

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08732

研究課題名（和文）組織間クロストークを基盤とした胆管癌の進展メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of cholangiocarcinoma progression based on intertissue crosstalk

研究代表者

増井 俊彦（Masui, Toshihiko）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20452352

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）：胆管癌と神経組織は親和性が高いことから、本研究ではニューロトランスミッターと胆管癌の関係を明らかにすることを目的として研究を行った。その一つであるドパミンに着目し、そのレセプターの発現と進展への影響を、細胞株オルガノイドおよびヒト胆管癌組織由来オルガノイドを用いて検討した。オルガノイドにより、5種類あるドパミン受容体のうち、足場非依存性を特徴とする幹細胞性と関与する受容体がD1受容体であること、また、胆管癌は単一ではなく、細胞分化の状態やドパミンシグナルに対する反応が異なる集団であることを明らかにした。また、D1受容体にWnt7bが関与して幹細胞分画の増加と関係していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管癌は本邦では年間3500例の胆管癌切除が行われる最難治癌の一つである。また、薬物治療の耐性に関与する癌幹細胞は胆管癌に関してこれまで明らかとなっていない。本研究では胆管周囲の神経に拡がる浸潤癌は成績が極めて不良であることから、胆管癌と神経組織の相互作用に着目し、神経組織から分泌されるドパミンに反応するドパミン受容体が胆管癌における幹細胞フェノタイプに関係していることを明らかにした。さらにWnt7bが幹細胞増加に重要であることを突き止めたことから、今後、この難治癌である胆管癌に対して、Wnt7bをターゲットとした治療開発により、薬物耐性改善による治療効果増強を目指すことにつなげる。

研究成果の概要（英文）：Given the high affinity of cholangiocarcinoma for neural tissue, the aim of this study was to clarify the relationship between neurotransmitters and cholangiocarcinoma.

Focusing on dopamine, one of the receptors, we examined its receptor expression and its effect on progression using cell line organoids and organoids derived from human cholangiocarcinoma tissue. The results revealed that among the five types of dopamine receptors, the D1 receptor is a receptor involved in stemness characterized by scaffold-independence, and that cholangiocarcinomas are not a single group but a population with different cell differentiation states and responses to dopamine signaling. We also found that Wnt7b is involved in the D1 receptor and is associated with increased stem cell fractionation.

研究分野：肝胆膵癌

キーワード：胆管癌 オルガノイド 腫瘍内不均一性 ドパミン 癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

National Clinical Database によると本邦では年間 3500 例の胆管癌切除が行われ、高齢化を背景として全世界的にも増加傾向にある最難治癌の一つである。胆管癌は根治的切除後 5 年生存率が 60%前後であるのに対し、切除断端陽性となった非根治的切除では 20%以下と低く、根治的切除の重要性が極めて高い。特に胆管周囲のグリソン鞘に沿って広がる浸潤癌は断端陽性となりやすく、成績が極めて不良であることから、特に外科医にとり、その進展形式に関与するメカニズムの解明は緊枯の課題となっている。

胆管は神経叢に覆われた肝動脈、門脈と三つ組みとして近接し、グリソン鞘を構成するユニークな解剖学的構造を有している。下部胆管は膵臓近傍から発生することから膵癌との類似性が指摘され、近年、胆管癌でも神経浸潤(ne)が重要な予後因子であることが認識された。しかしながらこの胆管癌の進展メカニズムの解析は、臨床の胆管癌を模したマウスモデルが殆ど無く実験手法が限られていたことから遅々として進んでいない。

近年細胞間のクロストークが注目を集めている。膵癌においては膵癌細胞と CAF (Cancer Associated Fibroblast) と呼ばれる線維芽細胞の間に相互作用があり、CAF により膵癌細胞の増殖が促されていることが報告されている。胆管癌においても、CAF との相互作用によりリンパ管浸潤の増加が報告されており、腫瘍以外の組織からの影響を受けうることを示唆されている。また、胆管発生期においては近接する血管内皮細胞からの TGF $\beta$  により胆管への分化が誘導され、細胞非自立的な振る舞いをすることが報告されている。胆管癌と近接する神経組織との相互作用についてはいくつかの臨床的事実はこの仮説を肯定している。例えば、動脈周囲の神経叢にそった胆管癌の浸潤を経験するが、その際に近接する動脈壁には浸潤が見られないことは、動脈ではなく神経そのものとの胆管癌の相互作用の存在を想定させる。しかしながらこれまで胆管癌においてそのような観点からの神経浸潤の分子機構の解明はできていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト胆管癌オルガノイドと神経組織を用いて胆管癌と神経組織のクロストークを検証するために、クロストークを担う具体的責任因子を同定した上で胆管癌内部でのシグナルを解析し、治療薬への展開を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 研究 1 : 胆管癌神経浸潤における神経組織 癌細胞関連メカニズムの解明

神経周囲での増殖を来す候補因子として抽出しているドパミンについて、in vitro でドパミン添加により、ヒト胆道癌オルガノイドの増殖および悪性度への影響を検討し、同時にドパミン添加後の胆道癌オルガノイドを用いてシングルセルアナリシスを行いシグナル伝達を検討する。さらに、神経組織と共培養したヒト胆管癌オルガノイドにドパミン阻害を行い、フェノタイプがキャンセルされるか否かを検証する。これらにより胆管癌オルガノイドでの非自立的制御機構におけるドパミンの意義を確認する。

### 研究 2 : 新規治療薬としての応用に向けた基礎的検討

研究 1 で同定した神経 胆管癌クロストークに関与するドパミン受容体の阻害薬による治療薬としての可能性を検討する。マウスの癌異種移植モデルを用い、腫瘍の生着に関して in vivo でのドパミンのオルガノイドにおける神経からの関与を検討する。ついで、

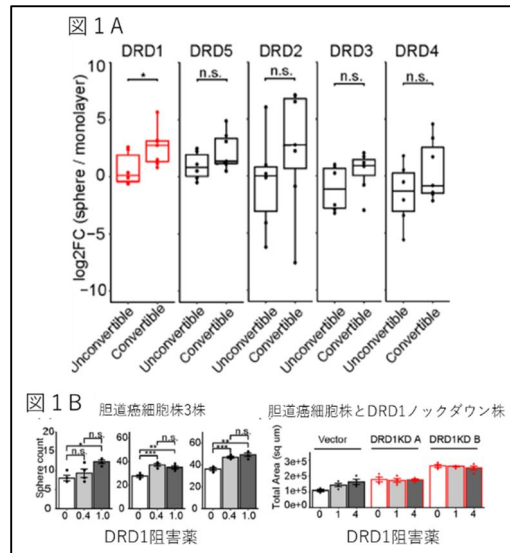
ドパミン阻害薬をマウスに直接投与する in vivo 実験を行い、神経浸潤に対する阻害効果を明らかにする。

#### 4. 研究成果

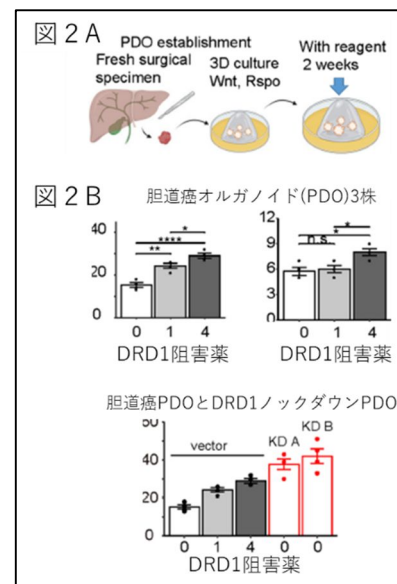
##### 研究 1：胆管癌神経浸潤における神経組織 癌細胞関連メカニズムの解明

##### 研究 1-1 胆道がんオルガノイドにおけるドパミン受容体発現と幹細胞因子の検討

ドパミン受容体は 5 種類ある。まず、そのうちの受容体が幹細胞性に関与しているか検討するために、胆道がんの細胞株 13 株を用いて、sphere formation assay を幹細胞性の指標としてドパミン受容体の変化を検討した。sphere を形成しやすい 7 株では有意に sphere 形成培地においてドパミン受容体 1 (DRD1) の発現が上昇し、幹細胞性に関与するドパミン受容体は DRD1 である可能性が示唆された (図 1A)。この sphere 形成株に対して D1 シグナル阻害薬を用いたところ、sphere 形成数が増加し、DRD1 のノックダウン株でも同様の結果が得られた (図 1B)。これらのことから、神経シグナル因子であるドパミンは、DRD1 の低下を介して胆道がんの幹細胞性分画の増加に関与している可能性が示唆された。



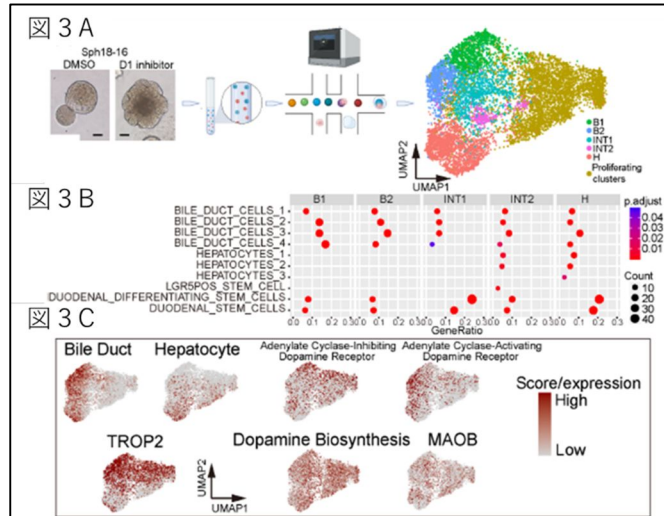
ついで、より臨床に近いモデルとして胆道がん患者から樹立したオルガノイド (PDO) を用い、同様の検討を行った (図 2A)。手術検体から同意を得て採取した胆道がんの 3 次元培養を行い、同様に D1 阻害薬を投与したところ、同様に sphere の増加が認められ、そのうちの一つのオルガノイドで DRD1 ノックダウン株を作成したところ、sphere の増加が認められ、患者由来オルガノイドでも DRD1 の低下を介して胆管がんの幹細胞性を増加させることが示された。(図 2B)



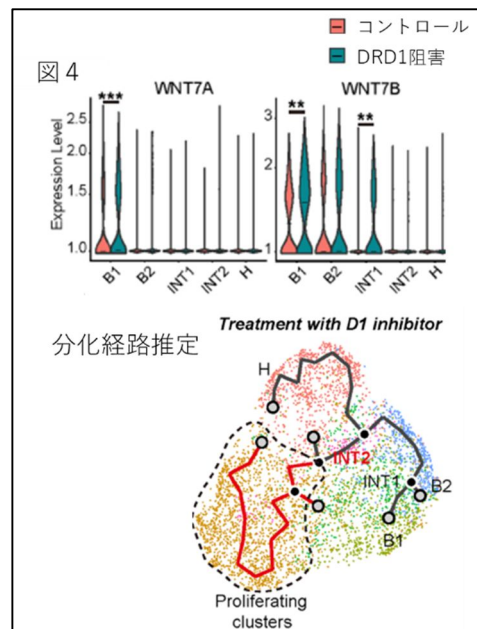
##### 研究 1-2 胆管がんにおける幹細胞要素を持った細胞の同定と DRD1 阻害で増加するメカニズム解明

DRD1 を阻害することでどのように幹細胞性を持った細胞が増加するかを解析するために、D1 阻害薬を投与した PDO と投与していない PDO に対して、増殖細胞を除外してシングルセル RNA 解析を行ったところ (図 3A)、胆管癌は概ね以下の 3 種類の細胞に分けられることがわかった。1) 胆管細胞系マーカーを発現する B1 と B2 タイプ、2) 肝細胞系マーカーを発現する H タイプ、3) その中間の INT1 と INT2 タイプである。INT1 と INT2, H は十二指腸の幹細胞マーカーを発現する一方、B1、B2 タイプは薬剤耐性に関与する遺伝子の発現が低く、B1、B2 タイプは幹細胞性が低い集団であった。(図 3B) ドパミン分泌に

関しては、すべての集団で発現が見られ、ドパミンを介した幹細胞性はオートクラインおよびパラクラインで制御されていると考えられた。(図3C) INT1、INT2では胆管がんの幹細胞マーカーとして知られている CD24 および CD44 が高発現しており、INT 細胞集団が胆管がん細胞の幹細胞と考えられた。



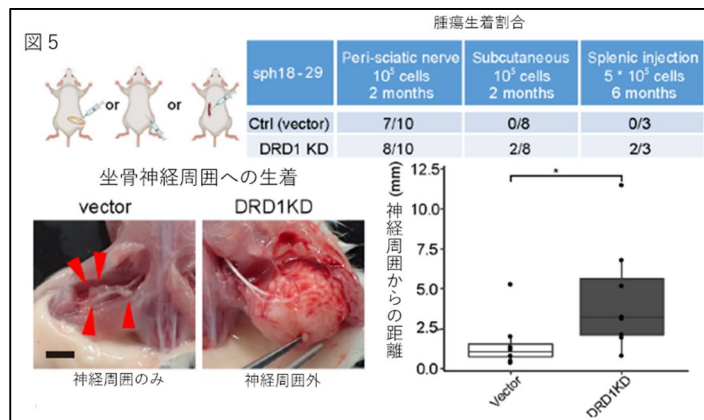
ついで、DRD1 阻害が幹細胞性の増加にどのように関与しているか調べるため、GO-term で DRD1 阻害によって変化した遺伝子を検討したところ、EGFR シグナル、リボソーム蛋白系、形態形成の三つのシグナルパスウェイが同定された。その中で、幹細胞に関する報告があることから、形態形成のパスウェイ上にある WNT7 に着目し、解析を進めたところ、WNT7 は B 細胞で発現が DRD1 阻害で有意に増加し、さらに Wnt7 の受容体は INT 細胞で高いことから、DRD1 阻害により、B 細胞における WNT7A/7B の上昇から INT 細胞の増加につながっていることが示唆された。さらに、分化経路推定を行ったところ、INT 細胞がもっともヒエラルキーの上位にあり、B 細胞、H 細胞、さらに増殖細胞に分化していることが示された。(図4)



## 研究 2：新規治療薬としての応用に向けた基礎的検討

新規治療薬につなげることを目的として、in vivo における DRD1 ノックダウンの意義を解析した。マウス坐骨神経周囲と腹腔内、脾注モデルで PDO の生着を比較したところ、DRD1 ノックダウンを行った PDO は、坐骨神経周囲のみならず、腹腔内、脾注モデルでの生着が認められた(図5)。すなわち DRD1 ノックダウンにより外部からの神経因子の供給を必要とせず PDO 生着性が上昇することが示され、胆管がんにおいて DRD1 をターゲットとすることで幹細胞性を変化させることができることが示唆された。

今後、膵癌にても同様の事象が起こるか、DRD1 の役割解



明を進めている。

上記研究 1 は胆管がんにおけるプロファイル解析であったが、さらに、胆管がんの幹細胞能を持つ INT 集団のマーカールを見出したため、同マーカールを起点として胆管がんの幹細胞のプロファイル解析に取り組んでいる。健常者及び腫瘍組織標本を用いて発現を検討し、ヒトにおける生理学的・臨床病理学的意義を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yogo Akitada, Masui Toshihiko, Takaishi Shigeo, Masuo Kenji, Chen Ru, Kasai Yosuke, Nagai Kazuyuki, Anazawa Takayuki, Watanabe Sadanori, Sakamoto Satoko, Watanabe Akira, Inagaki Ryosaku, Nakagawa Masahiro M., Ogawa Seishi, Seno Hiroshi, Uemoto Shinji, Hatano Etsuro	4. 巻 114
2. 論文標題 Inhibition of dopamine receptor D1 signaling promotes human bile duct cancer progression via WNT signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1324 ~ 1336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15676	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	長井 和之  (Nagai Kazuyuki)  (30567871)	京都大学・医学研究科・講師    (14301)	

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