

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590717
 研究課題名（和文） 肝内胆管癌マウスモデルを用いた起源細胞及び慢性肝障害との関連についての検討
 研究課題名（英文） The relationship between chronic injury and the origin of the liver tumor analyzed using mouse model
 研究代表者
 浅岡 良成（ASAOKA YOSHINARI）
 東京大学医学部附属病院・助教
 研究者番号：90431858

研究成果の概要（和文）：アルブミンプロモーター下に活性化 Kras を発現、Pten をノックアウトしたマウスを作成した。7-8 週齢で死に至る肝臓癌動物モデルとなった。SNP アレイを用いたゲノム解析により、新規シグナル伝達系 Hippo pathway が肝腫瘍の形成に重要であることがわかった。このシグナルの構成因子 SAV1 の異常によって引き起こされる YAP/TAZ の活性化 CTGF の発現上昇が肝腫瘍形成に関わっている可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We generated hepatic cancer mouse model by inducing expression of activated Kras and ablation of Pten under albumin-promoter. The mice died from multiple liver tumor in 7 to 8 weeks. Using genomic analysis of SNP array, we found that Hippo pathway, a novel intracellular signaling, was involved in hepatocarcinogenesis. Aberration of SAV1, a component of the pathway, was shown to induce the activation of YAP/TAZ and following expression of CTGF in a liver cancer cell line.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胆管癌、マウスモデル

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌は進行した状態で発見されることが多く確立した化学療法が少ない難治癌である。 肝内胆管癌は手術による切除が、唯一の根治的な治療である一方、早期発見が困難で、進行した状態で発見されることが多い消化器癌の中で膵癌と並ぶ予後不良の癌である。進行した状態で発見された際には抗癌剤による全身化学療法が適応となる。膵癌に準じ、ジェムシタビンやS1、シスプラチン

が使用されるようになり、予後の改善が図られている（Sasaki et al., Cancer Chemother Pharmacol. and Oncology 2009）ものの、十分な効果をあげているとは言い難い。近年、EGFR変異のある肺癌に対して、その阻害剤であるゲフィチニブが効果を上げているように、各種癌における遺伝子異常を明らかにし、それを効果的に抑制することが重要であることは、臨床的にも示されている。しかし、肝内胆管癌に関しては、特

有の遺伝子異常として、標的となりうるものは少なく、腫瘍形成に関与するシグナルを詳細に検討した報告もまれである。われわれも肝内胆管癌臨床検体でEGFR変異を検索したが、恒常的活性化をきたす変異は認めなかった(2007年アジア太平洋肝臓学会議発表)。**肝内胆管癌のマウスモデルの報告は少なく、分子標的薬を含む化学療法の有効性を vivo で検討した報告はない。**近年、臓器特異的な遺伝子改変技術の進歩に伴い、各種癌のマウスモデルが作成され、その病態解明に寄与している。肝内胆管癌に関しては、albuminプロモーターを用いて、腫瘍抑制遺伝子であるSMAD4 およびPTENを肝臓特異的にノックアウトすることで肝内胆管癌の作成が可能であったことが報告されている (Xu et al., J Clin Invest. 2006)。研究分担者である伊地知は、膵臓特異的に恒常的活性化変異を有するKRAS (KRAS^{G12D})を発現、TGFβシグナルの受容体であるTGFβR2 をノックアウトすることで膵癌マウスモデルを作成し、報告した (Ijichi et al., Genes Dev 2006)。このモデルは、ヒトにできる膵癌に非常に近い組織型を持っており、現在もこのモデルを用いて、膵癌の病態解明および効果的な治療の開発に取り組んでいる。KRAS遺伝子変異に関しては、肝内胆管癌においてもしばしば認められることが報告されているため、今回、albuminプロモーター下で肝臓特異的に変異KRASを導入することで肝内胆管癌の作成可能と考えられた。KRASは、増殖シグナルを受けた受容体型チロシンキナーゼの下流にあり、その下のBRAF-MEK-MAPKシグナルを活性化し、細胞の増殖に働く。一方、PTENは、PI3K-mTORシグナルの抑制因子であり、このシグナルも受容体の下流で細胞の生存・増殖へのシグナル活性化につながっていく。最近の報告では、両シグナルを活性化し、作成した肺癌、メラノーマのモデルに対して、MEK阻害剤やmTOR阻害剤を併用することで腫瘍を効果的に抑制することがわかってきており (Engelman et al., Nat Genet. 2008, Dankort et al., Nat Genet. 2009)、これらの薬剤に関しては、臨床治験のレベルに入ってきているものも多い。われわれも臨床検体の検討により胆道系腫瘍でこれら両シグナルが活性化されていることを確認しており、細胞株のレベルでは、これらの薬剤の併用が効果的であった。以上のことから、さらに多くの臨床検体で、このシグナルの活性化状態を確認するとともに、マウスモデルでこれらの薬剤を中心に、既存の薬剤との併用効果、分子標的薬のもう一つの標的である血管新生阻害剤との併用効果などを検討することは臨床的にも非常に有用であると考えられる。また、以上のシグナルのほかに治療標的となりうるシグナルを見出すことも重要で

あった。**慢性肝障害が肝細胞癌だけでなく肝内胆管癌のリスクとしても知られる一方で、肝内胆管癌は肝細胞癌との混合型腫瘍としても出現するため、その起源細胞に関しては不明な点が多い。**

肝内胆管癌は、B型慢性肝炎やC型慢性肝炎、アルコール性肝障害肝などの慢性障害肝から発生することがしばしば報告されている。また、肝細胞癌との混合型腫瘍として発生することも報告されている。これらの癌細胞の起源として、肝細胞にも胆管細胞にも分化しうる多能性を有した前駆細胞の可能性、あるいは肝細胞が脱分化し生じた細胞である可能性が検討されている。しかし、臨床的な知見のみではこれらの機序の解明は困難であり、マウスモデルによる解析が必要であると考えられる。肝臓特異的 PTEN ノックアウトマウスでは、脂肪肝が生じ、74-78 週で、大半のマウスに肝細胞癌が生じることが報告されている (Horie et al., J Clin Invest. 2004)。これは慢性肝障害から肝細胞癌が生じるモデルと考えられる。われわれはこのマウスを共同研究で使用しており、今回、albumin プロモーター下に変異 KRAS を導入したマウスを作成し、これに肝細胞癌を生じるような肝障害を加えることで、肝障害誘発肝内胆管癌発生モデルを作成することは、肝内胆管癌の起源細胞を検索するうえでも非常に有意義であると考えられる。

2. 研究の目的

albumin プロモーター下で、肝臓特異的に変異 KRAS を導入、PTEN をノックアウトすることにより、肝腫瘍を形成するモデルマウスを作成する。このマウスに関する詳細な検討を加え、活性化しているシグナルを検索、抗腫瘍効果を認める分子標的薬を見出すことを目的とした。また、慢性肝障害から肝細胞癌と胆管細胞癌の混合腫瘍を認めることが知られてきていることから、両者に関与するシグナルに関して検討することも目的とした。

3. 研究の方法

1) *Alb^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox}*マウスの作成 目的の遺伝子型のマウス

*Alb^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flox/flox}*を *Alb^{cre/+}; Pten^{flox/flox}*と *LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox}*との交配により得る。表現型を解析する。

2) SNPアレイを用いて胆道系腫瘍および肝癌で共通に異常を認めるシグナルを検索する

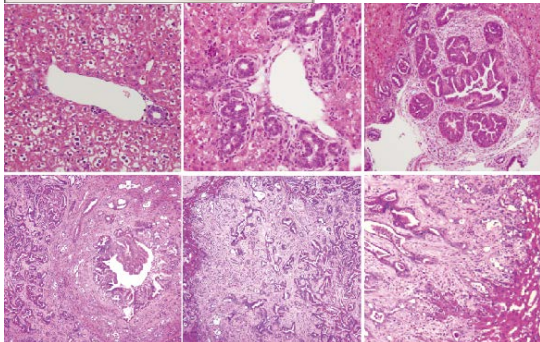
Affymetrix社のGeneChip Human Mapping 100k Setアレイでは、SNPs判定に用いたプローブのシグナル強度とデータ解析ソフトとしてCNAGを使用することで、従来のCGH array等 (1 Mb程度) より高解像度で、より小さい増幅、欠失領域の検出が可能であり、さらに、SNP callの有無でLOHの有無が判定できる。

肝癌、胆道癌細胞株ゲノムDNAを抽出し、100 kまたは500 k chipを用いて、共通の遺伝子増幅および欠失領域やLOHの有無を網羅的に解析する。

この方法を用いて見出した増幅、欠失に関して、western blottingでタンパクレベルでの異常を確認する。さらに遺伝子変異の検索、機能解析を行う。

4. 研究成果

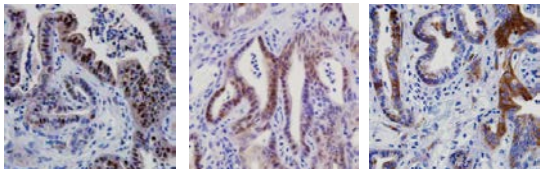
1) アルブミンプロモーター下に活性化 *Kras* を発現、*Pten* をノックアウトしたマウスを作成した。*Pten* のホモ欠失マウスは肝臓内に多発腫瘍を形成し、血性腹水、黄疸をきたし、7-8 週齢で死に至ることがわかった。*Pten* ホモ欠失の場合、胆管癌ができるが、*Pten* ヘテロ欠失では一部に肝細胞癌を認めた。



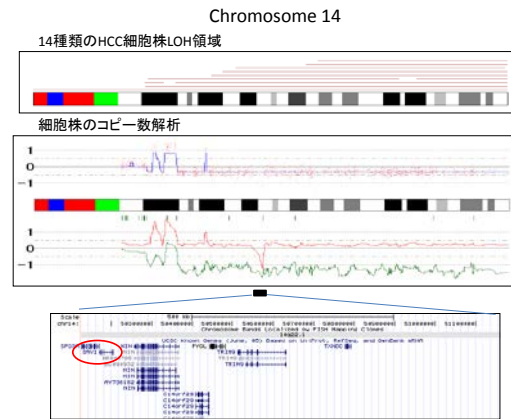
P-Erk

P-AKT (Ser473)

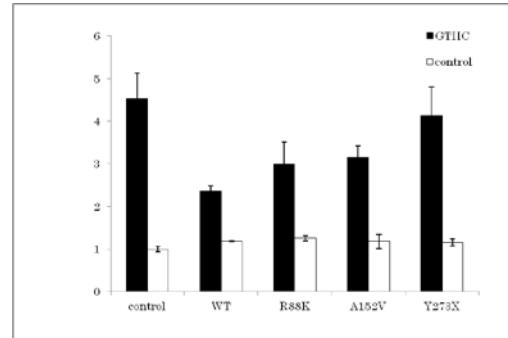
P-S6



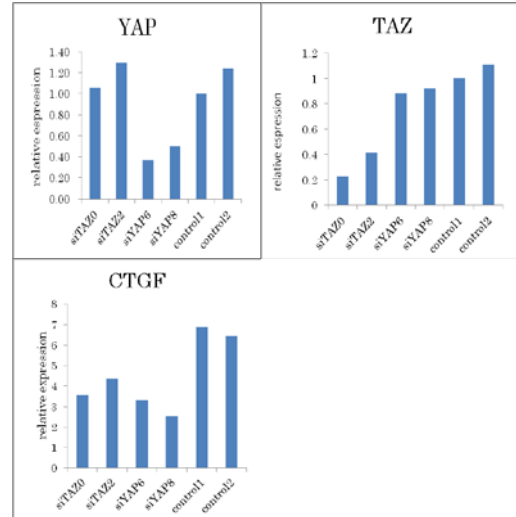
2) 近年、肝腫瘍の形成に関与することが報告された Hippo pathway に注目した。SNP アレイを用いたゲノム解析により、このシグナルの構成因子 *SAV1* が肝癌細胞株で欠失していることを見出した。



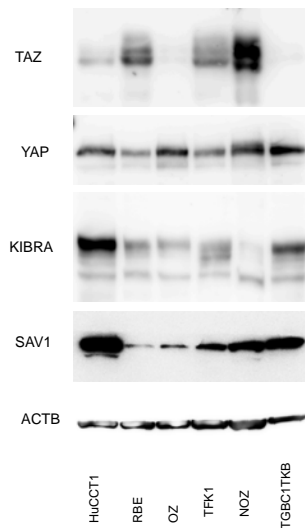
さらにシーケンスの結果、変異を伴う細胞株、臨床検体を見出した。*Hippo pathway* は活性化すると、下流の遺伝子である *YAP/TAZ* の転写活性を抑制するが、ルシフェラーゼアッセイの結果、変異 *SAV1* では抑制効果が低下することがわかった。



SAV1 に変異を伴った細胞では、*YAP* や *TAZ* のノックダウンによりその標的遺伝子 *CTGF* の発現が低下した。



ウェスタンブロットで胆道系腫瘍の細胞株における *Hippo pathway* の構成因子のタンパク発現をみたところ、*SAV1* や *KIBRA* の発現低下細胞がある一方で、*YAP* や *TAZ* の発現は保たれていた。



以上の結果から、肝細胞癌および肝内胆管癌の発生に、Pten や Hippo などの各種シグナルが関わっていることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 14 件)

- ① Prognostic significance of genetic alterations detected by high-density single nucleotide polymorphism array in gastric cancer. Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Sanada M, Nannya Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Imazeki F, Yoshida H, Ogawa S, Yokosuka O, Omata M. *Cancer Sci*. 査読有 2010 May;101(5):1261-9. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01500.x.
- ② Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, Seto M, Imai M, Miyabayashi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Kudo Y, Mohri D, Isomura Y, Ijichi H, Tateishi K, Kanai F, Ogawa S, Omata M, Koike K. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2010 Apr 16;394(4):1042-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.120.
- ③ Reduced expression of RAS protein activator like-1 in gastric cancer. Seto M, Ohta M, Ikenoue T, Sugimoto T, Asaoka Y, Tada M, Mohri D, Kudo Y, Ijichi H, Tateishi K, Otsuka M, Hirata Y, Maeda S, Koike K, Omata M. *Int J Cancer*. 査読有 2011 Mar 15;128(6):1293-302. doi: 10.1002/ijc.25459.
- ④ A genetic polymorphism of CYP2C19 is associated with susceptibility to biliary tract cancer. Isomura Y, Yamaji Y, Ohta

M, Seto M, Asaoka Y, Tanaka Y, Sasaki T, Nakai Y, Sasahira N, Isayama H, Tada M, Yoshida H, Kawabe T, Omata M, Koike K. *J Gastroenterol*. 査読有 2010 Oct;45(10):1045-52. doi: 10.1007/s00535-010-0246-0.

⑤ Intrahepatic bile duct dilatation after percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: impact on patient's prognosis. Kondo Y, Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Masuzaki R, Asaoka Y, Fujie H, Goto T, Omata M, Yoshida H, Koike K. *Liver Int*. 査読有 2011 Feb;31(2):197-205. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02415.x.

⑥ Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. *Int J Cancer*. 査読有 2011 Nov 1;129(9):2226-35. doi: 10.1002/ijc.25861.

⑦ New targeted therapies for gastric cancer. Asaoka Y, Ikenoue T, Koike K. *Expert Opin Investig Drugs*. 査読有 2011 May;20(5):595-604. doi: 10.1517/13543784.2011.566863.

⑧ Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. *Cancer Sci*. 査読有 2012 Apr;103(4):670-6. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02213.x.

⑨ Phosphorylation of Gli by cAMP-dependent protein kinase. Asaoka Y. *Vitam Horm*. 査読無 2012;88:293-307. doi: 10.1016/B978-0-12-394622-5.00013-4.

⑩ IGF-II Producing Hepatocellular Carcinoma Treated with Sorafenib: Metabolic Complications and a Foresight to Molecular Targeting Therapy to the IGF Signal. Okushin K, Asaoka Y, Fukuda I, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Mikami S, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. *Case Rep Gastroenterol*. 査読有 2012 Sep;6(3):784-9. doi: 10.1159/000346462.

⑪ Multicenter, phase II study of gemcitabine and S-1 combination chemotherapy in patients with advanced biliary tract cancer. Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Ito Y, Kogure H, Togawa O, Toda N, Yasuda I, Hasebe O, Maetani I,

Sasahira N, Hirano K, Tsujino T, Tada M, Omata M. Cancer Chemother Pharmacol. 査読有 2010 May;65(6):1101-7. doi: 10.1007/s00280-009-1115-5.

⑫ Prognostic factors in patients with advanced biliary tract cancer receiving chemotherapy. Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Togawa O, Kogure H, Ito Y, Yamamoto K, Mizuno S, Yagioka H, Yashima Y, Kawakubo K, Arizumi T, Matsubara S, Sasahira N, Hirano K, Tsujino T, Toda N, Tada M, Omata M, Koike K. Cancer Chemother Pharmacol. 査読有 2011 Apr;67(4):847-53. doi: 10.1007/s00280-010-1360-7.

⑬ Feasibility study of gemcitabine and cisplatin combination chemotherapy for patients with refractory biliary tract cancer. Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Mizuno S, Yamamoto K, Yagioka H, Yashima Y, Kawakubo K, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Sasahira N, Hirano K, Tsujino T, Tada M, Omata M, Koike K.

Invest New Drugs. 査読有 2011 Dec;29(6):1488-93. doi: 10.1007/s10637-010-9485-4.

⑭ Multicenter phase II study of S-1 monotherapy as second-line chemotherapy for advanced biliary tract cancer refractory to gemcitabine. Sasaki T, Isayama H, Nakai Y, Mizuno S, Yamamoto K, Yagioka H, Yashima Y, Kawakubo K, Kogure H, Togawa O, Matsubara S, Ito Y, Sasahira N, Hirano K, Tsujino T, Toda N, Tada M, Omata M, Koike K. Invest New Drugs. 査読有 2012 Apr;30(2):708-13. doi: 10.1007/s10637-010-9553-9.

〔学会発表〕(計4件)

①浅岡良成. SNP アレイを用いた胃癌細胞株における受容体型チロシンキナーゼ遺伝子異常に関する検討. JDDW2010. 2010年10月13日. 横浜.

②Asaoka Y. Recurrent SAV1 Mutations In Hepatocellular Carcinoma. APASL2011. 2011年2月20日. Bangkok, Thailand.

③浅岡良成. 肝細胞癌における Hippo シグナルの異常に関する検討. 第47回日本肝臓学会総会. 2011年6月3日. 東京.

④浅岡良成. Hippo シグナル異常を伴う肝細胞癌における受容体型チロシンキナーゼに関する検討. JDDW2011. 2011年10月21日. 福岡.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅岡 良成 (ASAOKA YOSHINARI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90431858

(2) 研究分担者

佐々木 隆 (SASAKI TAKASHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 10569106

(3) 連携研究者

池上 恒雄 (IKENOUE TSUNEO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号: 80396712

(4) 研究分担者

伊地知 秀明 (IJICHI HIDEAKI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70463841