

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17459

研究課題名（和文）非古典的NFκB経路を介した胆管癌進展のメカニズムの解明と胆管癌治療への応用

研究課題名（英文）Mechanism of cholangiocarcinogenesis via hepato-cholangiocyte differentiation and conversion by non-classical NF-κB pathway

研究代表者

塩出 悠登 (Shiode, Yuto)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10838840

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）：胆管癌は原発性肝癌のうち、肝細胞癌の次に多い疾患であり、予後不良な疾患として知られている。胆管細胞癌は危険因子として原発性硬化性胆管炎や肝吸虫症などの慢性胆管障害、炎症の存在が以前より知られているが、そのメカニズムは明らかにはなっていない。この胆管癌発癌のメカニズムが明らかでないことが胆管癌治療開発の妨げになっていると考えられる。我々は胆管癌の新規の癌遺伝子を同定し、それを基に新規の胆管癌モデルマウスを作成した。また、このマウスに発生する胆管癌は肝細胞から胆管細胞への分化転換を介して起こることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々が発見したTraf3という遺伝子はこれまで胆管癌との関わりは報告されておらず、新規の癌遺伝子である。当遺伝子の発見にはトランスポゾン挿入変異スクリーニング法という、胆管癌に対してはこれまで行われたことのない方法を用いており、このことが新規の癌遺伝子の発見につながったと考えている。また、Traf3を欠損させて作成した胆管癌モデルマウスは短期間で胆管癌を発癌し、今後の治療実験への活用が期待される。肝細胞から胆管への分化転換を阻害することで胆管癌の治療を行うことが可能になれば、今までにないメカニズムでの治療となり、胆管癌の予後改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cholangiocarcinoma is the second most common type of primary liver cancer after hepatocellular carcinoma, and is known to have a poor prognosis. Chronic bile duct injury and inflammation, such as primary sclerosing cholangitis and hepatosinusitis, have been known to be risk factors for cholangiocarcinoma for a long time, but the mechanism of the disease has not been clarified. This lack of clarity in the mechanism of cholangiocarcinogenesis is thought to be a hindrance to the development of cholangiocarcinoma therapy. We have identified a novel oncogene for cholangiocarcinoma and created a novel mouse model for cholangiocarcinoma based on this gene. We have also demonstrated that cholangiocarcinoma in these mice occurs through the differentiation and transformation of hepatocytes into cholangiocytes.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆管癌 非古典的NF-κB経路

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は原発性肝癌のうち、肝細胞癌の次に多い疾患であり、予後不良な疾患として知られている (Sumera R et al., Nature review 2017)。胆管細胞癌は危険因子として原発性硬化性胆管炎や肝吸虫症などの慢性胆管障害、炎症の存在が以前より知られているが、そのメカニズムは明らかにはなっていない (Giammarco F, World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology 2010)。また、胆管細胞癌の癌起源細胞については、胆管上皮細胞または肝細胞に由来するのではないかとされてきたが (Christopher P et al., Journal of Hepatology 2018, Sayaka S et al., JCI 2012)、門脈周囲に存在する前駆細胞に由来するという説も提唱され、controversial である (Nakagawa H et al., PNAS 2017)。この胆管癌発症のメカニズムが明らかでないことが胆管癌治療開発の妨げになっていると考えられる。

申請者の共同研究者は以前、胆管癌発症モデルマウスである肝臓特異的 Pten ノックアウトマウスを用い、トランスポゾン挿入変異スクリーニング法 (Copeland, N.G. & Jenkins, N.A. Nat Rev Cancer 2010) によって、胆管癌のドライバー遺伝子として、新たに Traf3 遺伝子を同定した。Traf3 遺伝子は非古典的な NF- κ B 経路の構成因子の一つであり、胆管癌との関係性はこれまでに報告されていない。そこで、申請者は胆管癌発症における Traf3 遺伝子の役割を明らかにするために、肝細胞特異的な Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子のダブルノックアウトマウスを作成したところ、6 週齢で肝内に胆管癌を認めた (図 1)。肝細胞特異的な Pten 遺伝子のノックアウトマウスや肝細胞特異的な Traf3 遺伝子のノックアウトマウスではどのような表現系は認めず、これらの遺伝子の相互作用が胆管癌発症に寄与していると考えられた。そこで、肝細胞特異的な Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子のダブルノックアウトマウスにおいて、どのようなメカニズムで胆管癌が発症するのかを明らかにすることで、胆管癌治療戦略に貢献することができるのではないかと考えた。

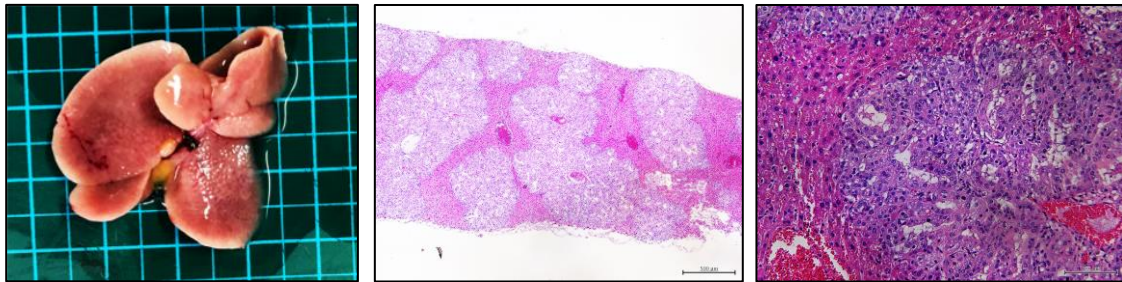


図 1 肝臓特異的 Pten 遺伝子、Traf3 遺伝子ダブルノックアウトマウスの肝臓

2. 研究の目的

本研究の目的は、Traf3 が胆管癌発症にどのように寄与しているのかのメカニズムを明らかにすることによって、胆管癌治療戦略に貢献することである。

3. 研究の方法

(1) 胆管癌の起源細胞を臓器特異的な Cre マウスを用いて明らかにする

① 胎生期の肝臓では、肝前駆細胞もアルブミンを発現しているため、Alb-Cre を用いた遺伝子ノックアウトでは肝細胞のみならず、肝前駆細胞、胆管細胞もノックアウトされてしまう可能性がある。そこで、Alb-Cre を用いた遺伝子ノックアウトでみられた胆管癌が、どの細胞から由来しているのかをより詳しく検討するため、肝細胞特異的な遺伝子ノックアウトを行う方法として、Alb-CreERT2 を用いて検討を行った。

② Cre(-)のマウスに対し、AAV ベクターや HTVi 法を用いて肝細胞特異的な遺伝子ノックアウトを行い、その表現系を検討した。

③ K19-CreERT2 を用い、胆管細胞特異的な遺伝子ノックアウトを行い、その表現系を解析した。

(2) 胆管癌の起源細胞について、肝オルガノイドを用いて明らかにする。

① オルガノイドは臓器幹細胞、または前駆細胞をマトリゲル内で三次元培養することで形成され、分化誘導を加えることで成熟細胞に分化することができる。マウス肝臓から自己増殖する肝前駆細胞由来のオルガノイド作成方法が報告されており (Meritxell Huch et al., Cell 2015)、申請者はこの方法に則ってマウスの肝臓から肝オルガノイドを作成することに成功した。ノックアウトマウスから肝オルガノイドを作成すること、また肝オルガノイドに遺伝子操作を加えることによって、肝前駆細胞と胆管癌発症の関係性を検討した。

② ノックアウトマウスから作成した肝オルガノイドを免疫不全マウスの肝臓に移植することにより、長期飼育で発癌が見られるかを検討する。

(3) 肝細胞で Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子が抑制されることの影響を肝癌細胞株を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 胆管癌の起源細胞の臓器特異的な Cre マウスを用いた検討

- ① Alb-Cre を用いて肝臓特異的に Pten 遺伝子または Traf3 遺伝子、またその両方を欠損したマウスを作成したところ、出生後 6 週の時点で肝臓の著明な腫大を認めた。肝臓の免疫染色を行った結果、KRT19 陽性の胆管細胞が増殖していることが確認できた。Pten 遺伝子または Traf3 遺伝子を欠損したマウスでは同様の表現型は認めなかった。次に肝臓特異的に Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子を欠損したマウスを 24 週齢まで飼育したところ、肝臓に複数の腫瘍形成を認めた。これらの腫瘍は免疫染色にて KRT19 陽性であり、胆管癌であると考えられた。当マウスで形成された胆管癌の起源細胞をより詳しく検討するため、Alb-Cre ERT2 を用いて肝細胞特異的に Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子を欠損したマウスを作成した。肝細胞特異的に両遺伝子を欠損したマウスは Tamoxifen 投与後 12 週の時点で肝臓の著明な腫大を認め、肝臓の免疫染色にて KRT19 陽性の胆管細胞が増殖していることが確認できた。また、16 週の時点で肝臓に複数の腫瘍形成を認め、組織学的に胆管癌であると考えられた。
- ② 次に HTVi 法または AAV ベクターを用いて Cre(-)Pten fl/fl Traf3 fl/fl マウスに Cre 遺伝子を導入した。HTVi 法は一般的に肝細胞特異的に遺伝子導入が行えるとされる方法である。また、肝細胞に特異性が高いとされる AAV8 と Tbg-Cre を組み合わせた遺伝子導入も肝細胞特異的に遺伝子導入が行えるとの報告がある方法である。HTVi 法を用いて Cre 遺伝子を導入した結果、導入後 24 週の時点で肝臓の著明な腫大と複数の腫瘍形成を認め、これらの腫瘍は免疫染色にて KRT19 染色陽性であり胆管癌であると考えられた。また、AAV8-Tbg を用いて Cre 遺伝子を導入した結果、導入後 16 週の時点で肝臓の著明な腫大と複数の腫瘍形成を認め、これらの腫瘍は免疫染色にて KRT19 染色陽性であり胆管癌であると考えられた。
- ③ 一方、K19-Cre ERT2 を用いて胆管細胞特異的に Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子を欠損させた結果、胆管増殖や胆管癌形成は認めなかった。

(2) 胆管癌の起源細胞について、肝オルガノイドを用いて明らかにする。

- ① Cre(-)Pten fl/fl Traf3 fl/fl マウスの肝臓から肝オルガノイドを作成した。次にこのオルガノイドにレンチウイルスベクターを用いて GFP または Cre 遺伝子を強制発現し、Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子を欠損したオルガノイドを作成した。リアルタイム PCR での遺伝子発現の検討で Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子が欠損していることを確認したが、当オルガノイドでは胆管マーカーの上昇は認めなかった。
- ② 次に、今回作成したオルガノイドを免疫不全マウスの肝臓に移植し長期飼育を行ったが腫瘍形成は認めなかった。

(3) 以上の(1)、(2)の結果から、胆管細胞や肝前駆細胞ではなく、成熟肝細胞において Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子が欠損することで肝細胞から胆管細胞への分化転換を介し、胆管癌が形成されるという胆管癌の新たな発がんメカニズムが示唆された。そこでヒト肝癌細胞において siRNA 法を用いて Pten 遺伝子と Traf3 遺伝子を抑制したところ、胆管マーカーが上昇し、この仮説を支持する結果が得られた。

トランスポゾン挿入変異スクリーニング法を用いた胆管癌の癌遺伝子の検索はこれまでに報告がなく、我々が同定した Traf3 遺伝子は胆管癌での遺伝子変異は報告されておらず、Traf3 の機能低下が重要であると考えられる。また、Traf3 遺伝子と胆管癌の関わりはこれまでに報告がない。今後は Traf3 遺伝子の機能低下と肝細胞から胆管細胞への分化転換のメカニズムとの関わりを更に詳しく検討し、Traf3 遺伝子以外の Key molecule の探索を行う予定である。また、Traf3 遺伝子やそれらの遺伝子とヒト臨床検体の関係性を検討し、胆管癌の新たな治療ターゲットとしての可能性を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Yuto Shiode
2. 発表標題 Discovery of novel hepatocyte molecules regulating cholangiocellular carcinoma development
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuto Shiode
2. 発表標題 Cancer gene discovery of cholangiocellular carcinoma using transposon insertional mutagenesis screen in mice
3. 学会等名 第78回日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuto Shiode
2. 発表標題 TRANSPOSON MUTAGENESIS SCREEN IN MICE IDENTIFIED Traf3 AS THE NOVEL TUMOR SUPPRESSOR OF CHOLANGIOCELLULAR CARCINOMA
3. 学会等名 AASLD2019（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------	---------