

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461031

研究課題名(和文)新規肝内胆管癌マウスモデルと細胞系譜追跡系を用いた発癌分子機序と起源細胞の同定

研究課題名(英文) Analysis of a novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は肝特異的Kras活性化及びPten欠損による新規肝内胆管癌マウスモデルを樹立した。Cre-loxPシステムにより活性化型Kras変異とPtenホモ欠損を胎生期の肝前駆細胞及び成体期の肝細胞に導入したところ、肝内胆管癌のみを生じた。一方、Kras変異とPtenヘテロ欠損では胆管癌と肝細胞癌を、Kras変異単独では肝細胞癌のみを生じた。タモキシフェン誘導性のCre-loxPシステムを用いることにより、肝内胆管癌は胆管上皮由来であることが示唆された。このマウスモデルはヒトの肝内胆管癌の発生メカニズムや治療法の研究に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have established a novel mouse model of ICC by liver-specific Kras activation and Pten deletion. An activating mutation of Kras in combination with deletion of Pten was introduced in embryonic hepatic bipotential progenitor cells and mature hepatocytes using the Cre-loxP system. As a result, liver-specific Kras activation and homozygous Pten deletion cooperated to induce ICCs exclusively. In contrast, Kras activation in combination with heterozygous Pten deletion induced both ICCs and HCCs, whereas Kras activation alone resulted in HCCs but not ICCs. Furthermore, a cell-lineage visualization system using tamoxifen-inducible Cre-loxP demonstrated that the ICCs did not originate from hepatocytes but from cholangiocytes. Our data suggest that mice carrying liver-specific Kras activation in combination with homozygous Pten deletion should be useful for the investigation of therapeutic strategies for human ICC.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝内胆管癌 マウスモデル 起源細胞 Kras Pten Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌は肝内胆管上皮由来の悪性腫瘍と考えられており、原発性肝癌の約5%を占める。根治的治療は肝切除によるしかなく、切除不能症例には放射線治療や化学療法がおこなわれるが、平均生存期間は11.3カ月と予後不良であり、より有効な治療法の開発が望まれる。肝内胆管癌に対する治療法開発の遅れの一因は、この癌の発生進展の分子生物学的メカニズムの研究が十分に進んでいないことであり、肝内胆管癌の発生源となる起源細胞についても未解明の点が多い。現在までに報告されている肝内胆管癌マウスモデルには肝特異的 Pten・Smad4 欠損マウスや肝特異的 Kras 活性化 p53 欠損マウスがあるが、発癌までに6カ月もの長期間を要したり、肝内胆管癌だけでなく肝細胞癌も生じたりするなど理想的な肝内胆管癌マウスモデルとはいえない。より短期間に肝内胆管癌のみを発症するマウスモデルは肝内胆管癌の研究に有用である。

2. 研究の目的

肝内胆管癌の新規マウスモデルを構築し、起源細胞を同定し、癌の進展メカニズムを解明することにより、肝内胆管癌に対する新規治療法の開発に貢献する。

3. 研究の方法

アルブミン遺伝子のプロモーターの制御下に Cre リコンビナーゼを発現する Alb-Cre マウスは、胎生期においては肝前駆細胞である肝芽細胞で、成体期においては肝細胞で Cre を発現することが知られている。我々はまず Alb-Cre マウスを条件的活性化型 Kras ノックインマウス及び条件的 Pten 欠損マウスと交配し、肝特異的 Kras 活性化 Pten 欠損マウスを作製した。さらにタモキシフェンにより Alb プロモーター制御下に Cre の発現を誘導できる Alb-CreERT2 マウスを用いて、生後10日または8週で肝特異的 Kras 活性化と Pten 欠損を生じるマウスを作製した。また、生後10日または8週でのタモキシフェン投与により Alb-CreERT2 マウスにおいて遺伝子組み換えが起こる肝内の細胞をレポーターマウス (Rosa26-mT/mG マウス) を用いて検討した。さらにさらにタモキシフェンにより CK19 プロモーター制御下に Cre の発現を誘導できる K19-CreERT2 マウスを用いて、生後8週で Kras 活性化と Pten 欠損を生じるマウスを作製した。最後に肝特異的 Kras 活性化 Pten 欠損マウスに生じる肝内胆管癌の発症における Notch シグナルの関与を明らかにするため Notch シグナルの重要な転写因子 Rbpj の条件的欠損マウスを交配し、腫瘍発生を検討した。

4. 研究成果

Alb-Cre マウスを用いた場合、肝特異的 Kras 活性化 Pten 欠損マウス (AKPP マウス) は生後5週齢で肝内胆管癌を生じた。その後腫瘍の進行に伴い、マウスは肝腫大、黄疸などの症状を呈し、生後7週齢で死亡した (図1)。組織学的には周囲に強い線維化を伴う腺癌

であり、ヒト肝内胆管癌に類似した腫瘍であった。一方、Kras 活性化と Pten ヘテロ欠損を有するマウス (AKP マウス) には生後6カ月程度で肝内胆管癌と肝細胞癌の両方を認め、平均生存期間は8カ月であり、Kras 活性化のみを有するマウス (AK マウス) は1年以上生存し、一部のマウスに肝細胞癌を発症したが、肝内胆管癌は認めなかった (図1)。

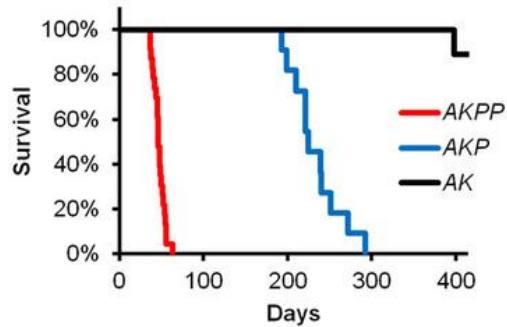


図1 肝特異的 Kras 活性化 Pten 欠損マウスの生存曲線

これらの結果より、肝特異的 Kras 活性化 Pten 欠損マウスは肝内胆管癌のみを短期間のうちに発症するマウスモデルであり、活性化型 Kras の発現下において Pten の発現量が胆管癌を生じるか肝細胞癌を生じるかという運命決定を担っていることが分かった。

次に Alb-CreERT2 マウスを用いて Kras 活性化及び Pten 欠損を誘導した場合、生後10日目の誘導では肝内胆管癌のみを生じ、生後8週齢での誘導では肝細胞癌とその前癌病変を生じることが明らかとなった。

そこで Alb-CreERT2; Rosa26mT/mG マウスに生後10日及び8週でタモキシフェンを投与し、遺伝子改変が生じた細胞を検討したところ、生後10日目では肝細胞のみならず、胆管でも遺伝子改変が起きていたが、生後8週では肝細胞のみで遺伝子改変が起きていた (図2)。このことから生後10日目に Kras 活性化と Pten 欠損を誘導した場合に生じる胆管癌は胆管上皮細胞由来である可能性が示唆された。

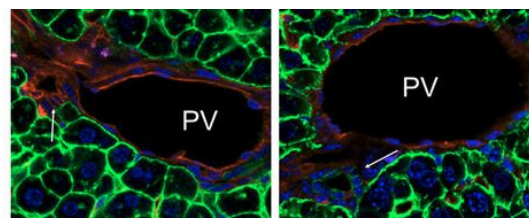


図2 Alb-CreERT2mT/mG マウスのタモキシフェンによる遺伝子改変部位 (赤: tdTomato, 緑: EGFP) 左: 生後8週, 右: 生後10日

次に K19-CreERT2 マウスを用いて生後8週でタモキシフェンにより Kras 活性化及び Pten 欠損を誘導した。K19-CreERT2 マウスでは肝内胆管のみならず、肺、消化管、膵管などでも Cre による遺伝子改変を生じることが知られている。今回の実験系では肺病変が原因でマ

ウスがタモキシフェン投与後4週間で死亡した。その時点での組織学的検討では、消化管上皮の過形成性変化、膵管及び肝外胆管の乳頭状過形成のほか肝内胆管にも乳頭状の過形成性変化を認め肝内胆管癌の前癌病変と考えられた。

以上の結果から肝特異的 Kras 活性化 Pten 欠損マウスに生じる肝内胆管癌は胆管上皮細胞に由来することが示唆された。

次に肝特異的 Kras 活性化 Pten 欠損マウスに Rbpj 欠損マウスを交配したところ、マウスは肝障害と考えられる死因により生後5週齢で死亡したが、胆管癌様病変は肝門部ではほとんど抑制されなかったが、肝末梢部では著明に抑制されていた。このことは肝門部と肝末梢部での肝内胆管癌の形成に Notch シグナルが異なる役割を担っていることを示唆している。

本研究では肝内胆管癌のみを早期に発症する新規肝内胆管癌マウスモデルの構築に成功し、生じる胆管癌が胆管上皮由来である可能性を示した。また、Notch シグナルの発癌への関与が肝内胆管癌の発症部位により異なることを示した。これらの成果は今後の肝内胆管癌の発症メカニズム解明及び治療開発を目指した研究に有用であると考えられる。

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2件)

Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, Fukushima N, Maeda S, Koike K, Furukawa Y. A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. Sci Rep 査読あり 6:23899,2016

Mohri D, Ijichi H, Miyabayashi K, Takahashi R, Kudo Y, Sasaki T, Asaoka Y, Tanaka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Tada M, Isayama H, Koike K. A potent therapeutics for gallbladder cancer by combinatorial inhibition of the MAPK and mTOR signaling networks. J Gastroenterol 査読あり 51:711-721,2016

[学会発表](計6件)

寺門侑美、池上恒雄、野口玲、朱赤、松原大祐、山口貴世志、古川洋一 新規肝内胆管癌マウスモデルにおける起源細胞の検討 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月7日 横浜

Ikenoue T, Terakado Y, Yamaguchi K, Furukawa Y. Elucidation of cellular origin of mouse intrahepatic

cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. AACR Annual Meeting 2016年4月17日 New Orleans, USA

Terakado Y, Ikenoue T, Yamaguchi K, Furukawa Y. Establishment of a novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. AACR Annual Meeting 2016年4月17日 New Orleans, USA

池上恒雄、寺門侑美、山口貴世志、浅岡良成、伊地知秀明、立石敬介、小池和彦、古川洋一 Kras変異とPten欠失による肝内胆管癌マウスモデルの分子生物学的特徴の検討 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日 名古屋

寺門侑美、池上恒雄、山口貴世志、浅岡良成、伊地知秀明、立石敬介、小池和彦、古川洋一 肝内胆管癌における Notch-Rbpj 経路の役割の検討 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日 名古屋

寺門侑美、池上恒雄、山口貴世志、浅岡良成、伊地知秀明、立石敬介、小池和彦、古川洋一 肝特異的 Kras 活性化及び Pten 欠失による新規肝内胆管癌マウスモデルの樹立と解析 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月26日 名古屋

[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

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

(2)研究分担者

古川 洋一 (FURUKAWA Yoichi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：20272560

伊地知 秀明 (Ijichi Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70463841

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()