

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09039

研究課題名(和文) 硬化性胆管炎マウスモデルを用いた胆管癌起源細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of cancer initiating cells using a mouse model of cholangitis-associated cholangiocarcinoma

研究代表者

内野 康志 (Uchino, Koji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00748725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆管上皮細胞特異的にKras, TGFbR2, E-cadherinの3つの遺伝子変異を導入することによって、胆管壁浸潤型の肝外胆管癌マウスモデルを樹立することに成功し、その発癌機序を解明するとともに、治療標的の候補となる分子として炎症性サイトカインIL-33を同定した。さらに発癌過程を詳細に観察することによって、胆管癌が胆管周囲付属腺という胆管周囲にある腺組織から発生しうることを明らかにした。本モデルは胆管癌の発癌機序解明だけでなく、新たな予防法の開発や新規薬剤の前臨床試験など、様々な方面で有力なツールになると期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on the frequent mutations of Ras and TGFb pathways in ECC, we generated mice with tamoxifen-inducible duct cell-specific Kras activation and TGFbR2 deletion by crossing LSL-KrasG12D, Tgfr2flox/flox, and K19CreER mice (KT-K19CreER). However, KT-K19CreER mice did not develop biliary tumors. Next, to analyze the additional effect of E-cadherin loss, KT-K19CreER mice were crossed with CDH1flox/flox mice (KTC-K19CreER). KTC-K19CreER mice developed invasive periductal infiltrating ECC within 4 weeks. Time-course analysis revealed that recombined biliary epithelial cells (BECs) lining the bile duct lumen died due to E-cadherin loss, whereas recombined cells could survive in the peribiliary glands (PBGs). Dying BECs released IL-33 and stimulated a regeneration by PBGs via type 2 innate lymphoid cells, eventually leading to ECC. Cell lineage tracing suggested PBGs as the cellular origin of ECC. This mouse model provides new insight into biliary injury-based ECC development.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆管癌 IL-33 オルガノイド 胆管周囲付属腺

### 1. 研究開始当初の背景

胆管癌は発生部位によって肝内胆管癌と肝外胆管癌に分類され、いずれも予後不良であるため、新たな治療・予防法の開発が望まれる。胆管癌発症の危険因子として、原発性硬化性胆管炎 (PSC)・肝吸虫症などが知られ、その基盤に慢性炎症の存在が示唆されているが、その発症機構は不明な点が多い。また近年肝内外の大型胆管において、胆管周囲付属腺に胆管前駆細胞が存在し、癌起源細胞となり得るとの説が提唱されている。しかし胆管癌、特に肝外胆管癌の適切な動物モデルがないため、エビデンスレベルの高い報告はない。そこで本研究は、新規肝外胆管癌病態モデルの樹立を目的として開始された。

### 2. 研究の目的

新規肝外胆管癌病態モデルを樹立し、その発癌機構、起源細胞の解明、さらには治療標的の探索を目的とする。

### 3. 研究の方法

マウスの胆管上皮細胞特異的に遺伝子改変を導入することによって、肝外胆管癌モデルを樹立し、その発癌過程を解析することによってその起源細胞を同定した。さらにマウス肝外胆管からオルガノイドを培養し、その発癌メカニズムを解析した。またマウスで得られた所見をヒト検体によって検証した。

### 4. 研究成果

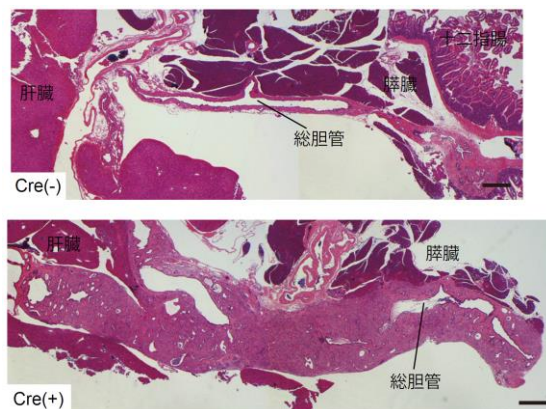
#### (1) 肝外胆管癌マウスモデルの樹立

最近の次世代シーケンサーによる解析で、ヒト胆管癌では Ras 経路および TGF/Smad 経路の遺伝子異常が高頻度に存在することがわかっている。そこでまずタモキシフェン依存的に K19 陽性細胞で Cre を発現する *K19-Cre<sup>ERT</sup>* マウスと、*LSL-Kras<sup>G12D</sup>* マウス・*Tgfbr2<sup>F/F</sup>* マウスを交配させ、肝内胆管、肝外胆管、胆嚢を含めた胆管上皮全域にわたって、Kras 活性化・TGFβR2 欠損を誘導するマウス (*KT-K19Cre<sup>ERT</sup>*) を作製した。遺伝子改変効率は、いずれの胆道領域においても 40%程度であった。しかし *KT-K19Cre<sup>ERT</sup>* マウスは肝外胆管上皮の軽度過形成を生じるのみで、胆管癌は発症しなかった。

そこでさらなる胆管癌発症促進因子が必要と考え、以前肝臓において接着因子 E-cadherin (*CDH1*) を欠損させると肝癌発症を著明に促進させることを見出していたことから、上記マウスに *CDH1<sup>F/F</sup>* マウスを交配させたマウス (*KTC-K19Cre<sup>ERT</sup>*) を作製した。すると驚くべきことに TAM 投与わずか 4 週で肝外胆管全長に渡り上皮を這って進展する胆管浸潤型胆管癌を発症した (右図)。また興味深いことに、肝内末梢胆管の変化は肝内外の大型胆管に比べ非常に軽度であり、遺伝子異常に対する反応性は胆管の部位によって異なることが示唆された。

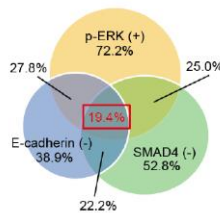
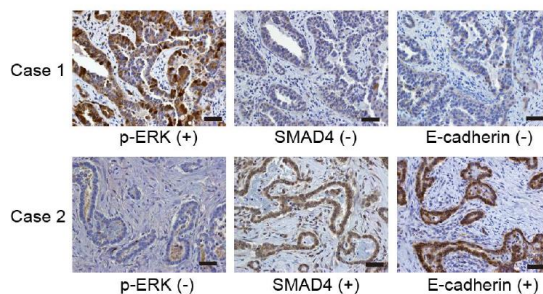
本マウスモデルでは非常に低分化な成分

も存在しており、リンパ管侵襲、さらには周囲リンパ節への転移も認められた。加えて、ヒト胆管癌同様に腫瘍関連線維芽細胞や腫瘍関連マクロファージの浸潤も生じており、腫瘍微小環境も模倣したモデルであると考えられた。



#### (2) ヒト肝外胆管癌組織を用いた検討

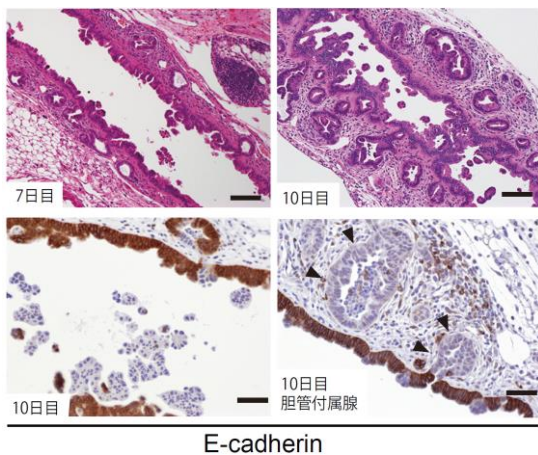
36 症例の肝外胆管癌切除検体を用いて、ヒトにおけるこれらの経路の異常の頻度を検討した。ERK リン酸化が 72.2%、SMAD4 発現低下が 52.8%、E-cadherin 発現低下が 38.9%に認められ、これら 3 つの異常を同時にあわせもつ腫瘍が 19.4%に認められることが分かった。



#### (3) 肝外胆管癌の発癌過程

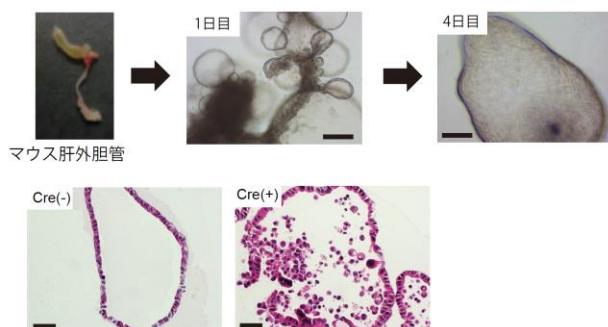
胆管上皮幹/前駆細胞および癌起源細胞の存在部位はまだ明らかとなっていないが、最近、胆管上皮下でネットワークを形成する胆管周囲付属腺内に前駆細胞が存在し、癌の起源細胞ともなり得るとの説が提唱され注目されている。そこで本マウスの発癌過程を詳細に解析した。すると、タモキシフェン投与 1 週間後から胆管表層上皮細胞がボロボロと胆管内腔に脱落し、胆管周囲に強い炎症反応が観察された。遺伝子改変細胞の細胞系譜を

追跡すると、胆管表層では遺伝子改変細胞が E-cadherin 欠損に伴い脱落し、正常細胞に修復されていく一方で、胆管付属腺内では遺伝子改変細胞が生存しつづけることができるニッチが存在することがわかった（次項図）。さらに胆管付属腺では、胆管障害に対する修復反応として強い増殖反応が起き、次第に胆管付属腺が異型性をもって増大していく様子が観察された。すなわち、E-cadherin 欠損により生じる胆管上皮障害が代償性の炎症・胆管再生反応を誘導するが、その反応が結果として胆管付属腺からの発癌を促進していることが明らかとなった。実際に PSC や肝内結石症患者では、胆管付属腺の増生や付属腺内の Kras 変異の存在が報告されており、本モデルは慢性胆管障害からの発癌過程を模倣し、機序解明に有力なツールになると考えられた。

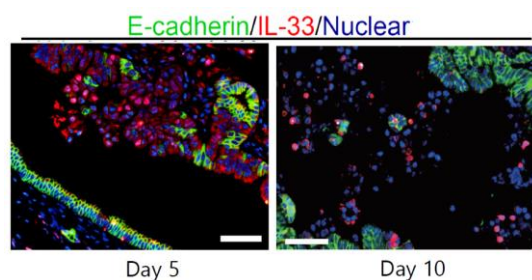


#### (4) 肝外胆管オルガノイドを用いた解析

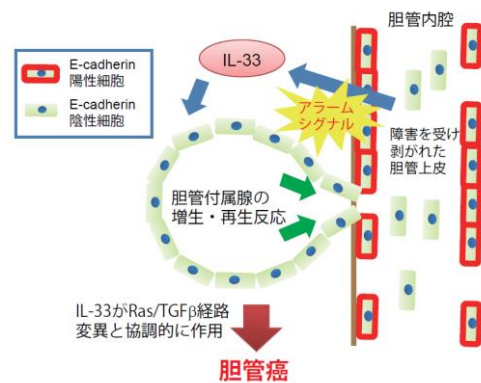
さらに発癌機序を明らかにするため、マウス肝外胆管からオルガノイド培養法を確立し、Cre 陰性 *KTC* マウスからオルガノイドを作製、Cre 発現レンチウイルスで遺伝子変異を導入した。すると興味深いことに、胆管上皮細胞が脱落していく現象がオルガノイドでも再現された。次いでこのオルガノイドを免疫不全マウスの皮下に移植することによって、in vivo 同様の腺癌を形成することにも成功した。すなわち、胆管オルガノイドを用いることで in vivo の現象を試験管内で再現でき、かつ胆管上皮内に起きている変化を周囲の環境と切り離して解析することが可能となった（下図）。



(5) 肝外胆管癌進展における IL-33 の関与 *KTC* マウス由来オルガノイドを用いてマイクロアレイを行ったところ、3 つの遺伝子改変によって炎症性サイトカイン IL-33 の発現が著明に上昇していた。IL-33 は、寄生虫感染やアレルギーにおいて 2 型自然リンパ球 (ILC2) やマスト細胞に作用して Th2 型免疫応答を誘導することが知られているが、同時に死細胞やストレスを受けた細胞から “alarmin” として放出され、組織修復に寄与することも報告されている。加えて最近、胆管周囲付属腺を増殖させる作用があることも報告されていることから、IL-33 に着目してさらなる検討を行った。*KTC-K19Cre<sup>ERT</sup>* マウスの胆管では IL-33 の発現が亢進しており、特に E-cadherin が欠失し胆管上皮が破綻しているところに特に強く発現していた。



さらに *KTC-K19Cre<sup>ERT</sup>* マウスの肝組織では、2 型自然リンパ球の浸潤が有意に増加しており、下流のサイトカインである IL-13, amphiregulin (AREG) などの発現も有意に上昇していることが分かった。次いで *KTC-K19Cre<sup>ERT</sup>* マウスに IL-33 中和抗体を投与すると、胆管付属腺の増殖反応が低下し、肝外胆管癌の進展が有意に抑制された。また過形成しか生じない *KT-K19Cre<sup>ERT</sup>* マウスに IL-33 を外的に投与することで、肝外胆管から肝門部まで著明な腫瘍性変化を誘導することができた。すなわち胆管上皮障害によって放出された IL-33 は、胆管付属腺に存在する Kras や TGFβR2 の変異と協調的に胆管癌発症を促進することが明らかとなった（下図）。



#### (6)胆管癌進展における YAP の関与

E-cadherin 欠失の胆管癌進展へのさらなる関与を検討したところ、E-cadherin 欠失による隣接細胞との接着の消失は、細胞の contact inhibition に重要な Hippo 経路を抑制し、細胞増殖に重要な YAP を活性化することが分かった。実際に YAP 阻害剤を投与することで胆管癌発症を抑えることもでき、治療標的として有望である可能性が示唆された。

#### (7)まとめ

本モデルは慢性胆管障害からの胆管癌発症機序解明に有力なツールであり、その病態解析から、胆管付属腺が癌起源細胞の一つとなり得ると同時に、治療標的として IL-33 が有望である可能性が示唆された。最近の研究から、胆管癌の高危険群である肝吸虫感染患者において、胆管上皮や血清の IL-33 が著明に上昇していることが明らかとなってきている。本マウスモデルの結果と合わせると、やはり IL-33 が発癌に重要な役割を担っている可能性が強く示唆され、今後さらに病態解析を進めていく予定である。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakagawa H, Suzuki N, Hirata Y, Hikiba Y, Hayakawa Y, Kinoshita H, Ihara S, Uchino K, Nishikawa Y, Ijichi H, Otsuka M, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Tateishi K, Koike K. Biliary epithelial injury-induced regenerative response by IL-33 promotes cholangiocarcinogenesis from peribiliary glands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017 May 9;114(19):E3806-E3815.  
査読有

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

内野 康志 (Uchino, Koji)  
東京大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号：00748725

#### (2)研究分担者

中川 勇人 (Nakagawa, Hayato)  
東京大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号：00555609