

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20801

研究課題名(和文)胆道腫瘍発生におけるKras、Wntシグナルの機能的役割とその分子機構の解析

研究課題名(英文)The analysis of the functional role of Kras and canonical Wnt pathways for tumorigenesis of biliary system.

研究代表者

長尾 宗政(Nagao, Munemasa)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20907860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：Hnf1b CreERT2マウスを用いて胆管・胆嚢上皮選択的に遺伝子改変を誘導できることを世界に先駆けて見出した。Hnf1b CreERT2マウスを用いて変異Kras存在下にWntシグナルを活性化させた結果、胆嚢および肝外胆管にそれぞれ前癌病変であるICPNおよびBillINが形成されることを見出した。さらに、形成した胆道腫瘍を3次元培養した後にマウスにゼノグラフトを行うことで、前癌病変が胆道癌へ進行すること、c-Mycが腫瘍促進的に働き、Tgf-βシグナルが発癌を抑制していることを明らかにし、筆頭著者として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで世界的にも胆道腫瘍マウスモデルはほとんど報告されていなかった。我々は研究期間を通じて、胆道上皮特異的に遺伝子改変ができる遺伝子改変マウスを発見し、Kras、Wntシグナルが胆道腫瘍を発生させるメカニズムを解析し、研究結果を報告した。これらの研究手法は胆道上皮における他の分子の機能的役割について解析することに応用ができるという点では非常に意義が大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We revealed that the Hnf1bCreER mouse is a suitable CreER mouse line for genetic manipulation in the extrahepatic biliary tract epithelium including the EHBD and GB for the first time. In mice, concurrent activation of Kras and Wnt pathways induced biliary neoplasms including ICPN and BillIN. The biliary neoplasm spheroids were established and these neoplasm spheroids were subcutaneously into NOD/SCID mice. The xenograft analysis showed that ICPN and BillIN were putative precursors to invasive biliary cancer. Mechanistically, c-Myc contributed to tumorigenesis, whereas the Tgfb pathway inhibited it. These results were reported.

研究分野：胆道腫瘍

キーワード：胆道癌 胆道腫瘍 Wnt Kras

1. 研究開始当初の背景

胆管癌や胆嚢癌は消化器癌の中で予後不良な癌の一つである。予後の改善のためには、早期診断および効果的な治療が不可欠である。そのためには、胆管癌、胆嚢癌の発癌・進展メカニズムの解明が重要であるが、他の消化器癌と比較してもそのメカニズムは明らかになっていない。その原因の一つとして、胆管癌モデルマウスが確立していないということが挙げられる。胆管癌および胆嚢癌の前癌病変として微小乳頭状病変である Biliary intraepithelial neoplasia (BillIN)、乳頭状病変である intraductal papillary neoplasm of the bile duct (IPNB) や Intracystic papillary neoplasms (ICPN) が中沼らによって提唱された。しかし、前癌病変の発生メカニズムや、癌への進展メカニズムについては明らかになっていない。胆管癌の全ゲノム解析では Kras(16.5%)、Wnt 関連遺伝子である APC(7.1%)、RNF43(4.7%)、CTNNB1(1.3%)の変異が比較的多いと報告されているものの、その変異遺伝子が癌化にどのような影響を及ぼすのか明らかにはなっていないため、本研究では胆道腫瘍発生における Kras と Wnt シグナルの役割について着目した。

2. 研究の目的

本研究では、上記背景を踏まえ、胆管腫瘍発生における Kras、Wnt シグナルの機能的役割とその分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Hnf1β*CreER マウスが肝外胆管上皮で遺伝子組み換えを行うために適したマウスであるかの検証

事前に、野生型成体マウスの肝内・肝外胆管、胆嚢上皮で *Hnf1β* が高発現していることを免疫染色にて確認していた。次に *Hnf1β* 陽性細胞が胆管子孫細胞を供給することを検討するため、*Hnf1β*CreER; *Rosa-LacZ* マウスを作成し、*Hnf1β* 細胞を青くマークし細胞系譜解析を行った。タモキシフェン投与後、2 日、4、12 週間で肝外胆管、胆嚢上皮がマークされており、*Hnf1β* 陽性細胞が胆管子孫細胞を供給することについても明らかとなっていた。今回、追加検証として、*Hnf1β*CreER; *Rosa26-tdTomato* マウスを作成して、*Hnf1β* 細胞を赤くマークし遺伝子組み換え効率の評価を行った。

(2) 胆管腫瘍発生における Kras、Wnt シグナルの機能的役割の解析

β カテニンをエンコードする遺伝子 *Ctnnb1* の exon3 をノックアウトすることにより、 β カテニンが安定化され、Wnt が恒常的に活性化されることが知られている。胆管上皮における活性化 Kras、Wnt シグナルの活性化の与える影響をそれぞれ解析するため、*Hnf1β*-CreER マウスと *LSL-Kras^{G12D/+}*、*Ctnnb1^{lox(ex3)/+}* マウスを交配させて、*Hnf1β*-CreER (*H*)、*Hnf1β*-CreER;*LSL-Kras^{G12D/+}* (*HK*)、*Hnf1β*-CreER; *Ctnnb1^{lox(ex3)/+}* (*Hβ*)、*Hnf1β*-CreER; *LSL-Kras^{G12D/+}*; *Ctnnb1^{lox(ex3)/+}* (*HKβ*) マウスを作成する。これまでの検討の結果、*HKβ* マウスでは肝外胆管に BillIN、胆嚢に ICPN が形成されることが明らかになっているが、*HKβ* マウスの胆道腫瘍のムチン形質などの各種免疫染色を行う。

(3) マウス BillIN および ICPN が前癌病変であるかの検討

Hnf1β は腸や肺にも発現しているため、肺や腸でも遺伝子組み換えが起きて腫瘍が形成されるため、*HKβ* マウスの長期観察は困難であった。*H*、*HK*、*Hβ*、*HKβ* マウスのタモキシフェン投与後の胆管上皮・胆管腫瘍上皮を採取し、胆道腫瘍スフェロイドを樹立し、免疫不全マウスに xenograft

して長期観察することで、胆道癌が形成されるかどうか、即ちマウス BiliN および ICPN が前癌病変であるかを明らかにする。

(4) 胆道スフェロイドを用いた遺伝子発現および胆道腫瘍発生のメカニズム解析

上述の *H*, *HK*, *Hβ*, *HKβ* マウスから胆道腫瘍スフェロイドを樹立し、網羅的な遺伝子発現解析を行う。*H*, *HK*, *Hβ* 胆道スフェロイドと比較して *HKβ* 胆道スフェロイドで発現の差の大きい遺伝子もしくはシグナル経路を探索する。また、網羅的解析で発見した分子が胆道腫瘍形成および癌化においてどのような機能的役割をしているのか、樹立した胆道スフェロイドを用いて、*in vitro* で検討する。

(5) ヒト ICPN における *Kras*、*Wnt* シグナルの発現解析

ヒト ICPN の手術標本を用いて、p-ERK や β カテニンなどの免疫染色により *Kras*、*Wnt* シグナルの発現を解析する。また、マウスを用いた腫瘍形成のメカニズム解析において発見した分子について、ヒトの ICPN でも発現がみとめられるかどうか、免疫染色によって蛋白発現を評価する。

4. 研究成果

(1) *Hnf1βCreER* マウスが肝外胆管上皮で遺伝子組み換えを行うために適したマウスである

Hnf1βCreER; *Rosa-LacZ* マウスを作成し、*Hnf1β* 細胞を青くマークし細胞系譜解析の結果、*Hnf1β* 陽性細胞が胆管子孫細胞を供給することが明らかとなっていた。*Hnf1βCreER* マウスの遺伝子組み換え効率を検証するため、*Hnf1βCreER*; *Rosa26-tdTomato* マウスを作成して、*Hnf1β* 細胞

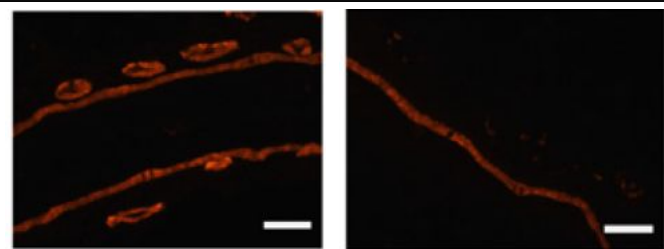


図 1 *Hnf1βCreER*; *Rosa26-tdTomato* マウスで肝外胆管（左）胆嚢上皮（右）において高率に赤くマークされていた

細胞を赤くマークし遺伝子組み換え効率の評価を行った。タモキシフェン投与 2 日後の肝外胆管、胆嚢上皮細胞は高率に赤くマークされていた(図 1)。*Hnf1βCreER* マウスが肝外胆管、胆嚢上皮で高率に遺伝子組み換えを起こすことができることを示した。

(2) 肝外胆管、胆嚢上皮で *Kras*、*Wnt* シグナルを活性化させることで肝外胆管に BiliN、胆嚢に胃型 ICPN が形成した

胆管上皮における活性化 *Kras*、*Wnt* シグナルの活性化の与える影響をそれぞれ解析するため、*H*, *HK*, *Hβ*, *HKβ* マウスを作成して評価を行ったところ、*HKβ* マウスでは肝外胆管に BiliN、胆嚢に ICPN が形成されることが明らかになっていた。マウスの胃型形質

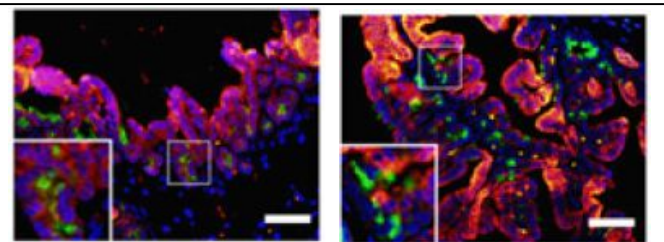


図 2 *HKβ* マウスでは肝外胆管に BiliN、胆嚢に ICPN が形成し、これらの腫瘍は胃型の形質をもっている

質の評価として使用される GS2 の免疫染色にて *HKβ* マウスの BiliN と ICPN では発現が見られ、胃型形質を有していることを示した(図 2)。

(3) マウス BiliN および ICPN は前癌病変である。

H, HK, H β , HK β マウスのタモキシフェン投与後の胆管上皮・胆管腫瘍上皮から胆道腫瘍スフェロイドを樹立し、免疫不全マウスに xenograft したところ、HK β スフェロイドでのみ 24 例中 2 例で胆道癌を形成した。この結果より、HK β マウスで形成される BillN、ICPN は前癌病変であることが示された(図 3)。

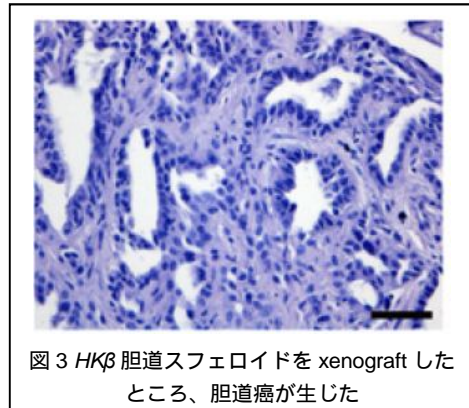


図 3 HK β 胆道スフェロイドを xenograft したところ、胆道癌が生じた

(4) 胆道スフェロイドを用いた遺伝子発現および胆道腫瘍発生のメカニズム解析

H, HK, H β , HK β マウスから胆道腫瘍スフェロイドを樹立し、網羅的な遺伝子発現解析を行った。H, HK, H β 胆道スフェロイドと比較して HK β 胆道スフェロイドでは gene set 解析で Wnt シグナル、TGF β シグナルの gene set の発現が上昇していた。また個々の遺伝子では c-Myc、Cancer Stem Cell marker である Aldh1a1 の発現が上昇していた。

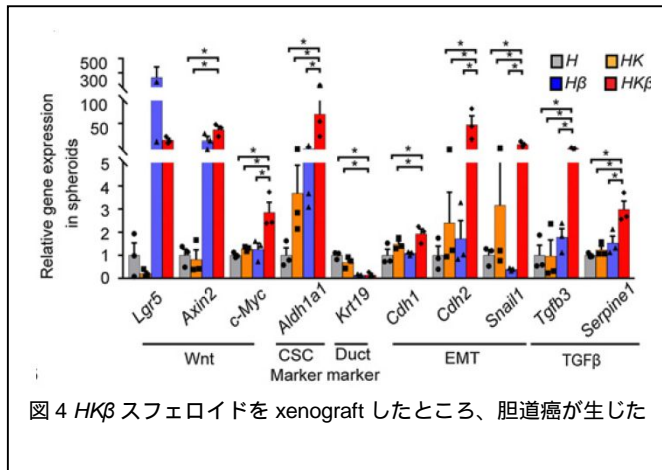


図 4 HK β スフェロイドを xenograft したところ、胆道癌が生じた

(図 4)。その中でも c-Myc、TGF β シグナルに着目して、HK β スフェロイドに

おける機能的解析を行った。その結果、c-Myc は HK β スフェロイドに腫瘍促進的に働き、Tgf β シグナルは腫瘍抑制的に働くことを示した。

(5) ヒト胃型 ICPN における免疫染色の結果は HK β マウスの胆道腫瘍の結果に矛盾しない

ヒト胃型 ICPN の手術標本での免疫染色の結果、 β カテニンで 9/12 例、p-ERK で 9/12 例、C-MYC, p-SMAD3, ALDH1A1 は全例で陽性であった。これらの結果は HK β マウスで生じる BillN、ICPN での結果と矛盾しないということが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagao Munemasa, Mizukoshi Kenta, Nakayama Shinnosuke, Namikawa Mio, Hiramatsu Yukiko, Maruno Takahisa, Nakanishi Yuki, Tsuruyama Tatsuaki, Fukuda Akihisa, Seno Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 p53 protects against formation of extrahepatic biliary precancerous lesions in the context of oncogenic Kras	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 276 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.28380	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 Nagao Munemasa, Fukuda Akihisa, Seno Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 The role of Kras and canonical Wnt pathways for tumorigenesis of extrahepatic biliary system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 54 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.28349	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 Nagao M, Fukuda A, Omatsu M, Namikawa M, Sono M, Fukunaga Y, Masuda T, Araki O, Yoshikawa T, Ogawa S, Masuo K, Goto N, Hiramatsu Y, Muta Y, Tsuda M, Maruno T, Nakanishi Y, Taketo MM, Ferrer J, Tsuruyama T, Nakanuma Y, Taura K, Uemoto S, Seno H.	4. 巻 2176
2. 論文標題 Concurrent activation of Kras and canonical Wnt signaling induces premalignant lesions that progress to extrahepatic biliary cancer in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Res.	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) 10.1158/0008-5472.CAN-21-2176	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長尾宗政、福田 晃久、水越 健太、岩根 康祐、河相 宗矩、山川 剛、尾松 万悠紀、並川 実桜、園 誠、益田 朋典、平松 由紀子、丸野 貴久、中西 祐貴、妹尾 浩
2. 発表標題 Kras および WNT signaling の活性化により肝外胆管・胆嚢に前癌病変が形成され、胆道癌に進展する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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