

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17573

研究課題名(和文) マウス肝癌モデルにおけるコンテキスト依存的なNotch経路活性化の意義

研究課題名(英文) Context-specific roles of Notch signaling in mouse liver cancer models

研究代表者

山本 雅大 (Yamamoto, Masahiro)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30431399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 肝臓癌は多様な組織像を示すが、その多様性を生む機序の詳細は不明な点が多い。本研究では、Sleeping Beautyトランスポゾンマウス肝発癌モデルを用いて、がんにおいて様々な機能を持つNotchシグナル経路の共に活性化するシグナルに依存した肝腫瘍の表現型における役割について検討した。マウス肝細胞で、Notchシグナル経路と同時に、PI3キナーゼ経路、MAPキナーゼ経路とMycを活性化すると、それぞれ胆管癌、肉腫様肝細胞癌と転移を伴う脱分化した肝細胞癌が生じることが明らかになった。また、肉腫様肝細胞癌の発生には上皮間葉転換が関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、肝細胞におけるNotch経路の活性化は共に活性化するシグナルに依存したコンテキスト依存的な役割を果たすことが明らかになった。実際の肝臓において、本研究で明らかになった機序が働いている可能性が示唆され、それらシグナルを標的とした治療への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)： Liver cancer exhibits a wide spectrum of histological features, such as hepatocytic, cholangiocytic, mesenchymal, and stem/progenitor phenotypes; however, the detail of the mechanism remains unknown. In this study, I explored, using the Sleeping Beauty transposon-mediated mouse liver tumor model, the context-specific roles for the Notch signaling pathway in determining the phenotypes of liver tumors. Co-activation of the Notch pathway with the PI3 kinase pathway, MAP kinase pathway, and Myc in mouse hepatocytes induced cholangiocytic tumors, sarcomatoid hepatocellular carcinoma (HCC), and dedifferentiated HCC with lung metastasis, respectively. Of note, epithelial-mesenchymal transition (EMT) was involved in carcinogenesis of sarcomatoid HCC.

研究分野： 実験病理

キーワード： 肝腫瘍

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝がんは肝細胞癌と肝内胆管癌に大きく分けられるが、両者が混合する混合型肝癌や肝芽細胞への分化を示す腫瘍が存在する。また、肝細胞癌は再生結節や異型結節 (dysplastic nodule) と鑑別が困難な非常に高分化なものから間葉系細胞の特徴を示す肉腫様肝細胞癌までの幅広いスペクトラムの組織像を含んでいる。その起源細胞は、肝細胞、胆管上皮細胞および肝幹細胞いずれの可能性もあるが、実験的には肝細胞は肝細胞癌と肝内胆管癌両方の起源になりえることが示されている。しかしながら、肝腫瘍の多様な表現型が決定されるメカニズムについては不明な点が多かった。

本研究代表者は研究開始当初に、Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンと hydrodynamic tail vein injection 法を組み合わせた *in vivo* マウス肝細胞特異的遺伝子導入法を用い、導入した遺伝子の組み合わせとそれらにより誘導される腫瘍の表現型との対応を検討することにより、がん遺伝子により活性化されるシグナルの組み合わせがどのように肝癌の特徴を決定しているのかを検討していた。その中で、恒常活性化型 YAP (YAP<sup>S127A</sup>)、活性化型 AKT (myristoylated AKT) および Myc の相互作用で誘導される肝腫瘍の表現型を検討した。その結果、AKT と Myc、AKT と YAP 並びに YAP と Myc の組み合わせからそれぞれ、肝細胞癌、肝内胆管癌並びに混合型肝癌と多様な肝腫瘍が特定の遺伝子の組み合わせで誘導できることが明らかになった。

Notch 経路は発生期において肝芽細胞から胆管上皮細胞に分化する過程で重要であることが示されているとともに、マウス肝細胞で YAP を活性化させると Notch 経路の活性化を介して胆管上皮細胞への分化が誘導されることが報告されている (Yimlamai et al., Cell 2014)。実際に、YAP と AKT により誘導された胆管癌では Jag1、Notch2 および Notch エフェクター (Hes1、Hes2) の mRNA 発現レベルが上昇していた (Yamamoto et al., Am J Pathol 2017)。また、活性化型 Notch 受容体である Notch1 intracellular domain (N1ICD) や Notch2 intracellular domain (N2ICD) を導入する実験を行ったところ、N1ICD、N2ICD 単独では胆管嚢胞が少数形成されるのみであったが、N1ICD (または N2ICD) を AKT と組み合わせると嚢胞性胆管腺腫が誘導された (Yamamoto et al., Am J Pathol 2017)。以上のように、Notch 経路の活性化は肝腫瘍の表現型を胆管細胞へと転換する働きがあることが確かめられた。

上記の知見に合致して、ヒト胆管癌では Notch 経路活性化が認められる (Zender et al., Cancer Cell 23:784-795, 2013)。しかし、興味深いことに同経路の活性化は肝細胞癌でも高頻度で起こることが報告されている (Villanueva et al., Gastroenterology 143:1660-1669, 2012)。また、肝癌の転移との関連も示されており (Hayashi et al., Oncol Rep 34:1650-1658, 2015)、肝癌における Notch 経路の役割は多岐にわたっている。また、Notch 経路は様々な癌において、癌幹細胞、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、転移、血管新生など多様なメカニズムを介して種々の腫瘍の発生に深く関わっていることが知られている (Ranganathan et al., Nat Rev Cancer 11:338-351, 2011)。研究代表者のこれまでの研究では、Notch 経路と PI3 kinase 経路を同時に活性化することで胆管性腫瘍が誘導されており、両経路の相互作用が胆管細胞方向への分化に強く働いている可能性が考えられた。そこで Notch 経路と他のシグナル伝達系との相互作用を検討するため、本研究代表者は Notch 経路活性化と Myc (N1ICD/Myc) または変異活性化型 HRAS<sup>G12V</sup> による RAS/MAPK 経路活性化 (N1ICD/HRAS) で誘導される腫瘍の表現型を検討した。その結果、驚くべきことに N1ICD/Myc では N/C 比の高い肝芽細胞様小型細胞からなる腫瘍が、N1ICD/HRAS では多形性の強い肉腫様の腫瘍が約 5 週間で誘導され、いずれにも胆管上皮細胞への分化は見られなかった。Myc 単独では腫瘍は形成されず、HRAS 単独では高分化型肝細胞癌が誘導されることから、N1ICD/Myc 腫瘍、N1ICD/HRAS 腫瘍の特異な表現型は Notch 経路と Myc または RAS/MAPK 経路の相互作用の結果であると考えられる。また、N1ICD/Myc 腫瘍では肺への転移が認められた。転移は他の癌遺伝子の組み合わせではほとんど起こらず、N1ICD/Myc 腫瘍の重要な特徴と考えられる。以上より、Notch 経路活性化は、同時に活性化するシグナル伝達経路の種類により、異なる表現型の腫瘍を誘導することが示唆されたが、その詳細は全く不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究は、肝癌における Notch 経路活性化の意義を癌遺伝子で活性化されるシグナル伝達経路のコンテキストに応じて総合的に理解することを目的としている。(1) PI3 kinase 経路活性化状態における胆管系腫瘍の誘導、(2) Myc 活性化状態における脱分化腫瘍の誘導および転移能獲得、(3) RAS/MAPK 経路活性化状態における EMT を主要なテーマとし、それぞれの分子メカニズムを検討する。肝細胞性腫瘍における Notch 経路活性化のコンテキスト依存的な役割は、我々独自の新規の知見である。胆管細胞への分化転換、肝芽細胞への脱分化と転移能獲得、EMT はいずれも肝癌を理解する上で重要な腫瘍生物学的現象である。本研究により Notch 経路の役割を解明することは、肝癌の発生、進展および転移機構の正確な理解に貢献するとともに、肝癌の治療戦略にも重要な示唆を与えること期待される。

### 3. 研究の方法

#### ① SB トランスポゾン肝発癌モデル

SB13 トランスポゼース発現プラスミドとトランスポゼースにより認識されるがん遺伝子等を含むプラスミドを用いた。SB13 と遺伝子を含むプラスミドのモル比は 1:2 で、2 つ遺伝子を同時に導入する際は総量 25  $\mu$ g を 2.5 mL のリンゲル液に融解した。肝細胞にプラスミドを導入するために、雄性 C57BL/6J マウスの尾静脈より 5 - 8 秒でプラスミド液を注射した。

Notch 経路を活性化するために、Notch1 と Notch2 の細胞内ドメインの NICD と N2ICD をそれぞれ用いた。PI3 kinase 経路を活性化するために myristoylated AKT を用いた。Myc を過剰発現には、マウスの Myc 遺伝子を用いた。Snail1 と Zeb1 の発現を低下させるために、それらに対する shRNA を用いた。

#### ② 肝腫瘍の組織学的な解析

マウスを、毎週体重を計測しつつ、腹部膨満等の肝腫瘍形成の兆候がないか継続的に観察した。深麻酔したマウスから、門脈から肝臓を ice-cold PBS で灌流した後に、肝臓および肺臓を採取した。組織は、一部を未固定のまま RNA 抽出用に -80°C で保存し、4% リン酸緩衝ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、薄切切片を作成した。切片を用いて、形態観察の為にヘマトキシリン・エオジン染色と蛋白質発現検討の為に免疫染色を行った。

#### ③ RT-qPCR

凍結保存した組織を Trizol で RNA を抽出した。RNA より、RT reaction を行い、cDNA を合成した。cDNA より、遺伝子特異的プライマーセットを用いた qPCR を行い、遺伝子発現を定量した。

#### ④ 細胞系譜追跡 (lineage tracing) 法

ROSA26R マウスに AAV8-TBG-Cre アデノ随伴ウイルスを尾静脈より注射し感染させることで、肝細胞特異的に Cre を発現させた。その後、SB トランスポゾン肝発癌モデルを用いて遺伝子を導入し肝腫瘍を誘導した。肝腫瘍を 4% リン酸緩衝ホルマリンで固定後、凍結切片を作成し、X-gal 染色を行った。

### 4. 研究成果

#### ① Notch 経路と PI3 kinase 経路の活性化による肝内胆管癌モデル

Notch 経路と PI3 kinase 経路を NICD と活性化型 AKT で活性化させると浸潤性および増殖性の低い嚢胞性胆管腺腫が誘導された。このモデルを作成するきっかけとなった AKT と YAP による胆管癌は、その発癌過程で Notch とともに Myc が活性化する。一方、NICD と AKT の系では Myc の発現はみられなかった。Myc の活性化は腫瘍の悪性度との関連が報告されているため、この胆管性腫瘍の悪性度の決定には Myc が重要な役割を果たしている可能性があると考えた。この仮説を検証するために、AKT と NICD に加えて Myc を導入したところ、腫瘍形成までの期間が著しく短縮し、浸潤性および増殖性の高い胆管癌が誘導され、胆管癌において PI3 kinase 経路と Notch 経路が胆管への分化を Myc が悪性度を規定していることが示唆された。

なお、AKT と YAP に加えて Myc を導入すると、予期せず胆管の形質が失われてしまうが、その際には Notch 経路の活性化も失われていた。詳細なメカニズムは不明だがこれは、Myc が YAP による Notch の活性化を阻害し、その結果胆管への分化が起こらなかったためと推測された。

#### ② Notch 経路と Myc の活性化による脱分化および高転移性肝腫瘍モデル

NICD と Myc を肝細胞に導入すると、N/C 比の高い形態的に未分化な細胞からなる腫瘍が誘導された。形態的な特徴を裏付ける様に、それら腫瘍細胞は肝芽細胞マーカーの DLK を高発現していた。Notch には Notch 1-4 の isoforms がある。このうち主な isoform の Notch 1 と Notch 2 の違いについて、NICD と Myc および N2ICD と Myc の組み合わせを比較することにより検討した。組織像については、NICD と N2ICD で同様の組織像を示していた。腫瘍形成期間について、Notch2 と RAS-MAP kinase 活性化の組み合わせた場合 (中央値 36 日) が Notch1 での組み合わせ (同 66 日) よりも短期間で腫瘍ができた。また、Notch2 と Myc で誘導した腫瘍は、転移頻度が 7 個体中 2 個体と低かった。この転移頻度の違いは、肺転移の機序を解明する足がかりのひとつとなると考えられた。

③ Notch 経路と MAP kinase 経路の活性化による EMT を介した肉腫様肝細胞癌モデル

Notch 経路と RAS-MAP kinase 経路による肉腫様肝がんは、上皮系マーカーのサイケラチン 18 と E-カドヘリンの発現が低下し、間葉系マーカーのビメンチンの発現が上昇しており、上皮-間葉転換 (EMT) がこの癌の発生に関わっていることが示唆された。実際に、EMT に関連する転写因子の Snai1、Zeb1、Zeb2 並びに Twist1 の発現が亢進していた。更にこれら転写因子の関わりを明らかにする為に、Snai1 および Zeb1 に対する shRNA を腫瘍で発現させることを試みたが、腫瘍において Snai1 と Zeb1 の遺伝子発現が低下せず、その役割を検討することができなかった。

肝細胞にがん遺伝子を導入後の腫瘍形質を経時的に検討したところ、肉腫様の変化はがん遺伝子導入 2 週間後からすでに見られ、この変化は Notch と RAS-MAP 経路の活性化による直接的な変化であることが示唆された。

HRAS と Notch により誘導される肝腫瘍が肝細胞由来なのかどうかを、細胞系譜追跡 (lineage tracing) 法を用いて検討した。方法は、ROSA26R マウスに AAV8-TBG-Cre アデノ随伴ウイルスを感染させ肝細胞を特異的にラベルした後に、SB トランスポゾンマウス肝発がんモデルにて活性化型 Notch (Notch intracellular domain, NICD) と変異活性化型 HRAS を導入し、形成された間葉系腫瘍にて X-gal 染色を行なった。結果、NICD と HRAS で誘導した間葉系の肝腫瘍は X-gal 染色陽性であり、肝細胞に由来することが証明された。従って、肝細胞で Notch 経路は MAP kinase 経路と共に活性化すると、EMT 関連転写因子の活性化を伴いながら、間葉系細胞の特徴をもつ腫瘍を誘導することが明らかとなった。

下図に示す通り、本研究により、Notch シグナル経路はマウス肝発癌において、共に活性化するシグナルのコンテキストに依存した役割を果たし、多様な特徴を示す肝腫瘍の発生に寄与していることが明らかになった。今後は、ヒト肝癌での本研究結果の検証を通して、診断やそれらシグナルを標的とした治療への応用を進めたい。

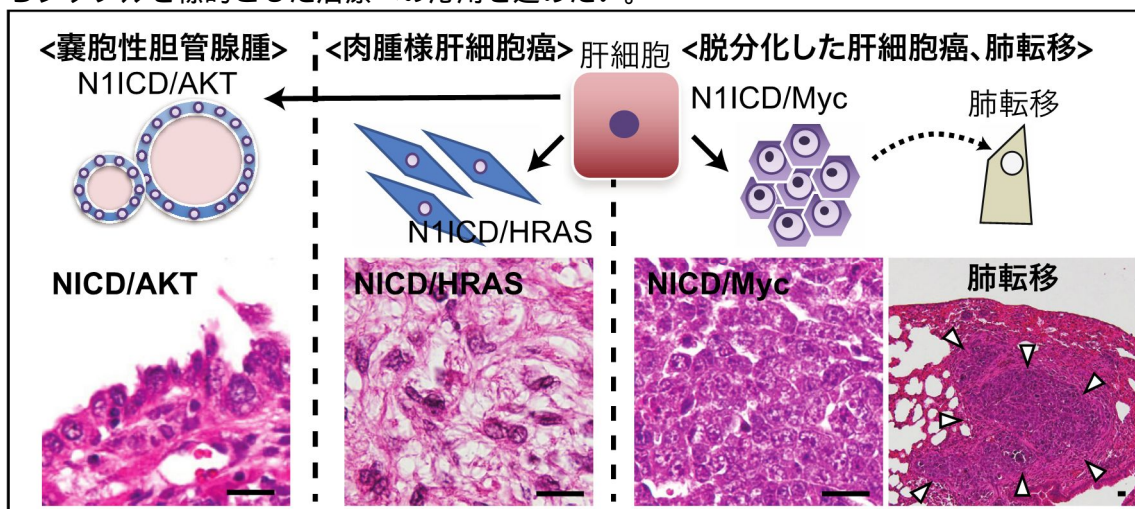


図 Notch のコンテキスト依存的な活性化により誘導される肝腫瘍

[ 引用文献 ]

- Hayashi Y, Osanai M, Lee G-H. NOTCH2 signaling confers immature morphology and aggressiveness in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2015 Oct;34(4):1650-8. doi: 10.3892/or.2015.4171.
- Ranganathan P, Weaver K, Capobianco A. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nat Rev Cancer.* 2011 May;11(5):338-51. doi: 10.1038/nrc3035.
- Villanueva A, Alsinet C, Yanger K, Hoshida Y, Zong Y, Toffanin S, Rodriguez-Carunchio L, Solé M, Thung S, Stanger B, Llovet J. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. *Gastroenterology.* 2012 Dec;143(6):1660-1669.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2012.09.002.
- Yamamoto M, Xin B, Watanabe K, Ooshio T, Fujii K, Chen X, Okada Y, Abe H, Taguchi Y, Miyokawa N, Furukawa H, Nishikawa Y. Oncogenic Determination of a Broad Spectrum of Phenotypes of Hepatocyte-Derived Mouse Liver Tumors. *Am J Pathol* 2017 Dec;187(12):2711-2725. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.07.022.
- Yimlamai D, Christodoulou C, Galli G, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B, Shrestha K, Cahan P, Stanger B, Camargo F. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* 2014 Jun 5;157(6):1324-1338. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.060.
- Zender S, Nickeleit I, Wuestefeld T, Sörensen I, Dauch D, Bozko P, El-Khatib M, Geffers R, Bektas H, Manns M, Gossler A, Wilkens L, Plentz R, Zender L, Malek N. A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. *Cancer Cell.* 2013 Jun 10;23(6):784-95. doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.019.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe K, Yamamoto M, Xin B, Ooshio T, Goto M, Fujii K, Liu Y, Okada Y, Furukawa H, Nishikawa Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 Emergence of the Dedifferentiated Phenotype in Hepatocyte-Derived Tumors in Mice: Roles of Oncogene-Induced Epigenetic Alterations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 697-715
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1327.	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 Yamamoto M, Xin B, Nishikawa Y	4. 巻 1905
2. 論文標題 Mouse Model for Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma Originated from Mature Hepatocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 221-236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-8961-4_20.	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 該当する

1. 著者名 Yamamoto M, Xin B, Watanabe K, Ooshio T, Fujii K, Chen X, Okada Y, Abe H, Taguchi Y, Miyokawa N, Furukawa H, Nishikawa Y.	4. 巻 187
2. 論文標題 Oncogenic Determination of a Broad Spectrum of Phenotypes of Hepatocyte-Derived Mouse Liver Tumors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 2711-2725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2017.07.022.	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 Xin B, Yamamoto M, Fujii K, Ooshio T, Chen X, Okada Y, Watanabe K, Miyokawa N, Furukawa H, Nishikawa Y.	4. 巻 36
2. 論文標題 Critical role of Myc activation in mouse hepatocarcinogenesis induced by the activation of AKT and RAS pathways.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncogene.	6. 最初と最後の頁 5087-5097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/onc.2017.114.	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 Ooshio Takako, Yamamoto Masahiro, Fujii Kiyonaga, Xin Bing, Watanabe Kenji, Goto Masanori, Okada Yoko, Suzuki Akira, Penninger Josef M., Nishina Hiroshi, Nishikawa Yuji	4. 巻 Sep 23
2. 論文標題 Hepatocyte MKK7 Contributes to Restoration of the Liver Parenchyma Following Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31565	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 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山本雅大、辛氷、渡邊賢二、後藤正憲、大塩貴子、岡田陽子、西川祐司
2. 発表標題 マウス肝癌モデルにおける 肝細胞の可塑性と肝癌の組織型の多様性 .
3. 学会等名 第24回肝細胞研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masahiro Yamamoto, Bing Xin, Kenji Watanabe, Masanori Goto, Takako Ooshio, Yoko Okada, Yuji Nishikawa
2. 発表標題 Context-dependent roles of the Notch pathway in determination of tumor phenotypes in mice liver cancer model
3. 学会等名 日本癌学会総会(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本雅大、辛氷、渡邊賢二、後藤正憲、大塩貴子、劉洋、岡田陽子、西川祐司
2. 発表標題 成熟肝細胞の分化可塑性を基盤とした肝細胞由来肝腫瘍の多様性
3. 学会等名 2017年度生命科学型学会合同年次大会
4. 発表年 2017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
---------	---------