

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08000

研究課題名（和文）十二指腸乳頭部癌マウスモデルの樹立と幹細胞ニッチ・起源細胞解明

研究課題名（英文）Establishment of a mouse model of ampullary carcinoma and identification of stem cell niches and cells of origin

研究代表者

早田 有希 (Hayata, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：60897883

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）：マウスを用いた細胞系譜解析によって、十二指腸乳頭部に存在するAxin2陽性胆管付属腺細胞が胆管幹細胞として機能することを明らかにした。また乳頭部を取り巻く平滑筋細胞（Oddi括約筋）から分泌されるR-spondin3によって、同部位のWnt活性化ニッチが形成されていることも見出した。マウスにおいてAxin2陽性細胞特異的にPTENを欠損させると乳頭部癌を発症し、さらにWnt阻害剤によって有意に発癌が抑制されたことから、乳頭部胆管付属腺に存在するWnt活性化ニッチは乳頭部癌発症にも寄与しており、治療標的となる可能性が示唆された。また総胆管の胆管付属腺特異的マーカーとしてOLFM4を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から十二指腸乳頭部に胆管上皮幹細胞が存在することが分かった。乳頭切除後や膵頭十二指腸切除後の晩期合併症として胆管狭窄が生じるが、これはOddi括約筋を含む幹細胞ニッチを切除してしまうことにより、胆管再生が障害されるためかもしれない。小児肝移植の最も多い原因疾患は胆道閉鎖症であり、また成人においても肝移植後の胆管狭窄は肝移植に伴う重要な合併症の一つであることから、胆管の再生機構解明はきわめて重要な命題である。したがって本研究結果は、胆管再生療法や十二指腸乳頭部癌に対する治療法の開発に向け、重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using lineage tracing in mice, we found that Axin2-positive peribiliary gland (PBG) cells in periampullary region as biliary epithelial stem cells. Additionally, we found that smooth muscle cells surrounding PBGs secrete R-spondin 3, forming a Wnt-activating niche in this area. When PTEN was specifically knocked out in Axin2-positive cells in mice, ampullary carcinoma developed, and its progression was significantly suppressed by Wnt inhibitors, suggesting that the Wnt-activated niche in periampullary region contributes to ampullary carcinoma development and could be a potential therapeutic target. We also identified OLFM4 as a specific marker for PBG cells in the common bile duct.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆管周囲付属腺 十二指腸乳頭部癌

1. 研究開始当初の背景

切除不能十二指腸乳頭部癌は非常に予後不良で、stageIVでは5年生存率0-19%ときわめて低い。その理由として、比較的まれな癌であるため確立された化学療法がないうえ、胆管と膵管が合流して十二指腸に開口するという解剖学的に複雑な部位に発生するため、胆管癌・膵癌・十二指腸癌のどの癌に準じた化学療法を行うべきか不明であることが挙げられる。よってその発癌起源および分子発生機序解明が急務であるが、十二指腸乳頭部癌の動物モデルが存在しないことがその大きな障壁となっていた。

2. 研究の目的

これまで我々は胆管幹細胞および胆管癌起源細胞の同定を試みてきたが、その過程で偶然にも十二指腸乳頭部に特異的に存在する胆管上皮幹細胞ニッチを同定し、さらに同細胞集団に遺伝子改変を誘導することによって世界初の十二指腸乳頭部癌マウスモデルの樹立に成功した。そこで本研究では同マウスモデルを用いて、十二指腸乳頭部癌の病態解明とそれに基づく新規治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

Axin2 プロモーター下に CreERT を発現する Axin2-CreERT マウスと Rosa26-lox-stop-lox-tdTomato レポーターマウス(Rosa-LSL-tdTomato)を交配させ(Axin2-Tomato)、タモキシフェン投与によって Axin2 陽性細胞を Tomato レポーターで標識し、マウス胆道における細胞系譜解析を行った。発癌モデルとして Axin2 陽性胆管付属腺細胞特異的に PTEN 欠損を誘導したマウス(Axin2-CreERT;PTENflox/flox; Axin2-PTEN)と CK19 陽性表層胆管上皮細胞に PTEN 欠損を導入したマウス(CK19-CreERT;PTENflox/flox; CK19-PTEN)をそれぞれ作製し、腫瘍形成を検討した。

4. 研究成果

乳頭部胆管付属腺の特異的マーカー同定と細胞系譜解析

近年肝内外の大型胆管周囲に存在する胆管周囲付属腺(以下、胆管付属腺)に胆管上皮幹細胞が存在し、癌起源細胞にもなり得るとの説が提唱され注目されている。しかしこれまで胆管付属腺の特異的マーカーが同定されておらず、それを実証するエビデンスレベルの高い研究が存在しなかった。そこで消化管など様々な臓器で幹細胞マーカーとして報告されている Wnt/ β カテニン経路に着目して研究を開始した。上述の Axin2-Tomato マウスにタモキシフェンを投与し Axin2 陽性細胞を赤く標識したところ、総胆管では明らかな局在を認めないのに対して、乳頭部胆管付属腺では底部に限局して Tomato が発現していることがわかった。すなわちこの手法によって乳頭部胆管付属腺特異的に genetic labeling できることが判明したため、この先は乳頭部の胆管付属腺に着目して解析を進めた。またヒトにおいて胆管付属腺は胆管分岐部と乳頭部に多く存在することが知られているが、マウスにおいても乳頭部には多くの胆管付属腺が認められた。

次に乳頭部胆管付属腺の特徴について検討したところ、Sox9, CD44 などの stem/progenitor cell marker を発現するとともに、細胞増殖マーカー Ki67 も高頻度に陽性であった。興味深いことに、成熟胆管上皮マーカーの CK19 は胆管内腔上皮では強く発現する一方で、乳頭部胆管付属腺底部ではその発現が減弱していた。そこで CK19-CreERT マウスと Rosa-LSL-tdTomato を交配させ(CK19-Tomato)、CK19 陽性細胞を genetic labeling したところ、胆管内腔から胆管付属腺上部までが標識された。よって、Axin2-Tomato マウスと CK19-Tomato マウスを用いることで胆管付属腺細胞と胆管内腔細胞を別々に標識できることが分かった。次いでそれぞれの細胞の細胞系譜解析を行ったところ、Axin2-Tomato マウスでは当初胆管付属腺底部に限局していた Tomato 陽性細胞が内腔に向かって進展し、180 日後には胆管内腔を含むほぼすべての上皮細胞が Tomato 陽性細胞に置換された。その一方で、CK19-Tomato マウスでは Tomato 陽性細胞が経時的に減少し、180 日後にはわずかに残存するのみであった。よって乳頭部胆管付属腺底部の Axin2 陽性細胞は胆管上皮幹細胞として機能していることが明らかとなった。

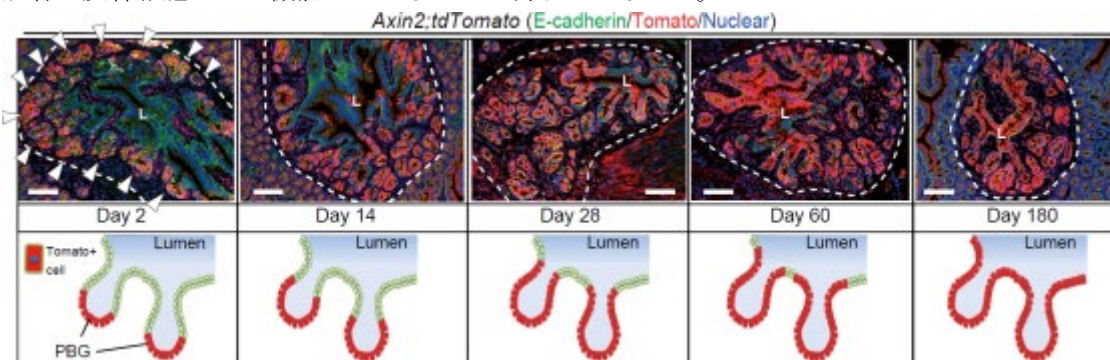


図 1. Axin2 陽性乳頭部胆管付属腺細胞の細胞系譜解析

乳頭部胆管付属腺特異的な Wnt 活性化ニッチ

次に Axin2 陽性胆管付属腺細胞が障害を受けた際の胆管恒常性への影響を検討するため、タモキシフェン誘導性に Axin2 陽性特異的にジフテリア毒素を発現させ、ablation することができるマウス(Axin2-CreERT;Rosa-LSL-DTA)を作製した。すると胆管付属腺底部の Axin2 陽性細胞を ablation しても、表層近くに存在する胆管付属腺細胞が代償性増殖することによって組織が修復され、1 週間後には元の状態に回復することがわかった。また興味深いことに修復された胆管付属腺底部の細胞は再び Axin2 を発現していた。すなわち胆管付属腺底部には Wnt/ β カタニン経路を活性化させる特異的な微小環境が存在する可能性が示唆された。

そこで合計 13 種類の Wnt リガンドおよびそのエンハンサーである R-spondin の発現を in situ hybridization (ISH)にて検討したところ、R-spondin3 (Rspo3)が乳頭部胆管付属腺を取り巻く平滑筋組織、すなわちヒトの Oddi 括約筋に相当する部分に強く発現していることを見出した。そこで平滑筋マーカー Myh11 のプロモーター下に CreERT を発現するマウス(Myh11-CreERT)と Rspo3^{flx/flx} マウスを交配させ、平滑筋細胞特異的に Rspo3 を欠損させた。すると驚くべきことに乳頭部 PBG の Axin2 の著明な発現低下とともに、乳頭部全体が萎縮していた。さらに乳頭部胆管の萎縮に伴って、総胆管の PBG が代償性に増殖し、胆管の恒常性を維持していることも明らかとなった。またヒト乳頭部検体を用いた解析でも、PBG 特異的な Axin2 の発現と Oddi 括約筋における Rspo3 の発現が確認され、ヒトでも同様の Wnt 活性化ニッチが存在することが示唆された。

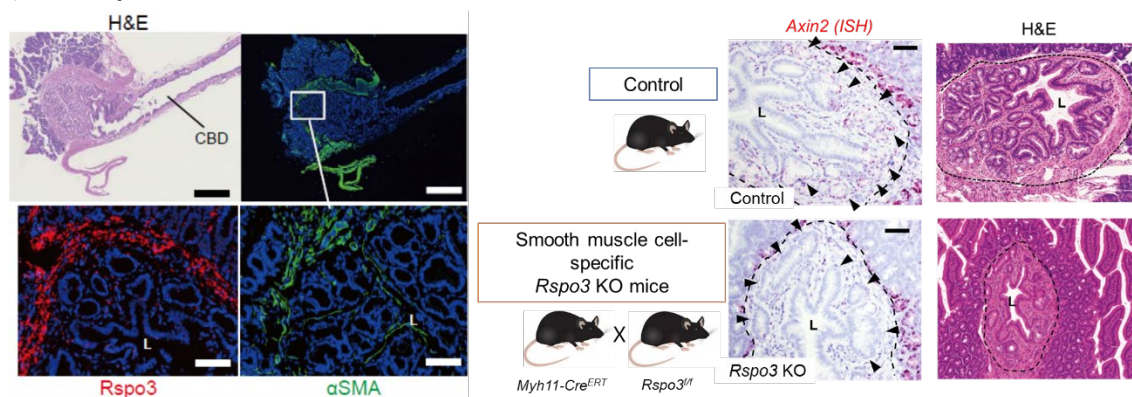


図 2. 平滑筋由来 Rspo3 が乳頭部胆管付属腺の Wnt 活性化ニッチを形成している

乳頭部癌起源ニッチとしての胆管付属腺

一般に癌は、細胞寿命の長い組織幹細胞を起源とすると考えられており、実際に消化管などでは組織幹細胞に遺伝子変異を導入することによって癌が誘導されることが報告されている。最近のヒト乳頭部癌の網羅的解析において PIK3CA や PTEN など PI3K シグナル経路の遺伝子変異が比較的高頻度に認められることが報告されていることから、Axin2 陽性胆管付属腺細胞特異的に PTEN 欠損を誘導した Axin2-PTEN マウスと CK19 陽性表層胆管上皮細胞に PTEN 欠損を導入した CK19-PTEN マウスをそれぞれ作製し、腫瘍形成を検討した。すると前者は全例で乳頭部癌を発症したのに対し、後者では一例も発症しなかった。すなわち、Axin2 陽性胆管付属腺細胞は胆管上皮幹細胞であると同時に、乳頭部癌の癌起源細胞となり得ることが明らかとなった。

最近のヒト十二指腸乳頭部癌の網羅的変異解析および遺伝子発現解析によると、約 70%に Wnt 経路の活性化がみられ、そのうち約半数は Wnt 経路の変異がないにもかかわらず同経路が活性化していることが報告されている。すなわち、十二指腸乳頭部癌の発癌過程において Wnt 経路の活性化が重要であると同時に、周囲細胞との相互作用による同経路活性化が発癌に寄与している可能性を示唆している。そこで Axin2-PTEN マウスにできた乳頭部癌組織から乳頭部癌オルガノイドを樹立し、さらにその培養条件を検討した。その結果、培養液から Wnt3a および R-spondin3 を除去するとオルガノイド形成が著しく抑制されたことから、Axin2-PTEN マウス由来の乳頭部癌はその成長を外因性の Wnt/Rspo 刺激に依存していると考えられた。そこで Axin2-PTEN マウスに Wnt 阻害剤である LGK974 を投与したところ、腫瘍形成が著明に抑制された。すなわち、乳頭部胆管付属腺に存在する Wnt 活性化ニッチは乳頭部癌発症にも寄与しており、治療標的となる可能性が示唆された。

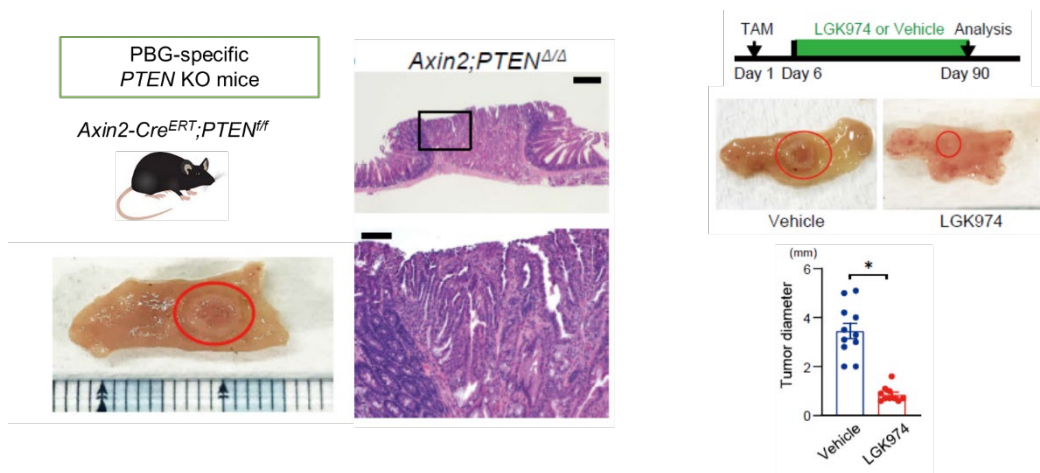


図 3. 乳頭部癌特異的 PTEN 欠損による乳頭部癌モデルと Wnt 阻害剤による治療効果

総胆管における胆管付属腺の特異的マーカー探索

ここまでの検討から、乳頭部の *Axin2* 陽性胆管付属腺細胞が胆管幹細胞として機能することがわかったが、*Axin2* は総胆管の胆管付属腺および表層上皮細胞に *patchy* に発現しており、かつ細胞系譜解析を行うとリボン状に増殖していた。したがって、総胆管では乳頭部とは違った形で恒常性が維持されていると考えられた。そこで、総胆管でも胆管付属腺が幹細胞として機能しているのかどうかを検討するため、総胆管における胆管付属腺の特異的マーカーを探索した。様々な幹細胞マーカーの発現を ISH にて検討したところ、小腸の幹細胞マーカーの一つ *OLFM4* が総胆管の胆管付属腺特異的に発現していることを見出した。これらのデータから、*Olfm4* promoter 下に Tamoxifen-inducible Cre リコンビナーゼを発現するノックインマウスを CRISPR-Cas9 システムを用いて作製し、F0 キメラマウスを得た。

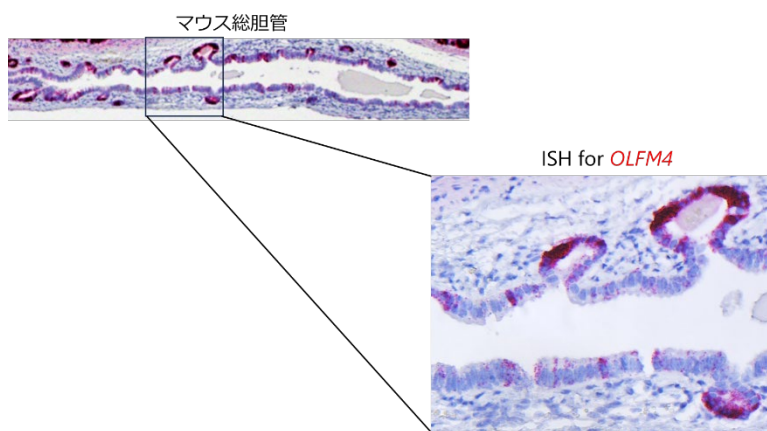


図 4. マウス総胆管における *OLFM4* の発現

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 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hayata Y, Nakagawa H, Koike K.
2. 発表標題 AXIN2+ PERIBILIARY GLAND CELLS IN PERIAMPULLARY REGION SERVE AS BILIARY EPITHELIAL STEM CELLS AND GIVE RISE TO AMPULLARY CARCINOMA.
3. 学会等名 Digestive Disease Week (DDW) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayato Nakagawa
2. 発表標題 Unveiling the Cellular Origins and Therapeutic Targets in Extrahepatic Cholangiocarcinoma: Insights from Mouse Models and Genetic Markers.
3. 学会等名 APASL (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Hayato Nakagawa
2. 発表標題 Molecular mechanisms and cellular origins of biliary tract cancer: cutting-edge knowledge from mouse models.
3. 学会等名 APASL Oncology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中川 勇人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 消化器・肝臓内科 胆道上皮幹細胞と乳頭部腫瘍	

〔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
---------	---------