土屋洋省, 戸塚雄一郎, 小宮山哲史, 三輪治夫, 金子卓, 沼田和司
2. 発表標題 当院における自己免疫性膵炎に関する検討.
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪治生, 杉森一哉, 前田慎, 遠藤和樹, 土屋洋省, 西村正基, 杉森慎, 戸塚雄一郎, 小宮山哲史, 金子卓, 沼田和司
2. 発表標題 EUS-HGSの早期偶発症とトラブル・シューティング.
3. 学会等名 第101回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸塚雄一郎, 杉森一哉, 前田慎, 湯川達, 土屋洋省, 杉森慎, 西村正基, 小宮山哲史, 三輪治生, 金子卓, , 沼田和司
2. 発表標題 化学療法施行例における悪性肝門部胆管閉塞に対するInside stentの治療成績.
3. 学会等名 第101回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三輪治生, 杉森一哉, 前田慎, 湯川達, 土屋洋省, 杉森慎, 西村正基, 戸塚雄一郎, 小宮山哲史, 金子卓, 沼田和司
2. 発表標題 内視鏡的乳頭切除術における偶発症とトラブル・シューティング
3. 学会等名 第101回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 三輪治生, 杉森一哉, 湯川達, 土屋洋省, 杉森慎, 西村正基, 戸塚雄一郎, 小宮山哲史, 金子卓, 沼田和司, 前田慎
2. 発表標題 分枝型IPMNにおける術前診断法の検討.
3. 学会等名 JDDW 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋洋省, 湯川達, 西村正基, 戸塚雄一郎, 三輪治生, 金子卓, 杉森一哉, 沼田和司, 前田慎
2. 発表標題 EUS-HGS施行後のSEMS不全逸脱への対応.
3. 学会等名 JDDW 2021
4. 発表年 2021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
研究協力者	杉森 慎  (Sugimori Makoto)  (20876891)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教   (22701)	
研究協力者	前田 慎  (Maeda Shin)  (40415956)	横浜市立大学・医学研究科・教授   (22701)	

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