

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08376

研究課題名（和文）難治胆管癌の克服に向けた脂質代謝を標的とする新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapies targeting lipid metabolism for cholangiocarcinoma

研究代表者

山田 友春（Yamada, Tomoharu）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60868024

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：切除不能胆管癌はきわめて予後不良であり、新たなストラテジーによる治療法開発が急務である。これまで我々は独自の様々なマウスモデルを用いて肝胆道癌の代謝変化について解析してきたが、特に肝外胆管癌進展においてSREBPを中心とした脂質生合成経路が重要な役割を果たすことを見出した。さらに本研究では、マウスモデルおよびオルガノイドを用いてその機序について解析するとともに、新たに同定した新規SREBP阻害剤が肝外胆管癌に対して有効な可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレステロール代謝抑制の肝外胆管癌への効果については、ヒトにおいても近年スタチンによる発癌抑制および予後向上の報告がなされた(Lavu S, et al. Hepatology. 2020)。興味深いことに、このスタチンの効果については肝門部胆管癌よりも遠位胆管癌において予防効果および予後改善効果が顕著であることが示されており、本マウスモデルの所見と合致する。また本年胆道癌全体を対象に、化学療法と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法が保険承認された。近年脂質代謝産物を介した免疫微小環境変化についても注目が集まっており、今後そのような観点でも本研究成果を展開していきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Unresectable cholangiocarcinoma has an extremely poor prognosis, and development of new therapeutic strategies are needed. Cancer cells undergo characteristic metabolic changes to adapt to their local environment, so-called “metabolic reprogramming”. We have analyzed the metabolic reprogramming of hepatobiliary carcinoma using various original mouse models and found that the SREBP-mediated lipogenesis pathway plays an important role in the progression of extrahepatic cholangiocarcinoma. We analyzed the underlying mechanisms using mouse models and organoids. Furthermore, we identified a novel SREBP inhibitor that may be effective against extrahepatic cholangiocarcinoma.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆管癌 脂質生合成経路 SREBP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胆管癌は発生部位から肝内胆管癌・肝外胆管癌に分類され、切除不能例はいずれもきわめて予後不良である。近年肝内胆管癌においては新しい分子標的薬が開発されるなど治療法が進歩しつつあるが、肝外胆管癌では治療標的となりうる遺伝子変異が少なく、従って新たな戦略による治療法開発が急務である。一方、最近癌細胞は周囲の環境に適応しかつ自身の成長に有利な状況を作り出すため、正常細胞とは異なった固有の代謝変化、いわゆる“metabolic reprogramming”が生じていることが明らかとなり、新たな治療標的として注目されている。これまで我々は独自の様々なマウスモデルを用いて肝胆道癌の metabolic reprogramming について解析してきたが、特に肝外胆管癌進展において脂質生合成経路活性化が重要な役割を果たす可能性を見出した。また京都大学化学研究所上杉志成教授との共同研究により、脂質生合成のマスターレギュレーターである SREBP を強く阻害する内因性分子としてビタミン D を同定、それに基づき SREBP 阻害活性を有する新たな化合物を創出した。

### 2. 研究の目的

独自の胆管癌マウスモデルを用いて病態進展における脂質生合成経路の役割解明を進めるとともに、抗癌活性を有する新規 SREBP 阻害剤をスクリーニングし、ヒトへの応用可能性を探索する。

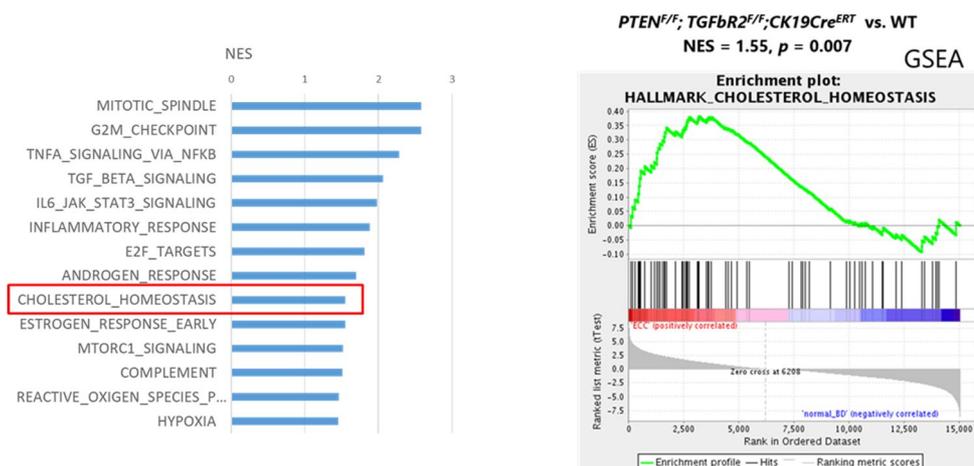
### 3. 研究の方法

我々がこれまでに樹立した二つの肝外胆管癌マウスモデル、胆管上皮特異的 PTEN 欠損/TGFβR2 欠損マウス( $PTEN^{F/F};Tgfr2^{F/F};CK19-Cre^{ERT}$ : PT マウス)および胆管上皮特異的 PTEN 欠損/Kras 活性化マウス( $PTEN^{F/F};LSL-Kras^{G12D};CK19-Cre^{ERT}$ : KP マウス)、さらにそれらから樹立した胆管オルガノイドを用いて、病態進展における脂質生合成経路の役割を解析した。また我々が創出した新規 SREBP 阻害剤を用い、新たな胆管癌治療の可能性を検討した。

### 4. 研究成果

肝外胆管癌の発症進展には SCAP/SREBP 経路が重要な役割を果たす

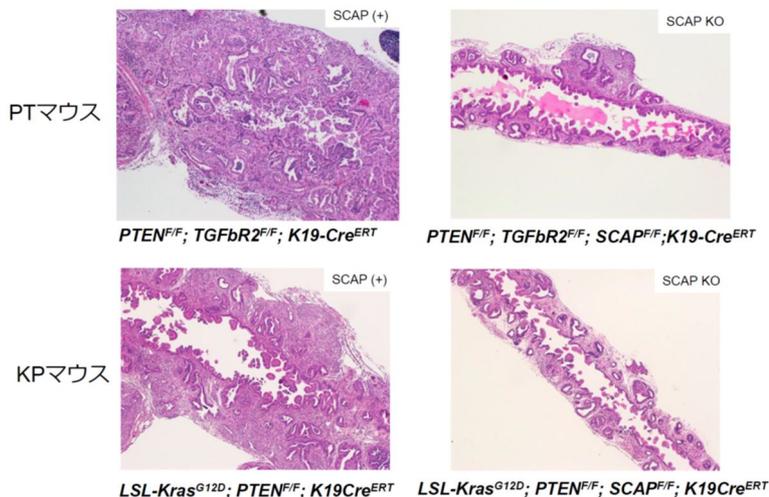
我々は以前、胆管上皮特異的に Kras 活性化および TGFβR2 と E-cadherin 欠損を誘導することで新規肝外胆管癌マウスモデルを樹立し (PNAS 2017)、その後も様々な肝外胆管癌マウスモデルの構築に取り組んできた。ヒト胆管癌では上記経路に加えて PI3K 経路の異常も頻度が高いことから、上述のように胆管上皮特異的 PTEN 欠損/TGFβR2 欠損マウス(PT マウス)、および胆管上皮特異的 PTEN 欠損/Kras 活性化マウス(KP マウス)を作製することにより、新たな二つの肝外胆管癌マウスモデルを樹立した。興味深いことに前者は胆管壁浸潤型、後者は胆管内発育型と異なる組織像を呈しており、遺伝子異常の組み合わせによって組織型が変化することがわかった。発癌機序解明のため、PT マウスの腫瘍組織の RNA-seq およびトランスクリプトーム解析を行ったところ、SREBP 経路を中心とした脂質生合成経路が有意に活性化していた(下図)。



SREBP は活性化の際にエスコートタンパク SCAP によって小胞体からゴルジ装置に輸送される必要があり、SCAP が欠損すると SREBP1 および 2 の活性化がほぼ完全に阻害される。そこで PT マウスに  $SCAP^{F/F}$  マウスを交配させ ( $PTEN^{F/F};LSL-Kras^{G12D};SCAP^{F/F};CK19-Cre^{ERT}$ : PTS マウス)、胆管癌で SCAP/SREBP 経路を阻害したところ、驚くべきことにほぼ完全に胆管癌の発症を抑制できることがわかった (事項図)。KP マウスで SCAP を欠損させても同様の結果が得られたことから、SCAP/SREBP 経路は肝外胆管癌の組織型に関わらず有望な治療標的と考えられた。さらに胆管癌細胞株 TFK1 を用いて in vitro で SCAP をロックダウンしたところ、細

胞増殖および sphere 形成能が有意に抑制された。すなわち同経路は直接的に発癌・進展に寄与することが明らかとなった。また免疫染色で肝外胆管における SREBP1,2 の発現を検討したところ、胆管幹細胞ニッチとして注目されている胆管周囲付属腺の底部に、SREBP2 が限局的に強発現していることがわかった。SREBP2 はコレステロール合成に重要な転写因子であり、同経路が胆管の幹細胞機能維持に重要な可能性が示唆された。

一方、肝内胆管癌では SCAP を欠損させても発癌抑制効果は限定的であったことから、脂質合成経路は肝外胆管癌においてより重要な役割を果たしていると考えられた。最近肝内胆管癌と肝外胆管癌は遺伝子変異 profile や生物学的特性が異なることが報告されつつあり、この観点からも大きな意義をもつ所見である。



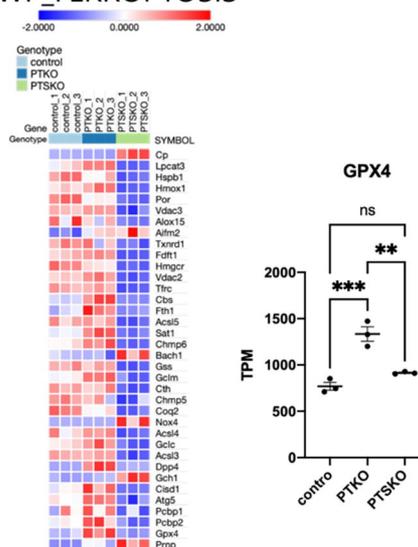
### オルガノイドを用いた SCAP/SREBP 経路の病態への関与

次いで Cre 陰性の PT マウスおよび PTS マウスの肝外胆管からオルガノイドを樹立し、Cre 発現レンチウイルスを用いて in vitro でそれぞれの遺伝子改変を誘導したオルガノイドを作製した (PT オルガノイドおよび PTS オルガノイドと命名)。細胞株の結果と同様に、PTS オルガノイドは PT オルガノイドに比べて増殖が緩徐であった。そこで Control オルガノイド、PT オルガノイド、PTS オルガノイドから RNA を抽出して RNA-seq を行い、それぞれの発現プロファイルの違いについて検討した。PTS オルガノイドでは予想通り脂質合成経路が抑制されるとともに、mitotic spindle や E2F targets といった細胞増殖に関連する pathway が抑制されていた。

一方 PT オルガノイドでは ferroptosis 経路の enrichment が認められた。ferroptosis はプログラムされた細胞死の一形態であり、細胞内自由鉄を触媒として細胞膜リン脂質の過酸化反応が連鎖し、脂質ヒドロキシルラジカルが蓄積することで細胞が死に至る。特にグルタチオン (GSH) 依存的な抗酸化防御の破綻によって脂質の過酸化が抑制できない場合に細胞死を引き起こし、中でも GPX4 は GSH を酸化型グルタチオン (GSSH) に変換することで細胞毒性のある脂質過酸化を抑制し、ferroptosis から細胞を保護する作用を持つと報告されている。興味深いことに、PT オルガノイドでは GPX4 の発現が上昇している一方で、PTS オルガノイドでは低下していた (右図)。すなわち PT オルガノイドでは PI3K 経路の活性化に伴い脂質 ROS が蓄積するが、GPX4 の発現上昇によって ferroptosis を回避し、同経路をより自身の成長に有利な形で活用することができるが、SCAP 欠損によって GPX4 の発現が低下すると、胆管癌細胞が ferroptosis に陥ってしまう可能性が示唆された。事実 GPX4 阻害剤によって PT オルガノイドの成長は著明に抑制された。

また PT オルガノイドではスタチンによって増殖抑制効果が見られたことから、オルガノイド実験系においてもコレステロール合成経路の重要性が示唆された。

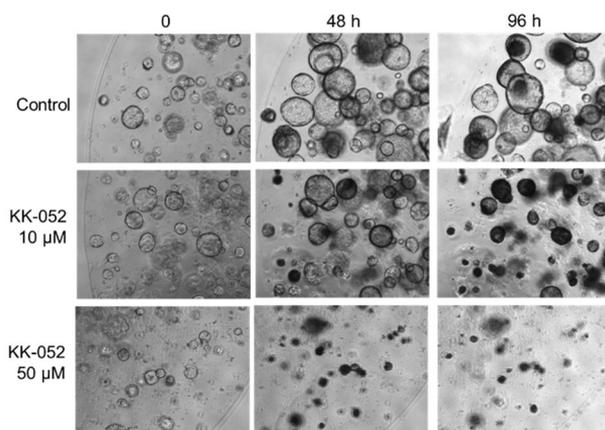
### WP FERROPTOSIS



### 新規 SREBP 阻害剤の開発と治療応用に向けた基礎的検討

これらと並行して SREBP 阻害剤の開発に取り組んだ。しかし SREBP は転写因子であるため直接的な阻害剤の開発は難しい。そこで京都大学化学研究所上杉教授との共同研究により約 300 個の脂質関連内因子分子のライブラリーを細胞でスクリーニングし、SREBP を強く阻害する分子としてビタミン D を見出した。最近の疫学研究からビタミン D 欠乏と多くの疾患リスクとの関連が示唆され、様々な疾患に対してビタミン D 補充療法が試みられているが、十分な効果は得られていない。その理由として、例えば十分な脂質合成抑制効果を得るにはより高濃度のビタミン D が必要となるが、実際には高 Ca 血症などの副作用により難しい。しかしこれまでの検討から、ビタミン D による SREBP 抑制効果は受容体非依存的であることが判明した。そこで東京農工大学長澤教授・帝京大学薬学部橘高教授との共同研究により、ビタミン D 受容体へは

結合せず SREBP 阻害機能のみを有する人工ビタミン D 誘導体を約 50 種類合成した。In vitro において SREBP 阻害効果が高くかつビタミン D 受容体への作用が低いビタミン D 誘導体を用いて、in vivo での薬効評価試験を行った。In vivo スクリーニング系として、マウスを 48 時間絶食にした後に、高炭水化物・低脂肪・ビタミン D 欠乏食を再摂食させるモデルを構築した。同実験系を用いて 16 種類の化合物のスクリーニングした結果、化合物 KK-052 が最も安定して SREBP 阻害作用を発揮し、かつ血清 Ca 濃度を上昇させないことを見出した。そこで前述の PT オルガノイドに KK-052 を添加したところ、有意に増殖が抑制された（右図）。これらの結果から、KK-052 は肝外胆管癌に対する新規治療薬として有望な可能性があり、今後 in vivo での治療効果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0件

〔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
研究分担者	中川 勇人  (Nakagawa Hayato)  (00555609)	三重大学・医学系研究科・教授    (14101)	

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