

博士論文

新規肝内胆管癌マウスモデルの樹立と
発癌メカニズムの解析

寺門(千野) 侑美

新規肝内胆管癌マウスモデルの樹立と
発癌メカニズムの解析

所属

東京大学大学院医学系研究科

病因病理学専攻 臨床ゲノム腫瘍学分野

指導教官

古川洋一教授

申請者名

寺門(千野) 侑美

目次

目次	2
要旨	6
1. 序論	7
2. 材料と方法	
1) マウス	13
2) 遺伝子型の解析	16
3) タモキシフェンの投与	17
4) 病理学的検討	17
5) 共焦点顕微鏡による観察	18
6) 免疫染色	18
7) マウス肝内胆管癌由来初代培養細胞株の樹立	20
8) siRNA によるノックダウン	21
9) タンパク質抽出とウェスタンブロッティング	22
10) レポーターアッセイ	23
11) DNA 抽出	25
12) メチル化特異的 PCR	25
13) アンプリコンシーケンス	27

14) RNA 抽出と RT-qPCR	28
3. 結果	
1) <i>AKPP</i> マウスに発生した肝腫瘍の病理組織学的検討	30
2) <i>AKPP</i> マウスに発生した肝腫瘍の解析	34
3) <i>AKPP</i> マウスの肝内胆管癌における細胞増殖の検討	37
4) <i>AKPP</i> マウス肝腫瘍における Mapk と Pi3k-mTorc1 シグナル伝達経路 の検討	38
5) <i>AKPP</i> マウスの肝内胆管癌における遺伝子変異の検討	41
6) <i>p16</i> 発現とプロモーター領域メチル化の検討	43
7) 肝内胆管癌の起源細胞の検討	45
8) <i>AERKPP</i> マウス肝腫瘍の起源細胞の検討	49
9) 成熟した胆管上皮における <i>Kras</i> 活性化 <i>Pten</i> 欠損により生じる肝腫瘍 の検討	51
10) マウス肝腫瘍における Notch 経路の役割の解析	54
11) <i>AKPP</i> マウスの肝内胆管癌における <i>Hes1</i> 発現調節機序の検討	57
12) Mapk 経路による <i>Hes1</i> mRNA の制御機構の検討	61
13) <i>AKPP</i> マウスの肝内胆管癌形成における、 <i>Hes1</i> の関与の <i>in vivo</i> での検討	66

14) <i>AKPP</i> マウスの肝内胆管癌形成における <i>Rbpj</i> の関与の <i>in vivo</i> での検討	69
15) <i>AERKPPRR</i> マウスによる肝末梢胆管病変における <i>Rbpj</i> の関与 の検討	72
4. 考察	74
5. 謝辞	83
6. 引用文献	84

要旨

肝内胆管癌は予後不良な癌であり、新規治療法の開発が望まれる。本研究では、発癌機序の解明や新規治療の開発に有用な新規肝内胆管癌マウスモデルを樹立し、癌の起源細胞を検討するとともに、発癌における Notch シグナルの関与を検討した。肝特異的な *Kras* 活性化と *Pten* 欠損の導入により、肝内胆管癌のみを生じるマウスモデルが樹立できた。さらに、細胞系譜特異的遺伝子改変システムにより、このマウスにおける胆管癌は胆管上皮細胞由来であることが示唆された。また、Notch 関連転写因子 *Rbpj* は末梢の肝内胆管の新生を介して発癌に関わるが、Notch 経路の標的分子 *Hes1* は発癌に不可欠ではないことが明らかとなった。

序論

胆管癌は胆管上皮に発生する悪性腫瘍であり、発生部位によって肝内胆管癌と肝外胆管癌に分けられる¹。肝内胆管癌は胆管細胞癌とも呼ばれ、肝臓内で胆管上皮細胞に近い特徴を持った原発性上皮性腫瘍である。また、我が国においては原発性肝癌の中の約5%を占め^{2,3}、肝細胞癌に次いで多い。肝内胆管癌の患者数は日本、北アメリカ、ヨーロッパを含め全世界で増加傾向にある⁴⁻⁶。我が国においては、2014年の胆道癌の死亡数は約18200人で、がん死亡全体の約5%を占めている⁷。肝内胆管癌の発生には、肝内胆管結石、原発性硬化性胆管炎、ウイルス肝炎、肝吸虫など、様々な要因が関わっている^{1,3,8}。進行した肝内胆管癌の症状には、黄疸、腹痛、発熱、体重減少があるが、早期癌では自覚症状に乏しく、血液検査による肝胆道酵素の上昇や腹部エコーや、CTによる腫瘍像や肝内胆管の拡張像が発見の契機となることが多い^{3,9}。外科的手術が根治のための唯一の治療手段となる。しかし切除不能な進行癌として発見されることが多く、しかも切除可能な場合においても5年生存率は約30%と、肝内胆管癌の予後は不良である⁹。切除不可能な場合には化学療法が第一選択となり、標準治療としてシスプラチンとゲムシタビンの併用療法がおこなわれる¹⁰。しかし、多少の生存期間の延長が得られるが、十分な予後の改善は困難であり、より効果がある新規治療薬開発が望まれる。

遺伝子改変マウスモデルは、ヒト疾患の分子メカニズムの解明と、新しい治療薬開発のための重要な材料となっている。がんのモデルとしても、様々な遺伝子改変マウスが作られている。例えば、膵臓特異的活性型 *Kras* 変異によるヒト膵癌マウスモデルは、前癌病変である膵上皮内腫瘍 (pancreatic intraepithelial neoplasms: PanIN)を発生し、それらの病変は1年以上の長期間の経過後に膵管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma : PDAC)へと進行する¹¹。

さらに、この膵臓特異的活性型 *Kras* 変異マウスに *Ink4a/Arf*、*Trp53*、*Tgf β type II receptor* または *Smad4* など PDAC の発生進展に関わる遺伝子の機能を欠損させたマウスを交配することで、より早期に PDAC を発症するマウスモデルが樹立され、これらのマウスは膵発癌メカニズムの解明や新規治療薬の開発に利用されている¹²⁻¹⁵。膵癌のマウスモデルに比較して、肝内胆管癌を自然発生する遺伝子改変マウスモデルは種類が少ない。現在までに、肝特異的 *Pten/Smad4* ダブルノックアウトマウス¹⁶、肝特異的活性型 *Kras* ノックイン+*Trp53* ノックアウトマウス¹⁷、肝特異的 *Sav1* ノックアウトマウス¹⁸、そして肝特異的 Notch 細胞内ドメイン (intracellular domain of Notch receptor:NICD)過剰発現マウス¹⁹の4種類が報告されている。これらのマウスモデルのうち、肝特異的活性型 *Kras* ノックイン+*Trp53* ノックアウトマウスと、肝特異的 *Sav1* ノックアウトマウスの2種類は、遺伝子組み換えが肝細胞と胆管上皮細胞の両者

への分化能を有する前駆細胞で誘導されるため、肝内胆管癌だけでなく肝細胞癌も発生する。したがって、肝内胆管癌の発生・進展メカニズムの解明には、肝内胆管癌のみを発症する遺伝子改変マウスモデルの樹立が望まれる。

肝内胆管癌では、発癌に重要な細胞内シグナル伝達経路である **RAS** 経路と **Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)** 経路の活性化が、比較的高率に認められることが報告されている²⁰⁻²⁴。**RAS** 経路の活性化は様々なヒトの癌において見られるが、ヒト癌のうち約 30%は **RAS** ファミリー遺伝子 (*KRAS*, *NRAS*, *HRAS*)のいずれかに活性化型変異を有し、それによって下流のシグナル伝達経路が活性化している。特に *KRAS* 変異は膵癌の 90%、大腸癌の 40%に変異が認められるなど、ヒトの癌において最も高率に変異を認める遺伝子の一つである^{25,26}。原発性肝癌の中でも肝細胞癌においては、*KRAS* 変異は約 2%にしか認めないと報告されている^{27,28}。しかし、肝内胆管癌においては 5-54%と比較的高率に *KRAS* 変異を認め^{21,23,24,29}、*TP53* 遺伝子に次いで高率に変異を認める遺伝子となっている。また、**RAS** のエフェクター分子である **RAF** ファミリーに属する *BRAF* 遺伝子にも、肝内胆管癌の 22%に変異を認めることが報告されている³⁰。これらの結果は、**RAS** 経路の活性化がヒト肝内胆管癌の形成に重要であることを示唆している (図 1)。

PI3K 経路も、種々のがんにおいて活性化している細胞内シグナル伝達経路

である。例えば、PI3K の触媒サブユニット一つである p110 α をコードする *PIK3CA* 遺伝子の活性化型変異や、PI3K の抑制分子である phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (*PTEN*)の機能喪失変異や欠失が、様々ながん で報告されている³¹。ヒト肝内胆管癌においては、*PIK3CA* や *PTEN* の遺伝子 変異はそれぞれ 5%、11%程度と低頻度である^{24,32,33}。しかし、PI3K 経路活性 化の指標である高リン酸化型の活性化型 AKT は、高率に発現していると報告 されている¹⁶、したがってこの経路の活性化も、ヒト肝内胆管癌の発生に重要 な役割を演じている可能性が示唆される。

PTEN は 1997 年に発見された腫瘍抑制因子である。*PTEN* は、ホスファチジ ルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PI(3,4,5)P₃)のホスファチジルイノシトール 4,5- ビスリン酸 (PI(4,5)P₂)への脱リン酸化反応を触媒する酵素で³¹、その遺伝子異常 による機能喪失は、PI3K によって生成される PI(3,4,5)P₃ の脱リン化が減少し PI(3,4,5)P₃が増加する。誘導された PI(3,4,5)P₃はセカンドメッセンジャーとして 働き、PDK1 や AKT などの下流のキナーゼを活性化して、細胞の増殖や生存な どを促進する。ヒト肝内胆管癌における *PTEN* 遺伝子の機能喪失変異や欠失の 頻度は高くないが^{24,32}、肝吸虫による肝内胆管癌で *PTEN* のプロモーター領域内 の CpG アイランドの高メチル化が認められること⁸、*PTEN* を阻害する microRNA-21 の肝内胆管癌における過剰発現が認められること³⁴、機能低下型

PTEN と考えられているリン酸化型 PTEN がヒト肝内胆管癌で高頻度に認められることなどから¹⁶、*PTEN* 遺伝子異常以外の PTEN 不活化機序によっても、下流キナーゼの活性化がもたらされている可能性が考えられる。

これらのエビデンスは、RAS 経路の活性化と PTEN の不活化に起因する PI3K 経路の活性化が、ヒト肝内胆管癌において重要な役割を演じていることを示唆している。そこで私は、活性化型 *Kras* ノックインと *Pten* ノックアウトにより両経路を共活性化することにより、新規肝内胆管癌マウスモデルが樹立できるのではないかと考えた。

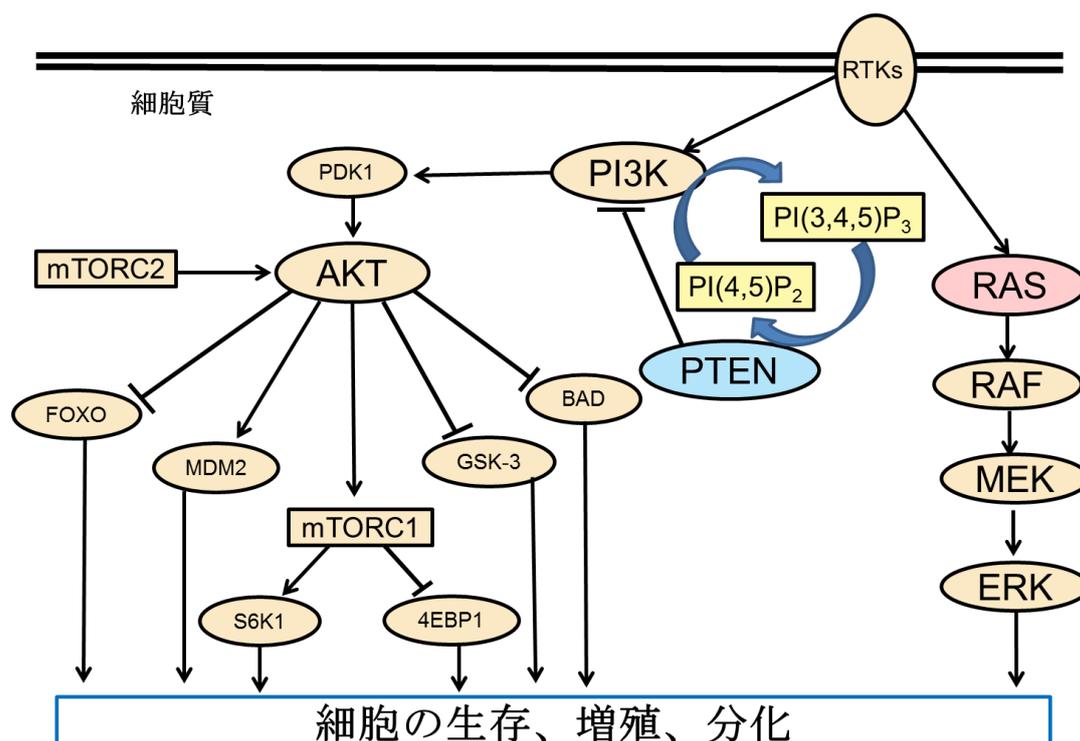


図1 MAPK 経路と PI3K 経路

また近年、肝内胆管癌の起源細胞が注目されている^{2,35-39}。肝内胆管癌は、病

理組織学的に胆管様の管腔構造を呈し、胆管上皮細胞のマーカである Cytokeratin 19 (CK19)などが陽性を示すことから、従来から胆管上皮由来の悪性腫瘍であると考えられてきた。しかし、胆管癌と肝細胞癌の混合型肝癌や肝幹細胞マーカ発現を有する細胆管癌の存在は、胆管上皮細胞と肝細胞の共通の起源である、肝前駆細胞や肝幹細胞からの肝内胆管癌発生の可能性を示唆している³⁷。また、マウスモデルを用いた研究では、成熟した肝細胞における活性化型 Notch (NICD)と活性化型 Akt の共発現や、チオアセトアミドの投与により肝細胞から胆管癌が生じることが示され、肝細胞が肝内胆管癌の起源細胞となり得ることが示唆されている⁴⁰⁻⁴²。このように肝内胆管癌起源細胞の候補は複数提唱されており、その同定は発癌メカニズムの解明や新規治療法や予防法を開発するために非常に有用と考えられる。

そこで本研究では、まず肝特異的活性化型 *Kras* 変異ノックイン・*Pten* ノックアウトマウスの作製を試み、その結果、新規肝内胆管癌マウスモデルを樹立することに成功した。次に、このマウスモデルにおける胆管癌の起源細胞を検討した。さらに、近年肝内胆管癌の発生・進展に重要であると報告されている Notch シグナル¹⁹について、本マウスモデルの肝内胆管癌の発癌メカニズムにおける役割を検討した。

材料と方法

1. マウス

Alb-Cre マウス (アルブミンプロモーター制御下に *Cre* リコンビナーゼを発現するマウス)、*LoxP-STOP-loxP (LSL)-Kras^{G12D}* マウス(条件的活性型 *Kras* 変異ノックインマウス)、及び *R26R^{mTmG}* マウス (*Rosa26* プロモーター下 *tdTomato* を発現し、*Cre* 依存的に *GFP* 発現に切り替わるマウス)は Jackson Laboratory、*Rbpj^{fllox}* マウス (条件的 *Rbpj* ノックアウトマウス)は理研バイオリソースセンターから購入した。また、*Pten^{fllox}* マウス (条件的 *Pten* ノックアウトマウス)は Tak W Mak 博士 (University of Toronto)、*Alb-Cre^{ERT2}* マウス (タモキシフェン誘導的にアルブミンプロモーター制御下に *Cre* を発現するマウス) は Daniel Metzger、Pierre Chambon 両博士 (IGBMC)、*CK19Cre^{ERT}* マウス (タモキシフェン誘導的に *CK19* プロモーター制御下に *Cre* を発現するマウス)は Guoqiang Gu 博士 (Vanderbilt University)、*Hes1^{fllox}* マウス (条件的 *Hes1* ノックアウトマウス)は影山龍一郎博士 (京都大学)から供与された。本研究は、東京大学医科学研究所の動物実験委員会の承認を得て、東京大学動物実験実施マニュアルに従って行った。

条件的に活性型 *Kras* 変異を発現する *LSL-Kras^{G12D/+}*マウス、条件的 *Pten* ノックアウトマウス (*Pten^{fllox}*)、胎生期の肝芽細胞及び成体期の肝細胞において *Cre* リコンビナーゼを発現する *Alb-Cre* マウスを交配して、*Alb-Cre/+;LSL-*

Kras^{G12D/+};*Pten*^{flx/flx} (以下 AKPP)、*Alb-Cre*^{+/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pten*^{flx/+} (以下 AKP)、*Alb-Cre*⁺;*LSL-Kras*^{G12D/+} (以下 AK)、*Alb-Cre*^{+/+};*Pten*^{flx/flx} (APP)の3種類の遺伝子型のマウスを作製した。また、*LSL-Kras*^{G12D/+} マウス及び *Pten*^{flx/flx} マウスを、肝特異的かつタモキシフェン誘導性に Cre リコンビナーゼを発現するマウス *Alb-Cre*^{ERT2} と交配し、*Alb-Cre*^{ERT2/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pten*^{flx/flx} (以下 AERKPP) マウスを作製した。さらに、*LSL-Kras*^{G12D/+} マウス及び *Pten*^{flx/flx} マウスを、肝臓においては胆管上皮細胞特異的かつ薬剤誘導性に Cre リコンビナーゼを発現する *Ck19Cre*^{ERT} マウスと交配して、*Ck19Cre*^{ERT/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pten*^{flx/flx} (以下 *Ck19KPP*)マウスを作製した。また、近年報告されている Notch シグナルの胆管癌発症における重要性を本マウスモデルで検証するために Notch シグナルに必須な転写因子 *Rbpj*、そして Notch シグナルの重要なエフェクター遺伝子 *Hes1* の条件的ノックアウトマウスを、肝特異的 *Kras* 変異/*Pten* ノックアウトマウスに交配し、それぞれ *Alb-Cre*^{+/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pten*^{flx/flx};*Rbpj*^{flx/flx} (AKPPRR)マウスと *Alb-Cre*^{+/+};*LSL-Kras*^{G12D/+};*Pten*^{flx/flx};*Hes1*^{flx/flx} (AKPPHH) マウスを作製した。上記遺伝子改変マウスの交配方法の概略を図 2 に示す。また、*Alb-Cre*^{ERT2} マウスにおけるタモキシフェンによる遺伝子改変誘導部位の検討のため、*Alb-Cre*^{ERT2};*R26R*^{mTmG/+} マウスを作製した。なお本研究では全ての実験において、C57BL/6 に

10 回以上戻し交配されたマウスを用いた。

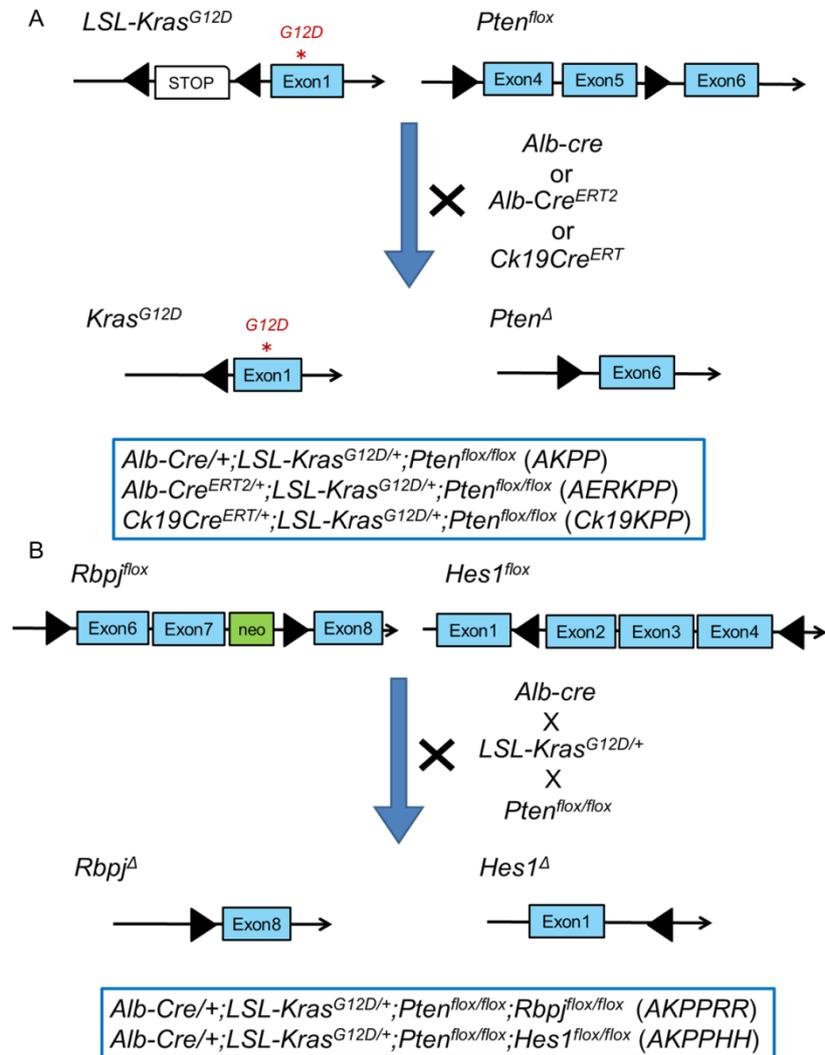


図2 使用したマウスの系統

$LSL-Kras^{G12D}$ マウス (Exon1 の 12 番目のグリシン (G)がアスパラギン酸 (D)に変化した条件的ノックインマウス)と、 $Pten^{flox}$ マウス (Exon4、5 の条件的欠損マウス)を交配して作製された $LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox}$ マウスに、 $Alb-Cre$ マウス、 $Alb-Cre^{ERT2}$ マウス、 $Ck19Cre^{ERT}$ マウスを交配し、それぞれ $Alb-Cre^{+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox}$ (AKPP)、 $Alb-Cre^{ERT2/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox}$ (AERKPP)、 $Ck19Cre^{ERT/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox}$ (Ck19KPP) という遺伝子型のマウスを作製した。さらに、Notch シグナル阻害による肝内胆管癌発生進展への効果検討のため、 $Rbpj^{flox}$ マウス (Exon6、7 の条件的欠損マウス)、 $Hes1^{flox}$ マウス (Exon2、3、4 の条件的欠損マウス)を肝特異的 $Kras$ 変異+ $Pten$ ノックアウトマウスに交配し、それぞれ $Alb-Cre^{+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox};Rbpj^{flox/flox}$ (AKPPRR)と $Alb-$

Cre^{+/+}; *LSL-Kras*^{G12D/+}; *Pten*^{flox/flox}; *Hes1*^{flox/flox} (AKPPHH) という 2 種類のマウスを作製した。

2. 遺伝子型の解析

マウスの尻尾先端を切断して 1.5 mL チューブに移し、Tail Lysis Buffer (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH.3)、1.5 mM MgCl₂、0.1% (w/v) ゼラチン、0.45% NP-40、0.45% Tween20 (Sigma)) 250 μL と 10 mg/mL の proteinase K (Roche) 5 μL を加えたのち、55°C で 2 h インキュベートした。Proteinase K を 98°C、5 min で失活させたのち DNA を使用した。遺伝子型は Polymerase Chain Reaction (PCR) を用いて解析した。PCR は、GoTaq® Green Master Mix (Promega) を用いて、95°C 2 min のち、95°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 1 min を 33 サイクル繰り返した。使用したプライマーは表 1 に示す。

遺伝子名	プライマー (5' to 3')	allele (bp)
<i>Cre</i>	F-ACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCT R-ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT	370
<i>Ck19CreERT</i>	F-GCAGAATCGCCAGGAATTGACC R-GTTCTTGCGAACCTCATCACTC	300
<i>Kras</i> ^{G12D}	F-CCTTTACAAGCGCACGCAGACTGTAGA R-AGCTAGCCACCATGGCTTGAGTAAGTCTGCG	550
<i>Pten</i>	F-GTGAAAGTGCCCCAACATAAGG Reverse-CTCCCACCAATGAACAAACAGTC	550 (Flox) 480 (WT)
<i>mTmG</i>	F-CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT R-TCAATGGGCGGGGGTTCGTT (Flox) R-CGAGGCGGATCACAAGCAATA (WT)	250 (Flox) 330 (WT)

<i>Rbpj</i>	F-GTTCTTAACCTGTTGGTCGGAACC	610 (Flox) 533 (WT)
	R-GCAATCCATCTTGTTCATGGCC (Flox)	
	R-GCATTGTCTGAGTTCTTGACTG (WT)	
<i>Hes1</i>	F-AGCCAGTGTCAACACGACACCGGACAAAC	272 (Flox)
	R-TGCCCTTCGCCTCTTCTCCATGATA	224 (WT)

表 1 遺伝子型解析用プライマーセット

F; Forward、R; Reverse を表わす。*mTmG*; membrane-targeted tdTomato and membrane-targeted EGFP

3. タモキシフェンの投与

腫瘍の病理学的診断の為、*Alb-Cre^{ERT2/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox}* マウスは、Corn oil (Sigma)に溶かしたタモキシフェン (10 mg/mL) 1 mg と 5 mg を生後 10 日と 56 日でそれぞれ腹腔内注射により投与し、2~3 ヶ月後に安楽死させた。

CK19Cre^{ERT/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox} マウスは、5 mg を生後 56 日で投与し、1 ヶ月後に安楽死させた。腫瘍の由来細胞同定の為、*Alb-Cre^{ERT2/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox}* と *Alb-Cre^{ERT2/+};R26R^{mTmG/+}* マウスは、タモキシフェン 1 mg と 5 mg を生後 10 日と 56 日でそれぞれ投与し、1 週間後に安楽死させた。

4. 病理学的検討

摘出したマウスの組織は、3% ホルムアルデヒド (和光純薬工業)に一晩浸したのち、パラフィンブロックを作製した。滑走式マイクロトームで 5 μ m ずつに切り出し、コート付きスライドガラス (松浪硝子工業)に付着させ解析に使用した。

病理組織像はヘマトキシリン・エオジン (HE)染色を行って各組織を観察することにより検討し、病理専門医と協議して診断した。

5. 共焦点顕微鏡による観察

摘出したマウスの各臓器における正常組織と癌組織を、3% ホルムアルデヒドに一晩浸し固定後、10、20、30% スクロース (和光純薬工業)/PBS の順に置換した後、O.T.C. compound (サクラファインテックジャパン)に入れ、ドライアイスで氷冷し、ブロックを作製した。クリオスタットで3 μm ずつに切り出し、コート付きスライドガラスに付着させて得られた凍結切片を、共焦点レーザー顕微鏡 Nikon A1 (Nikon)を用いて観察し、評価した。

6. 免疫染色

各検体のパラフィンブロックを5 μm 幅に薄切し、100% エタノール、90% エタノール、70% エタノールに3 min ずつ浸漬し、脱パラフィン操作を行った。水道水の流水で5 min 水洗した後、抗原賦活化のためクエン酸バッファー (pH 6.0) (LSI メディエンス)の中に浸し、オートクレーブで108°C、10 min 加熱した。室温に冷めるまで放置した後、水道水とイオン交換水の流水で5 min ずつ水洗した。次に、内在性ペルオキシダーゼ不活化のため、0.3% 過酸化水素水/メタノー

ルに 15 min 浸漬し、水道水の流水で 5 min 水洗した。リン酸緩衝液 (PBS)で 5 min、3 回洗浄したのち、各 1 次抗体に対応する 1.5% ウサギまたはヤギ血清含有 PBS を添加し、室温 30 min ブロッキングを行った。その後一次抗体は 1.5% 血清含有 PBS または SignalStain[®]Antibody Diluent (Cell signaling #8112)で希釈し、4℃で一晩反応させた。一次抗体の宿主がウサギの場合は二次抗体として SignalStain[®] Boost IHC Detection Reagent (Cell signaling #8114)を添加し 30 min 反応させた。一次抗体の宿主がラットの場合、VECTASTAIN ABC キット (Vector Laboratories)中の 0.5% ビオチン標識二次抗体+1.5% ウサギ血清/PBS で 30 min 反応させた後、PBS で 5 min、3 回洗浄し、さらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories)に 30 min 反応させた。一次抗体の宿主がマウスの場合は、M.O.M. Immunodetection Kit (Vector Laboratories)を用い、M.O.M. マウス Ig ブロッキング試薬で 1h、M.O.M.希釈溶液で 5 min の順に反応させてブロッキングし、PBS で 5 min、3 回洗浄した後、M.O.M.希釈溶液で希釈した一次抗体と室温で 30 min 反応させた。PBS で 5 min、3 回洗浄したのち、M.O.M.標識抗マウス IgG 抗体を 10 min 反応させて、再度 PBS で 5 min、3 回洗浄した。さらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories)に 5 min 反応させた。二次抗体反応後は PBS で 5min、3 回洗浄した後、ImmPACT DAB Substrate (Vector Laboratories)で発色した。対比染色は

マイヤー・ヘマトキシリン染色液 (武藤化学株式会社) で 1 min 行い、水道水とイオン交換水の流水で 5 min ずつ水洗した。脱水は、70% エタノール、90% エタノール、100% エタノールに 3 min ずつ、透徹はキシレンに 5 min で施行し、最後にマリノールで封入した。使用した抗体は表 2 に示した。

抗体名	希釈率	宿主	会社名	製品番号
phospho-Erk	1:400	rabbit	Cell Signaling	4370
phospho-Akt ^{ser473}	1:100	rabbit	Cell Signaling	4060
Ki67	1:50	rat	DAKO	M7249
Ck19	1:100	rat	DSHB	TROMA-III
pan-Ck	1:100	mouse	Thermo	MS-343-P0
α -SMA	1:100	mouse	Sigma	A2547
Hnf4 α	1:100	rabbit	Santa cruz	sc-8987
Pten	1:100	rabbit	Cell Signaling	9188
CyclinD ₁	1:100	rabbit	Thermo	PM-9104-S0
Rbpj	1:100	rabbit	Cell Signaling	5313
Hes1	1:100	rabbit	Cell Signaling	11988
Sox9	1:100	rabbit	Santa cruz	sc-20095

表 2 免疫染色で用いた抗体表

phospho-Erk、phospho-Akt^{ser473}、Hnf4 α 、Pten、CyclinE、CyclinD₁、Rbpj、Hes1、Sox9 については SignalStain[®] Antibody Diluent を用いて、Ki67、Ck19、pan-Ck、 α -SMA については 1.5% serum/PBS を用いて一次抗体を希釈した。

7. マウス肝内胆管癌由来初代培養細胞株の樹立

Alb-Cre/+;LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flx/flx} (AKPP) マウスを 8 週齢で安楽死させ肝臓を取り出し、エタノールと PBS で洗浄した後、FBS (-) の RPMI1640 (Gibco) 2 mL を入れたディッシュ上に移し滅菌済みのハサミで細かく切り刻み 50 mL のチュー

ブに入れた。1200 rpm, 3 min で遠心後上清を吸い、2 mg/mL collagenase (Roche)/RPMI1640 10 mL に懸濁させて 37°C、30 min インキュベートした。さらに 1200 rpm、3 min で遠心したのち上清を吸い、10% FBS/RPMI1640 10 mL でピペッティングをし、さらに 1200 rpm、3 min で遠心した。上清を吸った後、20% FBS/RPMI1640 10 mL に antibiotic/antimycotic solution 100 μ L を加え、10 cm ディッシュに播種した。樹立されたマウス細胞株はコラーゲンコートしたディッシュを使用し、10% または 20% FBS 及び antibiotic/antimycotic solution (Sigma) 100 μ L を添加した RPMI1640 を用い、37°C、5% CO₂ で培養した。

8. siRNA によるノックダウン

前日、6 cm ディッシュに細胞を撒いておき、翌日 siRNA の最終濃度が 10 nM になるように FuGENE6 (Promega) と Opti-MEM (Gibco) を加えたのち、細胞にかけて 48 h 培養した後に回収し、実験に使用した。使用した siRNA は表 3 に示す。

siRNA 名	開始位置 (bp)	合成 dsRNA (5' to 3')
siRbpj#1	731	GAACGAAGGUGGCACUGUUTT
siRbpj#2	1282	GUAGCAAUGCUUGAACUATT

表 3 使用した siRNA

9. タンパク質抽出とウエスタンブロットティング

細胞を PBS で洗浄後、セルスクレーパーで剥がし、1.5 mL チューブに移した。4°C、15000 rpm、10 min で遠心し上清を取り除いた後、ペレットに RIPA バッファーを 100 μ L 加えてよくピペッティングし、細胞を融解した。更にソニケーターにより細胞破碎を行った。氷上にて 10 min 静置後、4°C、15000 rpm、10 min で遠心し上清を回収した。タンパク質の定量は、BCA 法により行い、RIPA バッファーを加えて各試料のタンパク濃度を一定にした。5 \times SDS サンプルバッファーを加えた試料を 100°C、5 min で加熱処理し、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) によりタンパク質を分離した後、PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜 (Bio-rad) に転写した。メンブレンは、5% スキムミルク (和光純薬工業)/TBS-T (0.05% Tween20/Tris Buffered Saline) で 1 h ブロッキングを行った後、適切な濃度に希釈した一次抗体に一晩浸しシェーカーで振盪させた。TBS-T で 10 min、3 回洗浄した後、5% スキムミルク/TBS-T で 3000 倍希釈した HRP 標識二次抗体 (GE ヘルスケア・ジャパン) を 1 h 反応させた。反応後の PVDF 膜を TBS-T で 10 min、3 回洗浄し、蛍光発色液 (ECL Western Blotting Detection Reagents (GE ヘルスケア・ジャパン)、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)、または ImmunoStar LD (和光純薬工業)) で発色したのち、Amersham Imager 600 (GE ヘルスケア・ジャパン) でシグナルを検出し

た。使用した一次抗体を表 4 に示す。

抗体名	宿主	会社名	製品番号
β -Actin	mouse	Sigma	A5441
total-Erk	rabbit	Cell Signaling	4695
phospho-Erk	rabbit	Cell Signaling	4370
total-Akt	rabbit	Cell Signaling	4691
phospho-Akt ^{ser473}	rabbit	Cell Signaling	4060
Ck19	rat	DSHB	TROMA-III
Pten	rabbit	Cell Signaling	9188
Rbpj	rabbit	Cell Signaling	5313
Hes1	rabbit	Cell Signaling	11988
Sox9	rabbit	Santa cruz	sc-20095

表 4 ウェスタンブロットで用いた抗体

10. レポーターアッセイ

12 ウェルプレートに細胞を播種し、24 h 後に 0.8 μ g のレポータープラスミドと 50 ng の pRL *Renilla* Luciferase Control reporter Vector (pRL-null vector; Promega) を、FuGENE6 を用いてトランスフェクションし、48 h 後にルシフェラーゼ活性の測定を行った。阻害剤を用いた実験においては、トランスフェクション 24 h 後に阻害剤入りの培養液と交換しさらに 48 h 培養した後に測定を行った。siRNA を用いた実験では、0.8 μ g のレポータープラスミドと 50 ng の pRL-null vector、最終濃度が 10 nM に調整した siRNA を 100 μ L の opti-MEM に混合して 20 min 静置した後、Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher

Scientific) を用いてトランスフェクションした。6 h 後に培養液を交換しさらに 42 h 培養した後に測定した。ルシフェラーゼ活性は、ピッカジーン デュアル シーパンジー発光キット (東洋ビーネット) を用い、ルミノメーターで測定した。得られた firefly ルシフェラーゼ活性値を Renilla ルシフェラーゼ活性値にて補正し、相対強度で表示した。各実験は少なくとも 3 回の独立した検討によって、再現性を確認した。使用したプライマーは表 5 に示す。

遺伝子名	位置 (bp)	プライマー (5' to 3')	mm9
<i>Hes1</i>	-2.5 K/+46	Addgene から購入した	chr16:30062976-30065475
<i>Hes1</i>	-4.6 K/-2.5K	F-cgggtaccGAGTCCTCGGGCAAATACC R-ATTCCCCTGGGAGTGCCTTT	chr16:30060877-30062976
<i>Hes1</i>	intron1	F-ccgctcgagACCTGCGTCTAGAAATTAAGTGGGT R-cccaagcttAAGGGGGAGAAAAGAGGTCCT	chr16:30065795-30065911
<i>Hes1</i>	intron2	F-ccgctcgagTTACGAATGGAATGGCATTTCACAG R-cccaagcttAAGGGGGAGAAAAGAGGTCCT	chr16:30066044-30066228
<i>Hes1</i>	intron3	F-ccgctcgagTTTCTTCCAGACTTCCGCCC R-cccaagcttAGATGGGTCACCGAAAAGC	chr16:30066392-30066937
<i>Hes1</i>	3'-UTR	F-tgctctagaGAGCCTCAGGCCACTGCTAC R-tgctctagaCATAAAAGCCTTCACTCTTTTATTA	chr16:30067515-30067884

表 5 レポーターアッセイで用いたベクターの種類とプライマーの配列
5'flanking 領域のベクターの種類は、*Hes1* (pGL2-Basic Vector、pGL4.14[luc2/Hygro] Vector) を、イントロン領域のベクターは共に pGL4.23[luc2/minP] Vector を、3'-UTR 領域のベクターは pmirGLO vector を使用した。(すべてのベクターは Addgene から購入した)

F; Forward、R; Reverse

11. DNA 抽出

細胞を PBS で洗浄後、セルスクレーパーで剥がし、1.5 mL チューブに移した。4°C、15000 rpm、5 min で遠心し上清を取り除いた。細胞のペレットまたは組織を 15 mL チューブに入れ、protein K buffer 5 mL、10% SDS 200 μ L と proteinase K 200 μ L を加えてピペティング後、37°Cで一晩振盪した。さらに proteinase K 200 μ L を加え 37°C、4 h 振盪した後に、フェノール 4 mL を加えて、室温で一晩振盪した。翌日、10 min、3000 rpm で遠心したのち上清を新しい 15 mL チューブに入れ、フェノール・クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を行った。沈殿した DNA は TE 200 μ L に溶解した。

12. メチル化特異的 PCR

DNA メチル化阻害剤 5-Azacytidine で処理したマウス肝内胆管癌初代培養細胞 AKPP6 細胞、及び未処理の AKPP6 細胞、野生型マウスから樹立した胎児線維芽細胞 (MEF)、AKPP マウスの肝腫瘍組織 (T)、同マウスの正常肝組織 (N)、さらにコントロールとして野生型マウスの尾の先端から DNA を抽出した。DNA 4 μ g、10 \times buffer 2.5 μ L、*Eco*RI と *Bgl*III (TAKARA)を各 1 μ L と DW の混合し全量 25 μ L とし、37°Cで一晩インキュベートした後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い DNA 精製した。バイサルファイト処理は以下のプロトコール

で行った。各試料に 3 M 水酸化ナトリウム 4 mL を加え、42°C、30 min でインキュベートし DNA を一本鎖にした。10 mM ハイドロキノン (Sigma) 30 μ L と 3 M 亜硫酸水素ナトリウム (Sigma) (pH 5.0-6.0) 520 μ L を加え、55°C、遮光で 18 h インキュベートした。反応液を 100°C、3 min で加熱後、更に 55°C、30 min でインキュベートした。Wizard DNA Clean Up System (Promega) を使用し DNA を精製した後、3 M 水酸化ナトリウム 5.55 μ L と、10 M 酢酸アンモニウム (pH 7.0) 37 μ L を加えて 5 min 静置し、反応液を中和した。その後エタノール沈殿を行ってペレットを DW 25 μ L に溶解し、100 ng を PCR に使用した。PCR は、GoTaq® Green Master Mix (Promega) を用いて、95°C 2 min で変性した後、95°C 30 sec、60°C 30 sec、72°C 1 min のサイクルを 33 回行った。使用したプライマーは表 6 に示したとおりである。

遺伝子名	プライマー (5' to 3')
<i>p16</i> (U)	F-GTGATTGGGTGGGTATTGAATTTTGTG R-CACACATCATAACACAACCCTAAACCA
<i>p16</i> (M)	F-CGATTGGGCGGGTATTGAATTTTCGC R-CACGTCATAACACGACCCTAAACCG

表 6 *p16* のメチル化特異的 PCR に用いたプライマーの配列

U; Unmethylated, M; Methylated, F; Forward、R; Reverse

13. アンプリコンシーケンス

札幌医科大学の時野隆至博士より供与されたマウス用 Cancer Panel を用いて、アンプリコンシーケンスを行った。10 ng の DNA と、2×Ion AmpliSeq™ Primer Pool (時野隆至博士より供与)、5×Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (Thermo Fisher Scientific)、DW を計 20 μL となるように混合し、99°C 2 min、99°C 15 sec、60°C 4 min で PCR 反応を行った。プライマー配列を除去するため、FuPa Reagent (Thermo Fisher Scientific)を加えて 50°C 10 min、55°C 10 min、60°C 20 min で PCR 反応を行った。続いて Switch Solution (Thermo Fisher Scientific)、Diluted barcode adapter mix (Ion P1 Adapter、Ion Xpress™ Barcode; Thermo Fisher Scientific)、DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific)をさらに加え計 30 μL とし、22°C 30 min、72°C 10 min で PCR 反応を行った。PCR 産物は AM pure® XP Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて精製した。PCR 産物は Ion Library Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて Quantitative PCR (qPCR)反応により定量した。最終濃度 100 pM の試料を 5 μL 使用し、Ion OneTouch™ 2 System (Thermo Fisher Scientific)を用いてテンプレートを作製した。シーケンスには Ion PGM システム(Thermo Fisher Scientific)を用いて解析を行った。Panel に含まれる 41 遺伝子のリストを表 7 に示す。アライメントとバリエーションは Torrent Suite Software (Thermo Fisher Scientific)を使用して検出した。

遺伝子	mm10	遺伝子	mm10	遺伝子	mm10	遺伝子	mm10
<i>Kras</i>	chr6	<i>Fgfr2</i>	chr7	<i>Ddr2</i>	chr1	<i>Etv6</i>	chr6
<i>Egfr</i>	chr11	<i>Hras1</i>	chr7	<i>Ctnnb1</i>	chr9	<i>Runx1</i>	chr16
<i>Braf</i>	chr6	<i>Apc</i>	chr18	<i>Met</i>	chr6	<i>Jak2</i>	chr19
<i>Pik3ca</i>	chr3	<i>Nf1</i>	chr11	<i>Trp53</i>	chr11	<i>Cdkn2a</i>	chr4
<i>Akt1</i>	chr12	<i>Cdh1</i>	chr8	<i>Smad4</i>	chr18	<i>Cdkn2b</i>	chr4
<i>ErbB2</i>	chr11	<i>Bcl11a</i>	chr11	<i>Fbxw7</i>	chr3	<i>Ret</i>	chr6
<i>Pten</i>	chr19	<i>Bcl11b</i>	chr12	<i>Fgfr3</i>	chr5	<i>Ntrk2</i>	chr13
<i>Nras</i>	chr3	<i>Ikzf1</i>	chr11	<i>Notch1</i>	chr2	<i>Sfpi1</i>	chr2
<i>Stk11</i>	chr10	<i>Kit</i>	chr5	<i>ErbB4</i>	chr1	<i>Cbl</i>	chr9
<i>Map2k1</i>	chr9	<i>Flt3</i>	chr5	<i>Fgfr1</i>	chr8		
<i>Alk</i>	chr17	<i>Pdgfra</i>	chr5				

表 7 Amplicon sequencing で用いた Cancer Panel 内の遺伝子
 札幌医科大学医学部の時野隆至博士より供与いただいた 2×Ion AmpliSeq™
 Primer Pool は上記 41 遺伝子、961 amplicon が解析できるよう設計されている。

14. RNA 抽出と Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

RNeasy Mini kit (QIAGEN) を使用し、推奨プロトコールに従って Total RNA を抽出した。Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) または、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて、RNA 1 µg を逆転写反応させて cDNA を合成した。定量 PCR は KAPA SYBR Fast ABI Prism qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて行った。cDNA 1 µg、qPCR Master Mix 10 µL、各プライマー 0.5 µL、DW 7 µL を混合し、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して PCR を行った。内部コントロールには *Hprt1*、*Gapdh* を用

いた。使用したプライマーを表 8 に示す。

< mouse >	
遺伝子名	プライマー (5' to 3')
<i>Mek1</i>	F-TGCCAGGCTGAACTACAGTG R-CACAAGGCTCCCTCTCAGAC
<i>Mek2</i>	F-CCCTACATCGTGGGCTTCTA R-TGCATGATCTGGTGCTTCTC
<i>Rbpj</i>	F-GGGAGCATTTTACATCCATCTC R-GGATGTAGCCATCTCTAACTGTGA
<i>Hes1</i>	F-AAAGCCTATCATGGAGAAGAGGCG R-GGAATGCCGGGAGCTATCTTTCTT
<i>Sox9</i>	F-ACTCTGGGCAAGCTCTGGAG R-CGAAGGGTCTCTTCTCGCTCT
<i>p16</i>	F-CCGCTGCAGACAGACTGG R-CCATCATCATCACCTGAATCG
<i>Hprt1</i>	F-CCTCCTCAGACCGCTTTTT R-AACCTGGTTCATCATCGCTAA
<i>Gapdh</i>	F-TGTCCGTCGTGGATCTGAC R-CCTGCTTCACCACCTTCTTG

表 8 qPCR に用いたプライマーの配列

Mek1,2; Mitogen-activated protein kinase kinase 1,2、*Rbpj*; Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region、*Hes1*; Hes family bHLH transcription factor 1、*Sox9*; Sry-box 9、*Hprt1*; Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1、*Gapdh*; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

結果

1. 肝特異的 *Kras* 活性化と *Pten* 欠損マウス (*AKPP* マウス)に発生した肝腫瘍の

病理組織学的検討

肝特異的活性化型 *Kras* 変異発現 *Pten* ホモ欠損マウス *Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flx/flx}* (以下 *AKPP*) マウスは、生後 5 週から黄疸、腹部膨隆などの症状を呈し、生存日数中央値は 46 日であった。それに対して *Kras* 変異に加えて *Pten* をヘテロでノックアウトした *Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flx/+}* (*AKP*) マウスの生存日数中央値は 225 日であり、*Kras* 変異のみの *Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}* (*AK*) マウスは大部分が 400 日以上生存していた。(図 3)。

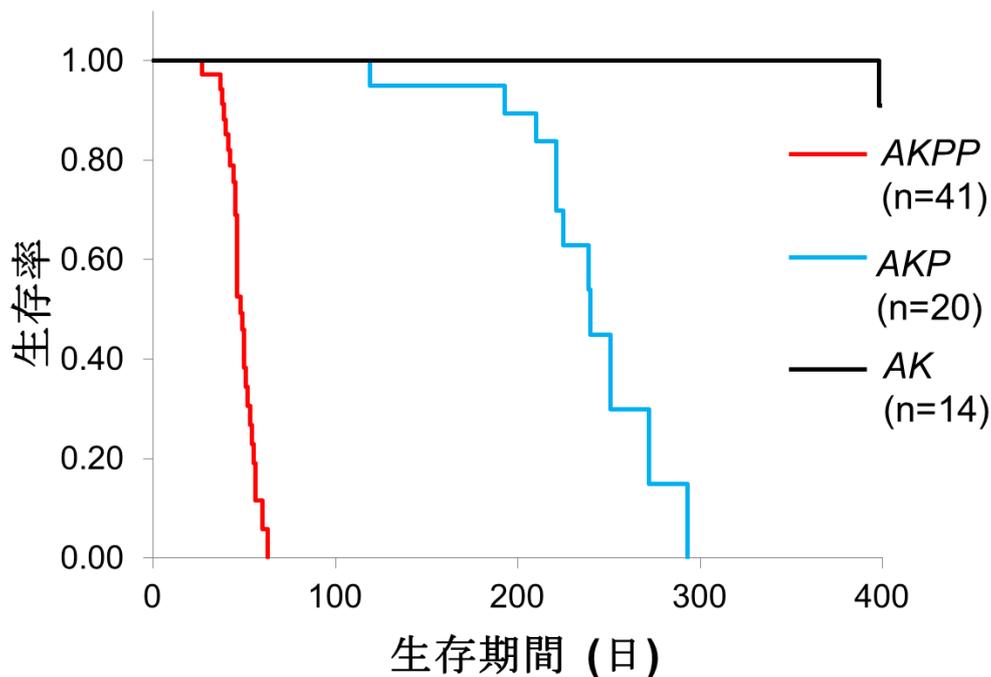


図 3 *AKPP* マウス、*AKP* マウス、*AK* マウスの生存曲線

次に *AKPP*、*AKP*、*AK* マウスの病理所見を検討した。生後 7-8 週齢のマウスを解剖したところ、血性腹水や黄疸などヒト肝内胆管癌でも高率に見られる所見を認め (図 4A)、肝臓には肝門部を中心とした硬いびまん性腫瘍病変を認めた (図 4B、C)。一方で *AKP* マウスは、生後約 7 ヶ月までは明らかな肉眼的所見は認められなかったが、その後複数の肝腫瘍 (図 4D)によって腹部が膨満した。*AK* マウスにおいては、生後約 12 ヶ月以下ではほとんどのマウスで明らかな肉眼的所見は見られなかった。

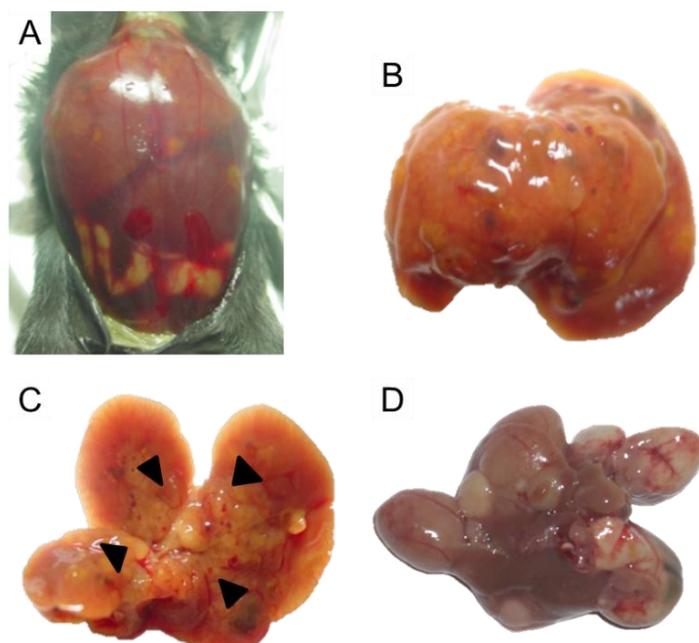


図 4 *AKPP* 及び *AKP* マウスの肉眼的所見
AKPP マウス(A、B、C)、*AKP* マウス(D)の肉眼的所見。黒い矢頭は肝門部の腫瘍性病変を示す (C)。

さらに *AKPP*、*AKP*、*AK* マウスの組織学的検討を行った。*AKPP* マウスの生後 3 週齢における肝臓は、肝内胆管を含めほぼ正常であった (図 5A)。しかし、

生後 4 週齢においては胆管の増生がみられ (図 5B)、生後 5 週齢においては肝門部を中心に胆管の拡張と乳頭状の変化を認められ (図 5C)、これらの変化は肝内胆管癌の前癌病変の可能性が疑われた (図 5B、C)。生後 7~8 週齢においては、線維性の間質の増生を伴う高度な異型を有する腫瘍性病変を認め、この病変はヒト肝内胆管癌に類似していた (図 5D、E)。大部分のマウスにおいて、腫瘍は高分化型胆管細胞癌の組織像を示したが、一部のマウスには篩状に変化したより分化度の低い病変も見られた (図 5F)。しかし、肝細胞癌様の腫瘍性病変、他臓器への転移や浸潤は全く見られなかった。一方で、生後約 8 ヶ月の *AKP* マウスの肝臓においては、肝内胆管癌様病変と肝細胞癌前癌様病変の両者が認められた (図 5G、H)。また、生後約 18 ヶ月の *AK* マウスの肝臓においては、一部のマウスにおいて肝細胞癌とその前癌病変と考えられる腫瘍性病変を認めたが、肝内胆管癌様病変はまったくなかった (図 5I)。

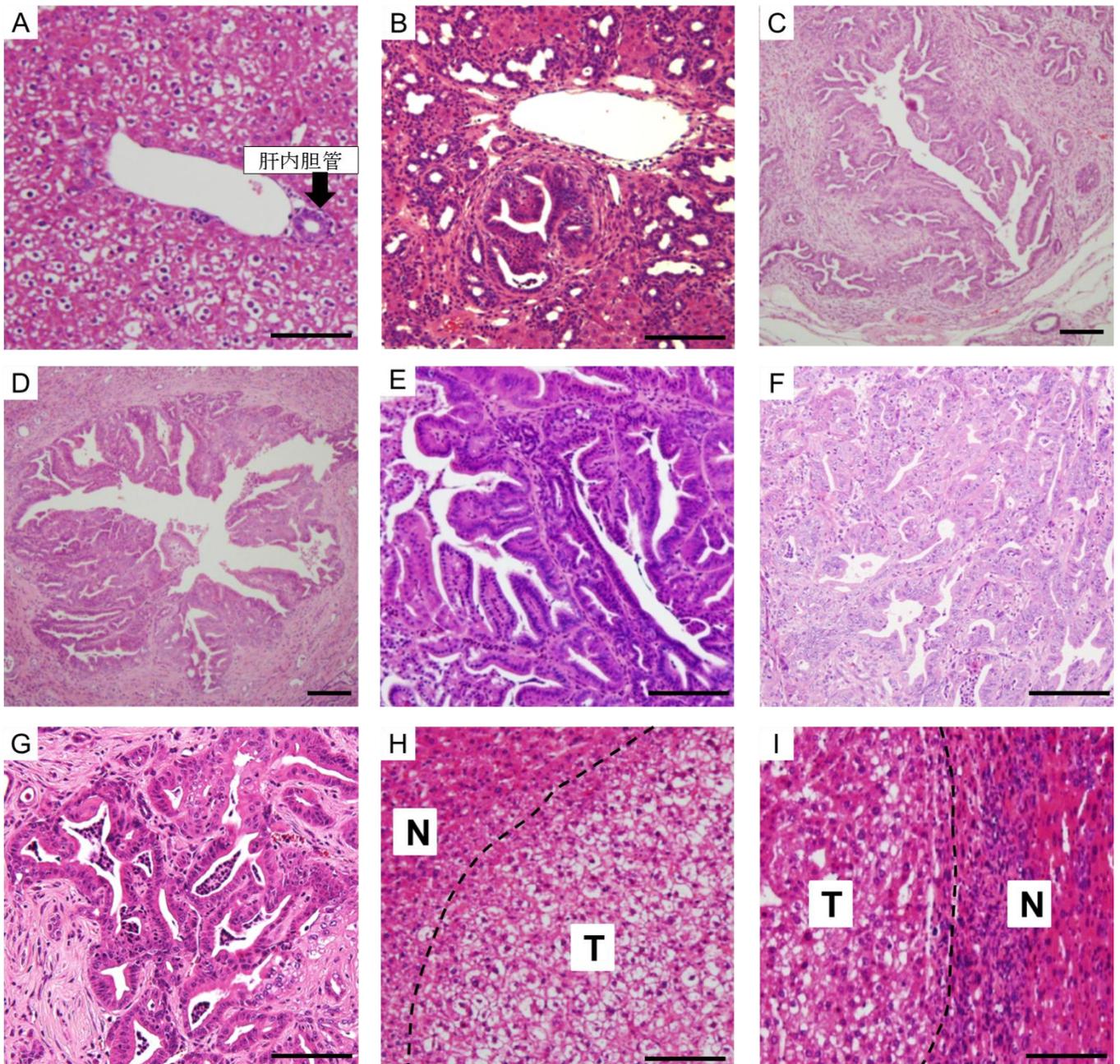


図5 遺伝子改変マウスの組織学的所見 (HE 染色)

3 週齢における *AKPP* マウスの肝臓 (A)、5 週齢における *AKPP* マウスの肝臓 (B、C)、8 週齢における *AKPP* マウスの肝臓 (D、E、F)、生後約 8 ヶ月の *AKP* マウスの肝臓病変 (E、F)、*AK* マウスの肝臓病変 (G)。N: 非腫瘍部、T: 腫瘍部。バー: 100 μ m。5 週齢における *AKPP* マウス: 6 匹、8 週齢における *AKPP* マウス: 20 匹。

2. AKPP マウスに発生した肝腫瘍の解析

AKPP マウスの肝腫瘍が肝内胆管癌としての性質を有しているかどうか調べるため、胆管上皮細胞のマーカーとして知られている pan-cytokeratin (pan-Ck) と Ck19、肝細胞のマーカーとして知られている Hnf4 α の免疫染色を行った。さらに、一部の胆管癌で発現し、肝細胞癌との鑑別に有用とされるムチン⁴³が AKPP マウスの肝腫瘍でも産生されているかを評価するためにアルシアンブルー染色を行った。AKPP マウスの肝腫瘍部は、pan-Ck と Ck19 の抗体で強く染色された (図 6A、B)。一方で、Hnf4 α の抗体を用いると非腫瘍部の肝細胞は陽性であったが、肝腫瘍部は陰性であった (図 6C)。また、アルシアンブルー染色から、一部の腫瘍細胞でムチンの産生を認めた (図 6D)。これらの結果から、AKPP マウスの肝腫瘍は肝内胆管癌としての性質を有していることが示された。

腫瘍周囲の線維化は、肝内胆管癌を肝細胞癌と区別する組織学的特徴の一つと考えられている⁴⁴。そこで、AKPP マウスにおける肝腫瘍周囲の線維化を、マッソントリクローム染色と α -smooth muscle actin (α -SMA)の免疫染色によって検討した。その結果、腫瘍部周辺の密集した線維性間質部位が青く染まり、膠原繊維の蓄積が起こっていることが示された (図 7A)。また、 α -SMA の免疫染色によって腫瘍部周辺の間質の一部が強く染まっており (図 7B)、肝星細胞が活性化され筋線維芽細胞が生じていると考えられた。これらの結果より、AKPP マ

ウスの肝腫瘍は周囲に高度な線維化を伴い、ヒト肝内胆管癌に類似した性質を有することが示された。

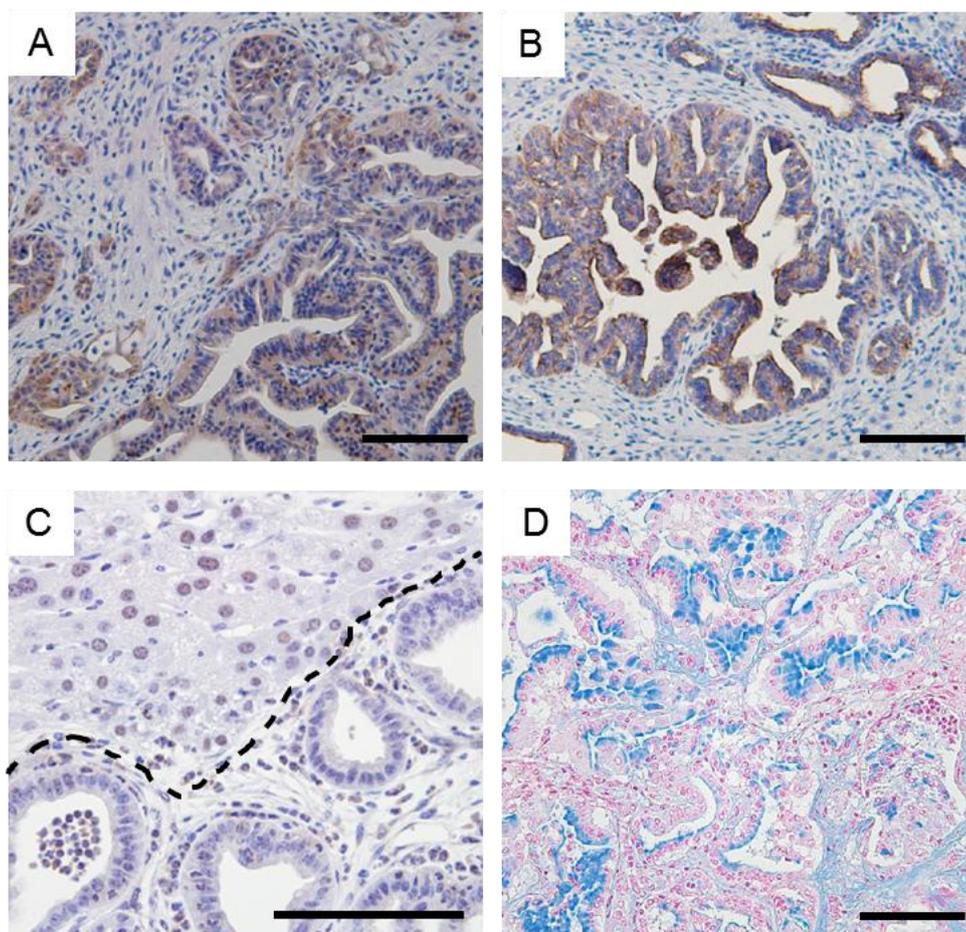


図 6 AKPP マウスの肝腫瘍における胆管上皮マーカー、肝細胞マーカー、ムチン産生の検討

8 週齢における AKPP マウスの肝臓 (A-D)。胆管上皮マーカー pan-Ck (A)、Ck19 (B)、肝細胞マーカー Hnf4 α (C) の免疫染色。アルシアンブルー染色 (D)。バー：100 μ m。

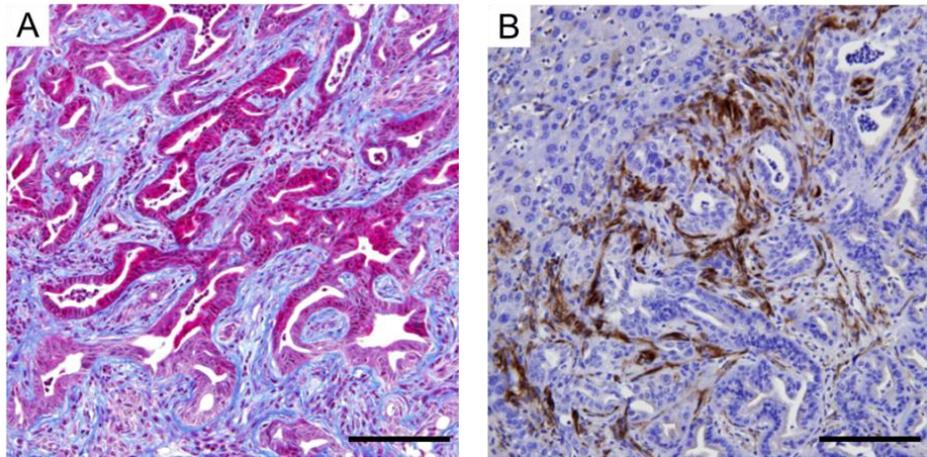


図7 *AKPP* マウスの肝臓における肝臓内線維化
8 週齢における *AKPP* マウスの肝臓 (A、B)。マッソントリクローム染色 (A)と
 α -SMA の免疫染色 (B)。バー : 100 μ m。

3. AKPP マウスの肝内胆管癌における細胞増殖の検討

AKPP マウスの肝内胆管癌細胞が、癌細胞の特徴である高い増殖能を有しているかを検討するために、細胞増殖のマーカーとして知られている ki67 と CyclinD₁ の免疫染色を行った。その結果、肝内胆管癌細胞において陽性細胞が増加しており (図 8A-D)、AKPP マウスの肝内胆管癌細胞では細胞増殖能が亢進していることが明らかとなった。

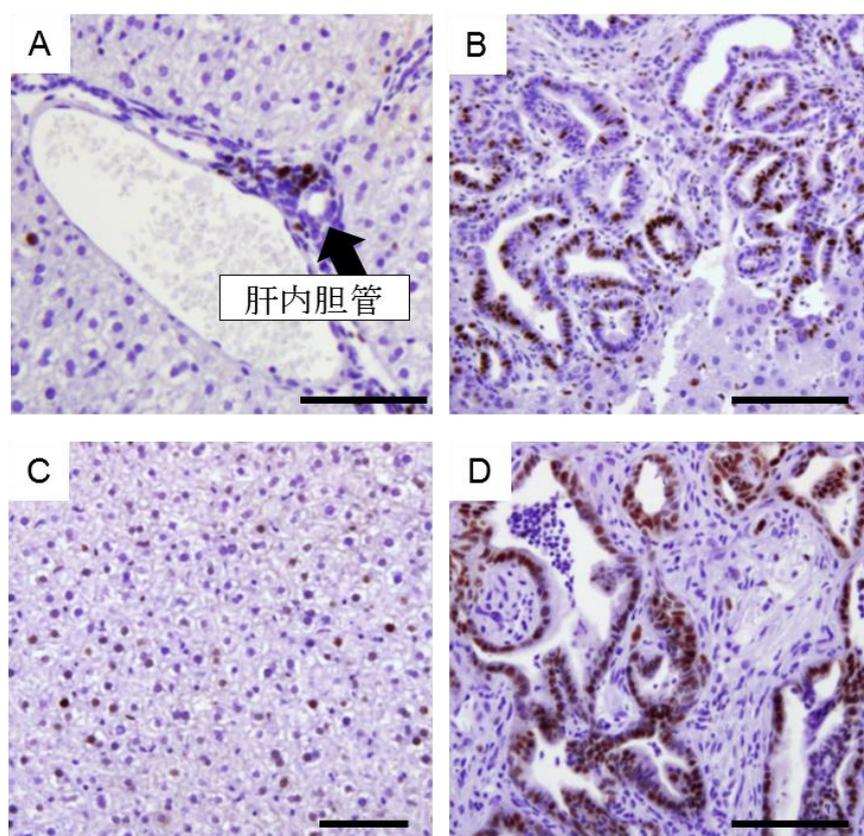


図 8 AKPP マウスの肝内胆管癌細胞における ki67、CyclinD₁ の免疫染色
8 週齢における WT マウスの肝臓 (A、C)、8 週齢における AKPP マウスの肝臓 (B、D)。ki67 免疫染色 (A、B)、CyclinD₁ 免疫染色 (C、D)。バー : 100 μ m。

4. AKPP マウス肝腫瘍における Mapk と Pi3k-mTorc1 シグナル伝達経路の検討

AKPP マウスは、肝臓において活性化型 *Kras* 変異と *Pten* 欠損を有しているため、肝内胆管癌細胞で Mapk と Pi3k 経路の活性化が予想される。そこで、Mapk 経路の活性化を phospho-Erk (p-Erk)、また、Pi3k 経路の活性化を phospho-Akt (p-Akt)と、さらに下流の mammalian target of rapamycin complex 1 (mTorc1)活性化を、phospho-S6 (p-S6)の免疫染色で検討した。その結果、これらのタンパク質は腫瘍細胞において陽性であり、活性化型 *Kras* 変異による Mapk 経路の活性化と、*Pten* 欠損による Pi3k-mTorc1 経路の活性化が確認された (図 9A-C)。AKP マウスでは、上記で述べたように肝内胆管癌様病変と肝細胞癌前癌様病変の両者が併存しているが、肝内胆管癌細胞において p-Erk と p-Akt 両者が陽性であり、Mapk と Pi3k-mTORC1 経路の活性化が確認された (図 9D、E)。さらに、AKP マウスの肝内胆管癌細胞における *Pten* の発現を免疫染色で検討したところ、腫瘍細胞内で発現が消失していることが明らかとなった (図 9F、G)。この結果から、野生型 *Pten* アレルがヘテロ接合性の消失、機能欠損変異、あるいはプロモーターの高メチル化などにより不活化されていることが示唆される。一方で、AKP マウスの肝細胞癌前癌様病変においては、p-Erk は陽性であったが p-Akt は陰性であり、Mapk は活性化していたが Pi3k-mTorc1 経路の活性化は認められなかった (図 9H、I)。これらの結果から、活性化型 *Kras* 変異による Mapk 経路の活性化レベルと *Pten*

欠損による Pi3k 経路の活性化レベルのバランスが、肝内に発生する腫瘍の種類
の決定に大きく寄与している可能性が示唆された。活性化型 *Kras* 変異と *Pten* の
ホモ欠損による *Mapk* と *Pi3k* 経路の共活性化が、肝内胆管癌の発生を誘導する
と考えられた。

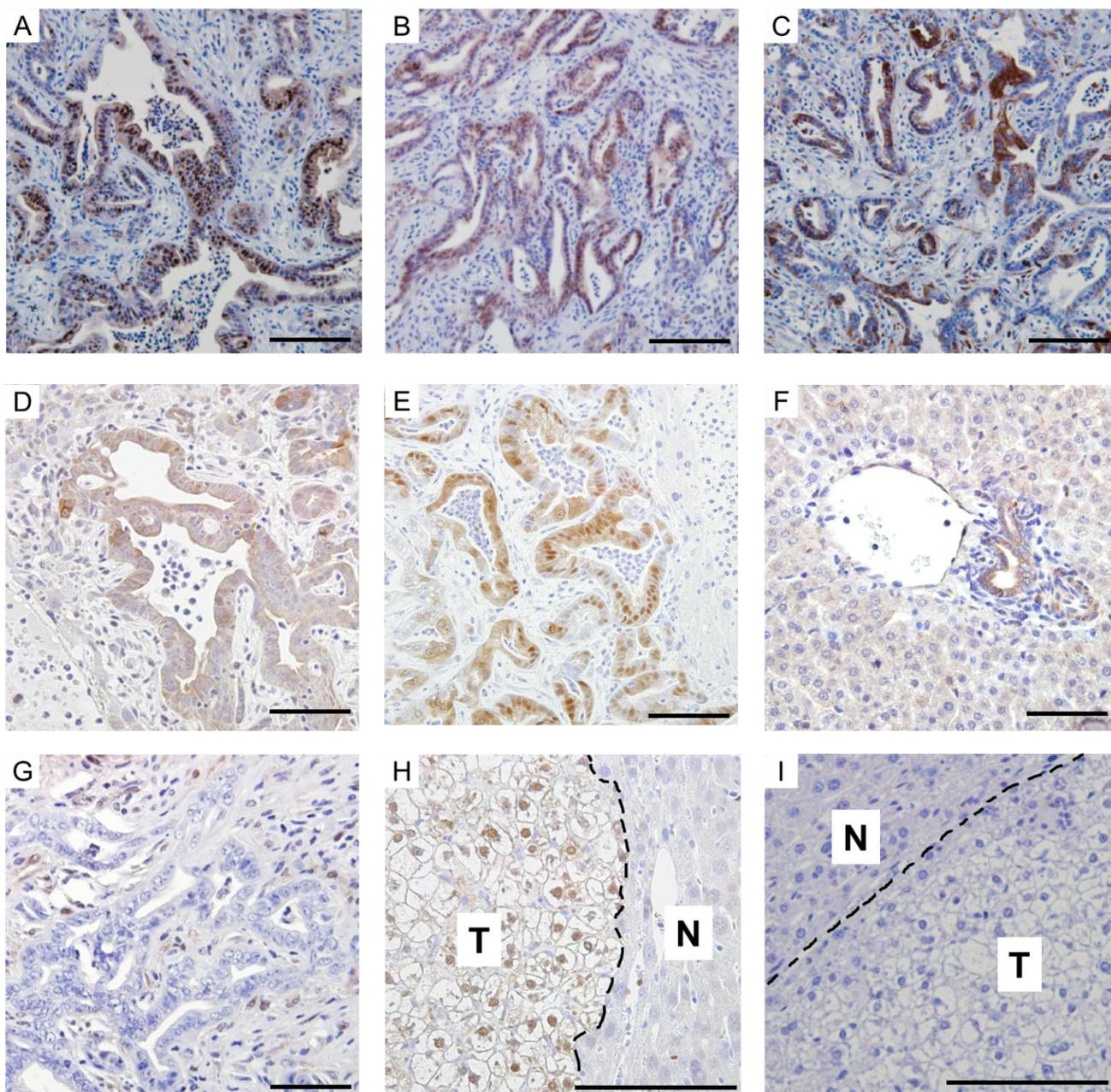


図9 肝腫瘍における *Mapk* と *Pi3k* 経路の活性化の検討

8 週齢における *AKPP* マウスの肝臓 (A-C)、7 ヶ月における *AKP* マウスの肝臓 (D、E、G-I)、7 ヶ月における WT マウスの肝臓 (F)。p-Erk 免疫染色 (A、D、H)、p-Akt 免疫染色 (B、E、I)、p-S6 免疫染色 (C)、Pten 免疫染色 (F、G)。バー : 100 μm 。

5. AKPP マウスの肝内胆管癌における遺伝子変異の検討

AKPP マウスの肝内胆管癌において、人工的に導入した *Kras* 変異及び *Pten* 欠損以外の発癌に関与する遺伝子変異を探索するため、表 7 に記したがん関連の 41 遺伝子についてアンプリコンシーケンスによる変異検索を行った。AKPP マウスの肝内胆管癌から樹立した初代培養細胞 (n=4) より抽出した DNA を試料として解析を行った。エクソンについてはミスセンス変異、シノニマス変異、ナンセンス変異、挿入変異、欠失変異を、イントロンについてはスプライス部位と非スプライス部位についての検出を行った。その結果、ミスセンス変異が 6、シノニマス変異が 29、非スプライス部位が 47 の合計 82 の変異が検出され (表 9A)、遺伝子変異で導入した *Kras*^{G12D} 変異以外の病的変異は認められなかった (表 9B、図 10A)。また、*Pten* のエクソン 4、5 の欠損も認められた (図 10B、C)。

部位	変異の種類	病的変異		非病的変異	合計
		ホットスポット	非ホットスポット		
エクソン	ミスセンス変異	4	0	2	6
	シノニマス変異	0	0	29	29
	ナンセンス変異	0	0	0	0
	挿入変異	0	0	0	0
	欠失変異	0	0	0	0
イントロン	非スプライス部位	0	0	47	47
	スプライス部位	0	0	0	0
合計		4	0	78	82

表 9A 変異の種類と数

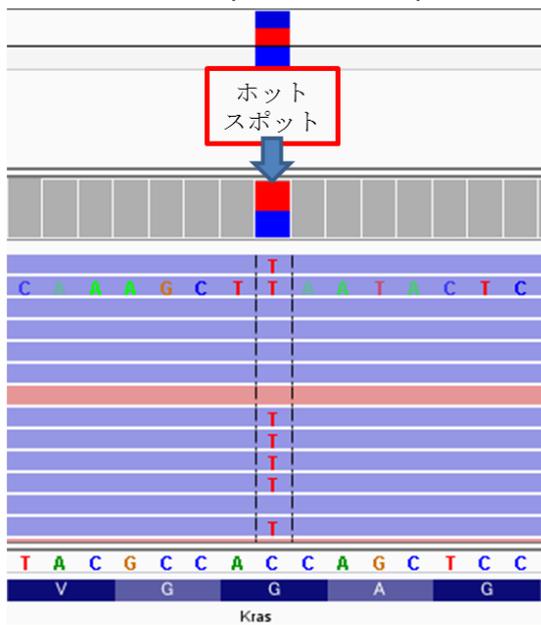
AKPP マウスの肝内胆管癌から樹立した初代培養細胞の、エクソン、イントロン

各部位における検出された変異。

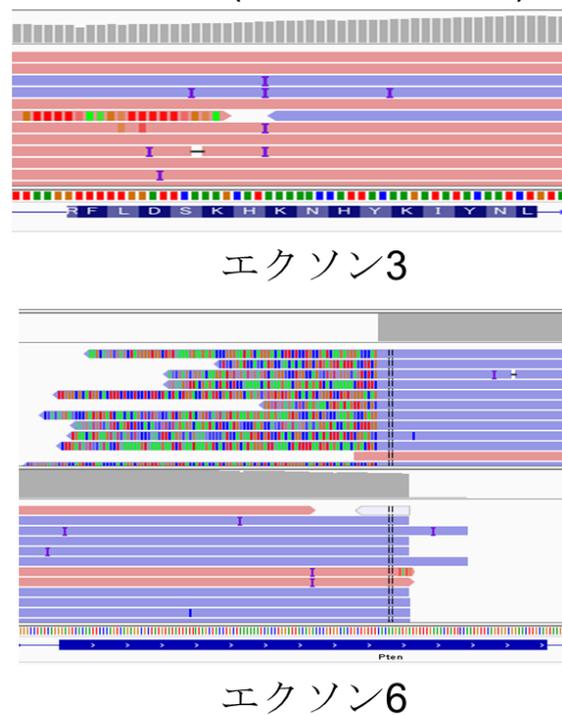
遺伝子名	部位	遺伝子座	染色体毎の塩基配列部位	変異頻度 (%)	コーディング領域内の塩基置換	アミノ酸置換	変異の病的意義	検出された試料数 (N=4)
<i>Kras</i>	Exon2	6qG3	145246771	51	c.34C>T	G12D	病的変異	4
<i>Jak2</i>	Exon13	19qC1	29291248	100	c.1723A>G	K575E	非病的変異	4
<i>Map2k1</i>	Exon1	9qC	64253276	5.1	c.17G>A	P6L	非病的変異	1

表 9B ミスセンス変異のあった遺伝子とコーディング領域

A *Kras* (c.34C>T)



B *Pten* (エクソン3、6)



C *Pten* (エクソン4、5)

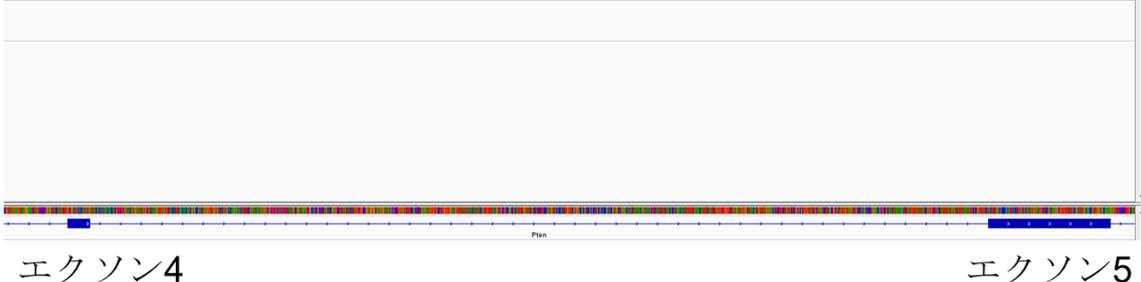


図 10 *Kras*^{G12D} 変異と *Pten* 欠損の検出

検出された AKPP マウスにおける *Kras*^{G12D} 変異 (A)、*Pten* のエクソン 4、5 特異的欠損 (B、C)。

6. *p16* 発現とプロモーター領域メチル化の検討

p16 は代表的な癌抑制遺伝子であり、ヒト肝内胆管癌において、*p16* プロモーター領域の高メチル化による *p16* の発現低下が報告されている^{23,45,46}。そこで、*AKPP* マウスに発生した肝内胆管腫瘍における *p16* 発現とそのプロモーター領域のメチル化を検討した。マウス肝内胆管癌初代培養細胞である *AKPP6* 細胞と野生型マウス由来の胎児線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast: MEF) において、*p16* の発現を RT-qPCR によって比較したところ、*AKPP6* 細胞の *p16* の発現は著しく低値であった (図 11A)。また、メチル化特異的 PCR により、*AKPP6* 細胞における *p16* プロモーター領域のメチル化が認められた。このメチル化の一部は、脱メチル化剤 5-Azacytidine により解除された (図 11C 左)。さらに、*AKPP* マウスの腫瘍組織と非腫瘍部組織における *p16* の発現を RT-qPCR で比較したところ、腫瘍部において発現低下を認めた (図 11B)。加えて *AKPP* マウスの腫瘍部と正常部、さらにコントロールとして野生型マウスの尾の先端から DNA を抽出し、メチル化特異的 PCR を行ったところ、腫瘍部由来の DNA にのみ *p16* プロモーター領域のメチル化を認めた (図 11C 右)。これらの結果から、*AKPP* マウスに発生した肝内胆管腫瘍部においても、ヒト肝内胆管癌と同様に *p16* の発現低下が認められ、*p16* プロモーター領域のメチル化が部分的に関与していることが示唆された。

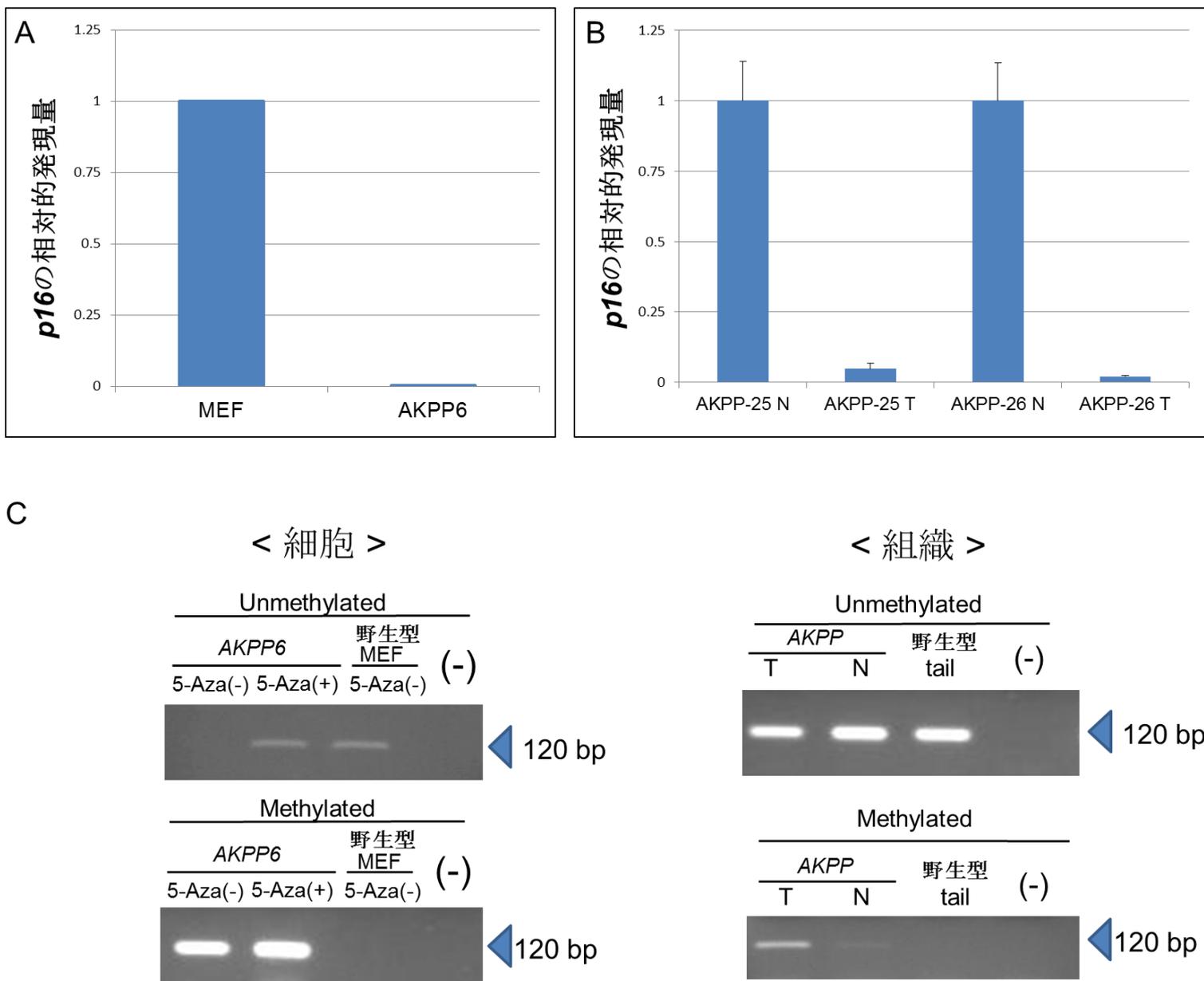


図 11 AKPP マウスの肝内胆管腫瘍における *p16* の発現とプロモーターのメチル化

(A) AKPP マウスの肝内胆管腫瘍から樹立した AKPP6 細胞と野生型マウスの MEF における *p16* の発現。MEF における *p16* の発現を 1 とした。(B) AKPP マウスの腫瘍部 (AKPP-25T、AKPP-26T) と非腫瘍部 (AKPP-25N、AKPP-26N) における *p16* の発現。AKPP-25N、AKPP-26N における *p16* の発現をそれぞれ 1 とした。(C) AKPP6 細胞および MEF における *p16* プロモーターのメチル化 (左)、およびマウス腫瘍組織 (T)、非腫瘍組織 (N)、尾組織 (tail) の *p16* プロモーターのメチル化 (右)。5-Aza (+): 脱メチル化剤 5-Aza を処理した AKPP6 細胞。

7. 肝内胆管癌の起源細胞の検討

肝内胆管癌の起源細胞は、胆管上皮細胞・肝細胞・肝幹細胞などが候補として考えられており、未だに議論が続いている^{2,35,36,38-42}。そこで、肝特異的活性化型 *Kras* 変異と *Pten* 欠損マウスにおける肝内胆管癌の起源細胞を検討するため、細胞系譜特異的遺伝子改変マウスを作製して実験を行った。まず、肝細胞が起源細胞になりえるかどうかを解明するため、タモキシフェン投与により *Alb* プロモーター制御下に *Cre* を発現する *Alb-Cre^{ERT2/+}* マウスに、*LSL-Kras^{G12D/+}* マウスと *Pten^{flox/flox}* マウスを交配させ、*Alb-Cre^{ERT2/+} ; LSL-Kras^{G12D/+} ; Pten^{flox/flox}* (*AERKPP*) マウスを作製した。このマウスの生後 8 週 (Exp1) または生後 10 日 (Exp2) に、タモキシフェンを投与して *Kras* 活性化と *Pten* 欠損を誘導し、発生した腫瘍を解析した (図 12A)。その結果、生後 8 週にタモキシフェンを投与した場合、投与後 3 ヶ月で肝臓内に多数の腫瘍が形成された (図 12B)。一方、生後 10 日にタモキシフェンを投与すると、投与後約 2 ヶ月で死亡し、肝門部を中心とした硬いびまん性腫瘍病変を認めた (図 12C)。生後 8 週にタモキシフェンを投与したマウスの腫瘍は、病理組織学的には肝細胞癌またはその前癌病変で (図 12D)、肝内胆管癌は全く認められなかった。一方、生後 10 日にタモキシフェンを投与したマウスの腫瘍は、肝内胆管癌で、肝細胞癌様の病変は全く認められなかった。この結果は *AKPP* マウスの肝腫瘍に一致していた (図 12E)。以上の結果から、*AERKPP*

マウスは、*Kras* 活性化と *Pten* 欠損を誘導するタイミングによって発生する腫瘍が異なることが示された。



B < Exp1 >



C < Exp2 >

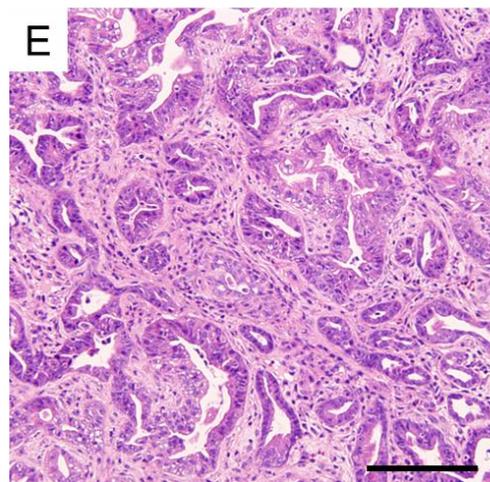
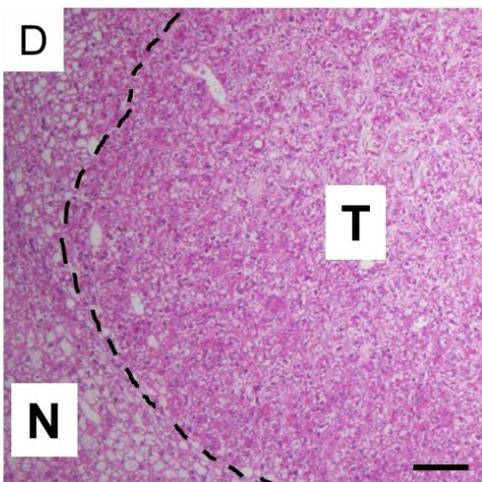
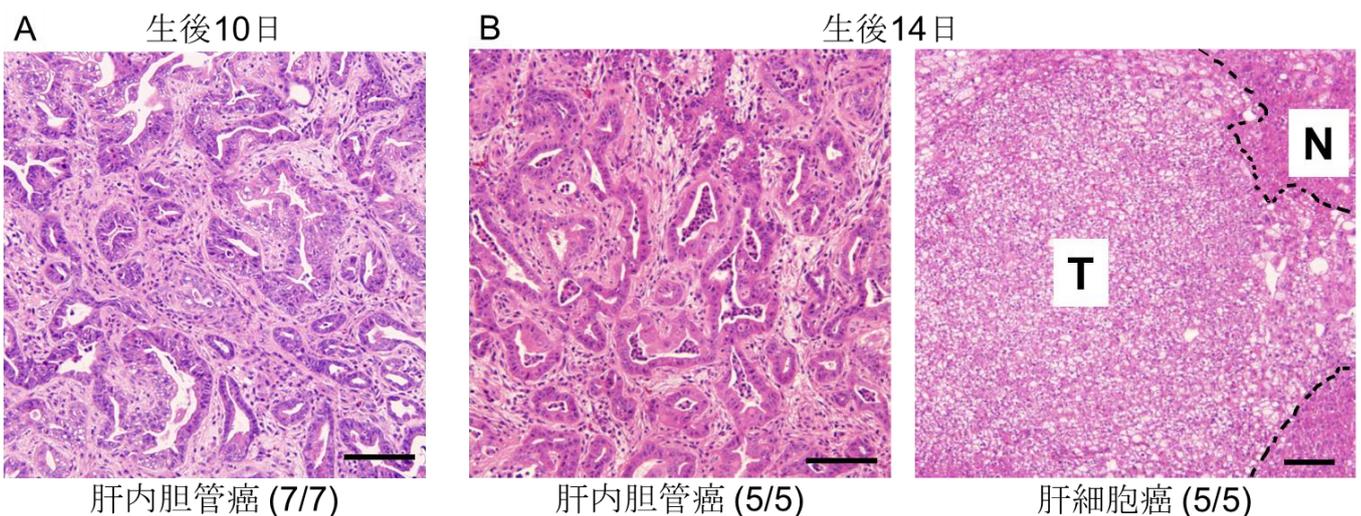


図 12 早期・晩期の *Kras* 活性化と *Pten* 欠損誘導による *AERKPP* マウスに発生した肝腫瘍の検討

(A) タモキシフェン投与による、初期 (Exp1)・晩期 (Exp2) *Kras* 活性化と *Pten*

欠損の誘導実験。(Exp1) 生後 8 週齢、(Exp2) 生後 10 日にタモキシフェン投与。
(B) Exp1 の投与 3 ヶ月後の肝臓。(C) Exp2 の投与 2 ヶ月後の肝臓。(黒矢頭) 肝
内胆管癌様病変 (D) 肝腫瘍部の病理組織像 (HE 染色)。T: 腫瘍部、N: 非腫瘍
部。バー:100 μm 。(E) 肝腫瘍部の病理組織像 (HE 染色)。T: 腫瘍部、N: 非腫
瘍部。バー:100 μm 。

さらに、*AERKPP* マウスにタモキシフェンを生後 10 日、14 日、21 日、56 日と
時系列を追って投与し、発生した腫瘍を解析した。生後 10 日にタモキシフェン
を投与したマウスの腫瘍は、肝内胆管癌で、肝細胞癌様の病変は全く認められな
かった (図 13A)。しかし、生後 14 日にタモキシフェンを投与したマウスの腫瘍
は、肝内胆管癌だけでなく肝細胞癌またはその前癌病変も認めた (図 13B)。さ
らに、生後 21 日、56 日と日がたつと、形成される腫瘍は肝細胞癌またはその前
癌病変のみであり、肝内胆管癌は全く認められなかった (図 13C、D)。



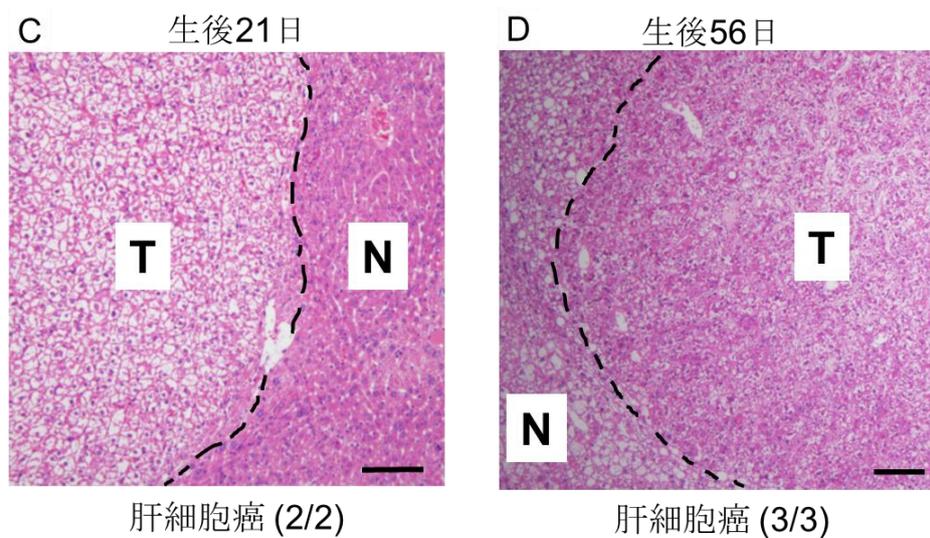


図 13 *Kras* 活性化と *Pten* 欠損誘導による *AERKPP* マウスに発生した肝腫瘍の検討

(A-D) タモキシフェンを時系列に沿って投与して *Kras* 活性化と *Pten* 欠損の誘導することによる、腫瘍生成の検討実験。(A) 生後 10 日 (7 匹)、(B) 生後 14 日 (5 匹)、(C) 生後 21 日 (2 匹)、(D) 生後 56 日 (3 匹) にタモキシフェン投与。(A-D) 肝腫瘍部の病理組織像 (HE 染色)。T: 腫瘍部、N: 非腫瘍部。バー: 100 μm 。

8. *AERKPP* マウス肝腫瘍の起源細胞の検討

タモキシフェン投与時期により、*AERKPP* マウスに全く異なった種類の肝腫瘍が形成されたことから、Cre 依存的遺伝子組み換えが起こる細胞がタモキシフェン投与時期により異なること可能性が考えられた。この可能性を検証するため、Cre 依存的に membrane-targeted tdTomato (mT) から membrane-targeted EGFP (mG) に発現が切り替わる *Rosa26-mTmG* レポーターマウス (*R26R^{mTmG/+}*)⁴⁷ を *Alb-Cre^{ERT2}* マウスと交配し、*Alb-Cre^{ERT2/+}; R26R^{mTmG/+}* マウス (*AERmTmG*) を作製した (図 14A)。タモキシフェン投与時期は、*AERKPP* マウスを用いた実験と同様に、生後 8 週 (Exp3) と生後 10 日 (Exp4) とした (図 14B)。生後 8 週齢の *AERmTmG* マウスにタモキシフェンを投与すると、EGFP の発現は肝細胞のみで見られた (図 14C)。一方で、生後 10 日にタモキシフェンを投与すると、EGFP の発現は肝細胞だけでなく胆管を形成する細胞でも検出された (図 14D)。以上の結果から、*AERKPP* マウスでは生後 10 日と比較的幼若な胆管上皮細胞が肝内胆管癌の起源細胞となり得ることが示唆された。

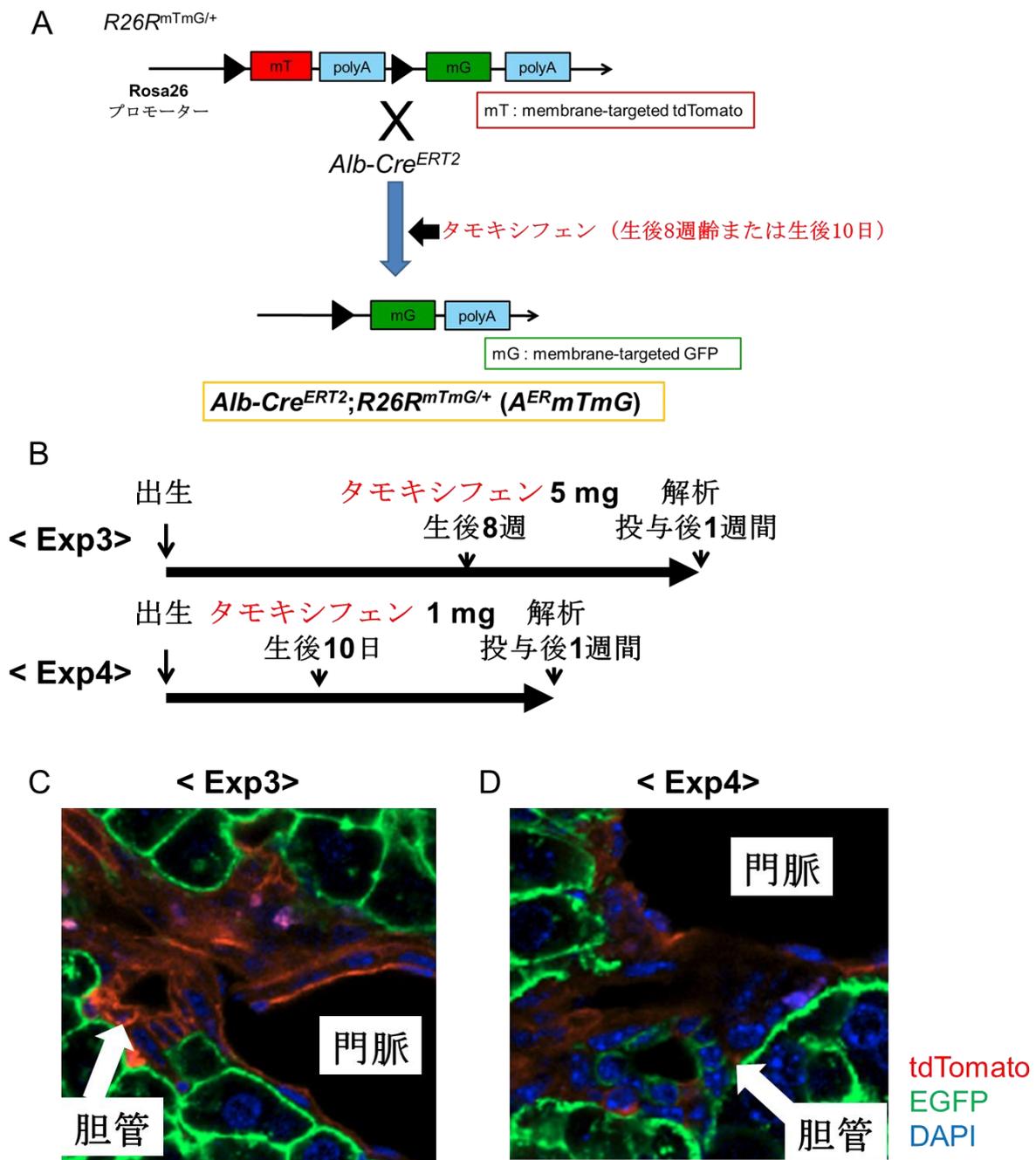


図 14 $A^{ER}mTmG$ マウスを用いた、タモキシフェン投与時期による遺伝子組み換え細胞の検討

(A) タモキシフェン依存的 Cre 活性化マウス ($Alb-Cre^{ERT2/+}$)と tdTomato/EGFP 発現マウス ($R26R^{mTmG/+}$)を用いた $A^{ER}mTmG$ マウスの作製。(B) 早期 (Exp4)・晚期 (Exp3)タモキシフェン投与による組換え実験。(Exp3) 生後 8 週、(Exp4) 生後 10 日にタモキシフェン投与。(C) (Exp3) の $A^{ER}mTmG$ マウスにおける肝組織と遺伝子組み換え細胞 (EGFP 陽性)。(D) (Exp4) の $A^{ER}mTmG$ マウスにおける肝組織と遺伝子組み換え細胞 (EGFP 陽性)。

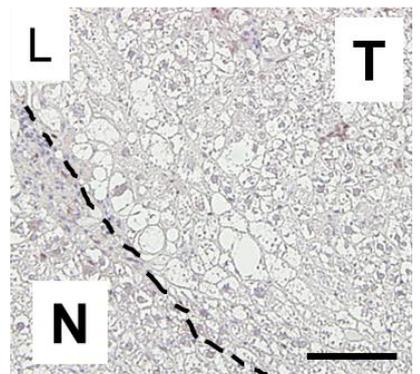
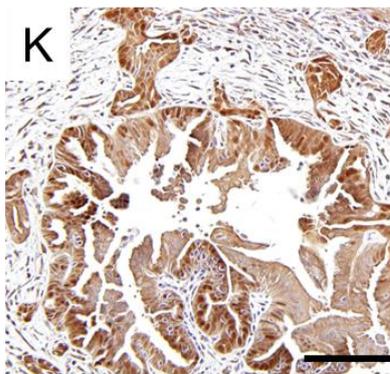
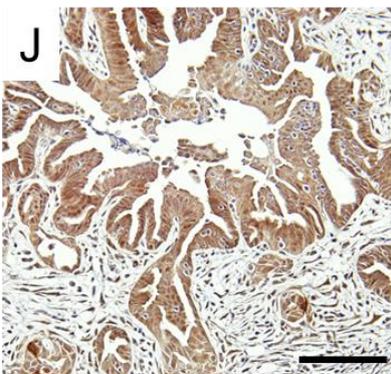
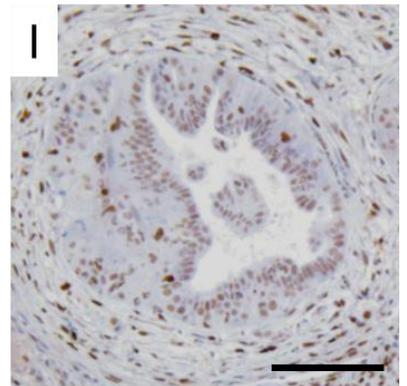
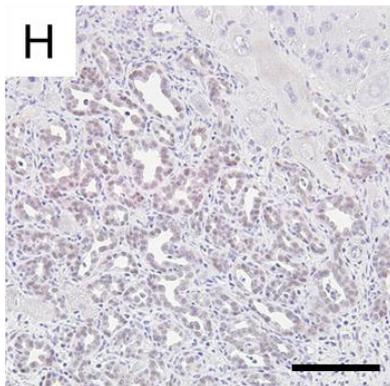
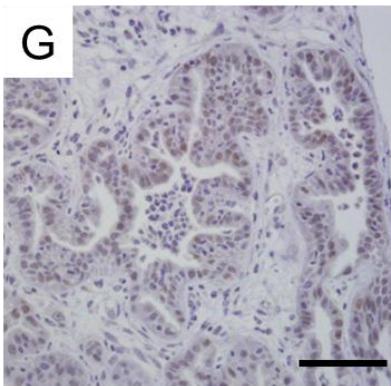
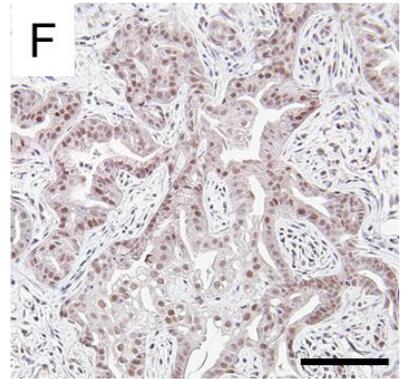
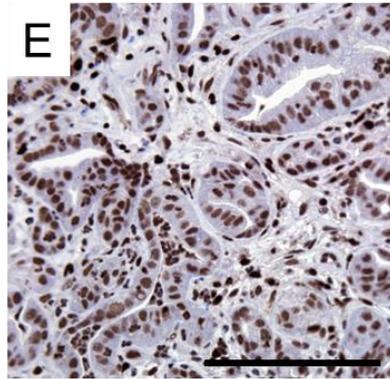
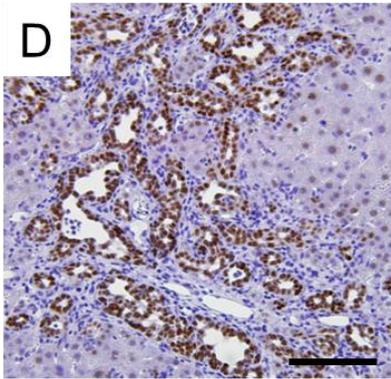
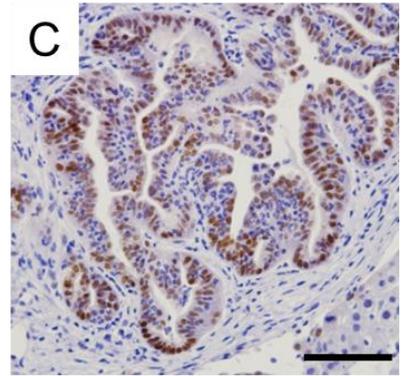
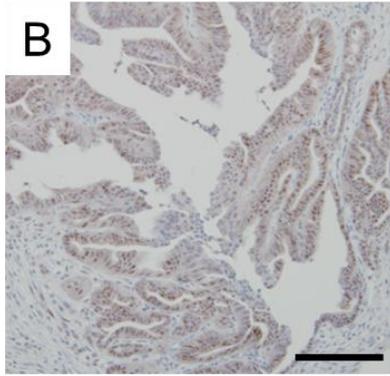
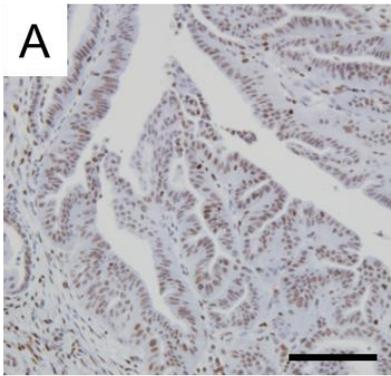
9. 成熟した胆管上皮における *Kras* 活性化 *Pten* 欠損により生じる肝腫瘍の検討

次に、成熟した胆管上皮特異的な活性化型 *Kras* 変異と *Pten* 欠損により肝内胆管癌が形成されるかどうかを検討した。タモキシフェン誘導的に *Ck19* プロモーター制御下に *Cre* を発現する *Ck19Cre^{ERT/+}* マウス⁴⁸ に、*LSL-Kras^{G12D/+}* マウスと *Pten^{flox/flox}* マウスを交配し、*Ck19Cre^{ERT/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flox/flox}* (*Ck19KPP*) マウスを作製した。生後 8 週齢の *Ck19KPP* マウスにタモキシフェンを投与すると、平均寿命はタモキシフェン投与後 30 日であった (図 15A)。種々の臓器の肉眼的所見を検討したところ、肝臓には肉眼的に明らかな異常は見られなかったが、肝外胆管、胆嚢は硬化し、拡張していた (図 15B)。さらに肝臓の病理組織学的検討を行ったところ、門脈周囲において乳頭状管の肝内胆管癌前癌病変が認められた (図 15C)。加えて、胆嚢、肝外胆管には乳頭状の過形成 (図 15D、E)、膵臓には膵上皮内腫瘍性病変 (*PanIN*; pancreatic intraepithelial neoplasia) 様の病変 (図 15F)、胃には腺上皮の過形成 (図 15G)、大腸には上皮の乳頭状または鋸歯状変化 (図 15H)、肺の気管支には閉塞性肺炎を伴う乳頭状の上皮過形成 (図 15I) が認められた。前述のようにこのマウスはタモキシフェン投与後 30 日で死亡するが、死因は肺病変による呼吸不全であると推測された。

(A) タモキシフェン投与による晩期 *Kras* 活性化と *Pten* 欠損の誘導実験。生後 8 週齢にタモキシフェン投与。(B) 投与 1 ヶ月後の肝臓。(C) 肝腫瘍部の病理組織像 (HE 染色)。(D) 胆嚢の病理組織像 (HE 染色)。(E) 肝外胆管の病理組織像 (HE 染色)。(F) 膵臓の病理組織像 (HE 染色)。(G) 胃の病理組織像 (HE 染色)。(黒矢印) 腺上皮の過形成。(H) 大腸の病理組織像 (HE 染色)。(黒矢印) 上皮の鋸歯状変化。(I) 肺の病理組織像 (HE 染色)。(黒点線領域) 乳頭状の上皮過形成。バー:100 μm 。

10. マウス肝腫瘍における Notch 経路の役割の解析

近年、胆管癌発症における Notch シグナルの重要性と治療標的としての可能性が報告されている¹⁹。そこで本研究で樹立した肝内胆管癌マウスモデルの腫瘍において、Notch シグナルが活性化されているのか、また発がんに関与しているのかを検討した。まず、Notch シグナルに必要な転写因子である *Rbpj* の発現と、Notch シグナルの重要なエフェクター分子として知られている *Hes1* と *Sox9* の発現を、*AKPP*、*AERKPP*、*Ck19KPP* マウスの腫瘍において免疫染色によって検討した。その結果、*Rbpj* の発現は *AKPP*、*AERKPP*、*Ck19KPP* マウスの肝内胆管癌病変において陽性であった (図 16A、E、I)。また、*Hes1* は *AKPP*、*AERKPP*、*Ck19KPP* すべてのマウスの胆管病変で陽性であった (図 16B、F、J)。さらに *Sox9* の活性化を検討したところ、*AKPP*、*AERKPP*、*Ck19KPP* すべてのマウスにおける肝臓の肝門部および末梢部の胆管病変で陽性であった (図 16 C、D、G、H、K)。これらの結果から、Notch 経路の活性化は、肝細胞がんには関与しないが、肝内胆管癌及びその前癌病変の発生に関与することが示唆された。



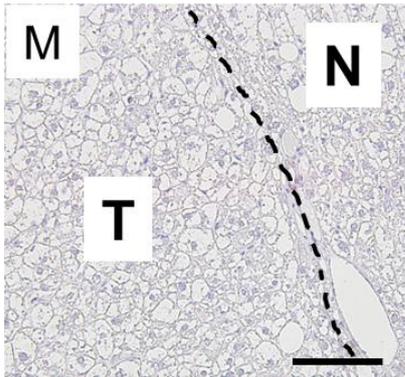


図 16 マウスの肝腫瘍における Notch 経路の活性化の検討

(A-D) 生後 8 週の *AKPP* マウス。(A) *Rbpj* 免疫染色。(B) *Hes1* 免疫染色。(C) *Sox9* 免疫染色 (肝門部)。(D) *Sox9* 免疫染色 (末梢部)。(E-H) 生後 8 週でタモキシフェンを投与した *AERKPP* マウスの肝内胆管癌。(E) *Rbpj* 免疫染色。(F) *Hes1* 免疫染色。(G) *Sox9* 免疫染色 (肝門部)。(H) *Sox9* 免疫染色 (末梢部)。(I-K) 生後 8 週でタモキシフェンを投与した *Ck19KPP* マウス。(I) *Rbpj* 免疫染色。(J) *Hes1* 免疫染色。(K) *Sox9* 免疫染色。(L, M) 生後 8 週でタモキシフェンを投与した *AERKPP* マウスの肝細胞癌。(L) *Hes1* 免疫染色。N: 非腫瘍部、T: 腫瘍部。(M) *Sox9* 免疫染色。N: 非腫瘍部、T: 腫瘍部。バー : 100 μm 。

11. 肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠損マウスの肝内胆管癌における *Hes1* 発現調節機序の検討

肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠損マウスの肝内胆管癌において、Notch シグナルの下流分子である *Hes1* 及び *Sox9* の発現増加が確認されたため、Ras-Mapk および Pi3k-Akt シグナル伝達経路の活性化と、*Hes1* 及び *Sox9* の発現の調節機序について検討した。まず、AKPP マウスから樹立した初代培養細胞に対して、Mapk 経路を遮断するために MEK 阻害剤 (AZD6624)、Pi3k 経路を遮断するために PI3K 阻害剤 (PI103)あるいは AKT 阻害剤 (MK2206)を培地に加えて 48 h 培養し、タンパク質と mRNA を抽出した。ウエスタンブロット及び RT-qPCR により、*Hes1*、*Sox9* の発現を調べた結果、MEK 阻害剤により *Hes1*、*Sox9* の発現はタンパク質レベル (図 17A)、mRNA レベルとともに抑制された (図 17C、D)。一方、PI3K 阻害剤では、*Hes1* 及び *Sox9* の発現はタンパク質レベルで抑制されたが (図 17B)、mRNA レベルでは *Sox9* のみ抑制され、*Hes1* の発現には影響しなかった (図 17E、F)。Mapk 経路による *Hes1*、*Sox9*、*Rbpj* タンパク質及び mRNA の発現への影響に関しては、Erk1/2 あるいは Erk1/2+Mek1/2 に対する siRNA を用いた Mapk 経路の抑制実験でも同様の結果が得られた (図 17G-L)。これらの結果より、*Hes1*、*Sox9* の発現は、Mapk 経路、Pi3k 経路のいずれによっても制御を受けるが、*Hes1* の発現については、Pi3k 経路は転写レベルで影響しないことが示された。

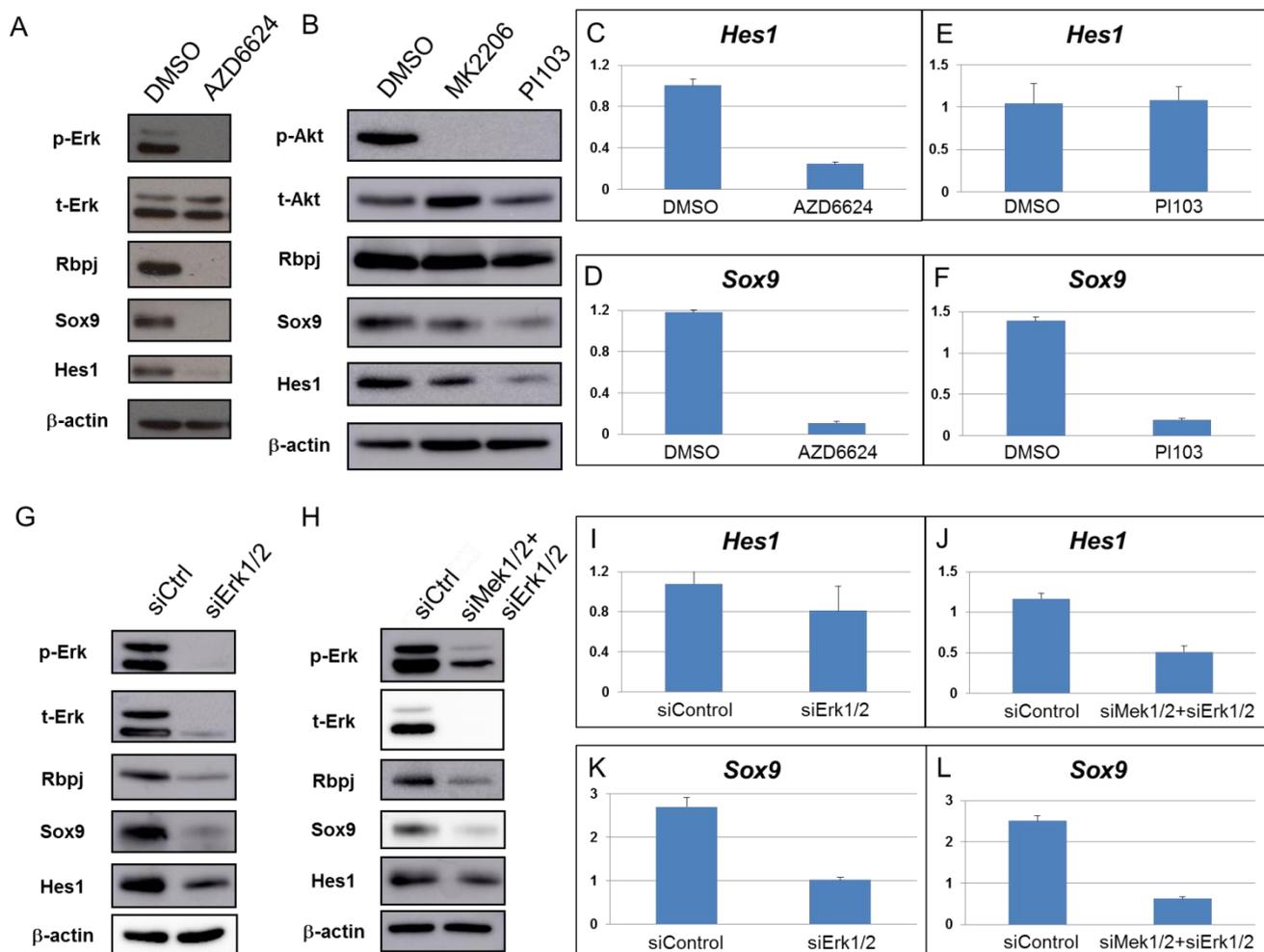


図 17 AKPP6 細胞における *Hes1*、*Sox9* 発現調節機序の検討

(A、C、D) MEK 阻害剤 (AZD6624) 処置による Ras-Mapk 経路、Notch 経路下流分子の発現変化。(A) ウェスタンブロット。(C) *Hes1* の発現 (RT-PCR)。(D) *Sox9* の発現 (RT-PCR)。(B、E、F) AKT 阻害剤 (MK2206) または、PI3K 阻害剤 (PI103) 処置による Pi3k-mTorc1 経路、Notch 経路下流分子の発現変化。(E) *Hes1* の発現 (RT-PCR)。(F) *Sox9* の発現 (RT-PCR)。(G、I、K) siErk1/2 処置による Ras-Mapk 経路、Notch 経路下流分子の発現変化。(G) ウェスタンブロット。(I) *Hes1* の発現 (RT-PCR)。(K) *Sox9* の発現 (RT-PCR)。(H、J、L) siMek1/2+siErk1/2 処置による Ras-Mapk 経路、Notch 経路下流分子の発現変化。(H) ウェスタンブロット。(J) *Hes1* の発現 (RT-PCR)。(L) *Sox9* の発現 (RT-PCR)。

次に、Mapk 経路阻害による *Hes1* の発現の抑制が、*Hes1* の Notch シグナル経路の転写因子である *Rbpj* の発現に依存するかどうか検討した。AKPP6 細胞を

siRbpj で処理し、Hes1 の発現をウエスタンブロット及び RT-qPCR で検討したところ、Hes1 の発現は Rbpj の発現抑制により変化しなかった (図 18A-C)。また Hes1 の転写開始点から-467bp までの領域を組み込まれたルシフェラーゼレポーター・プラスミドと、その領域内の Rbpj の結合配列に変異を導入した Rbpj 非反応性のルシフェラーゼレポーター・プラスミド (図 18D)を AKPP6 細胞にトランスフェクションしても、ルシフェラーゼ活性に差が見られなかった (図 18E)。また、AKPP6 細胞における Hes1 の発現は、活性化型 Notch (NICD)の生成に必要な γ -secretase の阻害剤である、N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT)処理により抑制された (図 18E)。しかし、Rbpj の発現を siRNA で抑制しても Hes1 の発現はほとんど変化せず、さらに DAPT 処理を加えると Hes1 の発現が有意に減少した (図 18F)。これらの結果は、Hes1 の発現は活性化型 Notch (NICD)に制御されているが、下流は Rbpj 以外の転写因子によって調節されていることを示唆している。すなわち AKPP6 細胞において認められた Hes1 の発現は、Rbpj を介する古典的な Notch シグナルには依存しておらず、Ras-Mapk シグナルに依存的な発現調節機序が働いている可能性が示唆された。

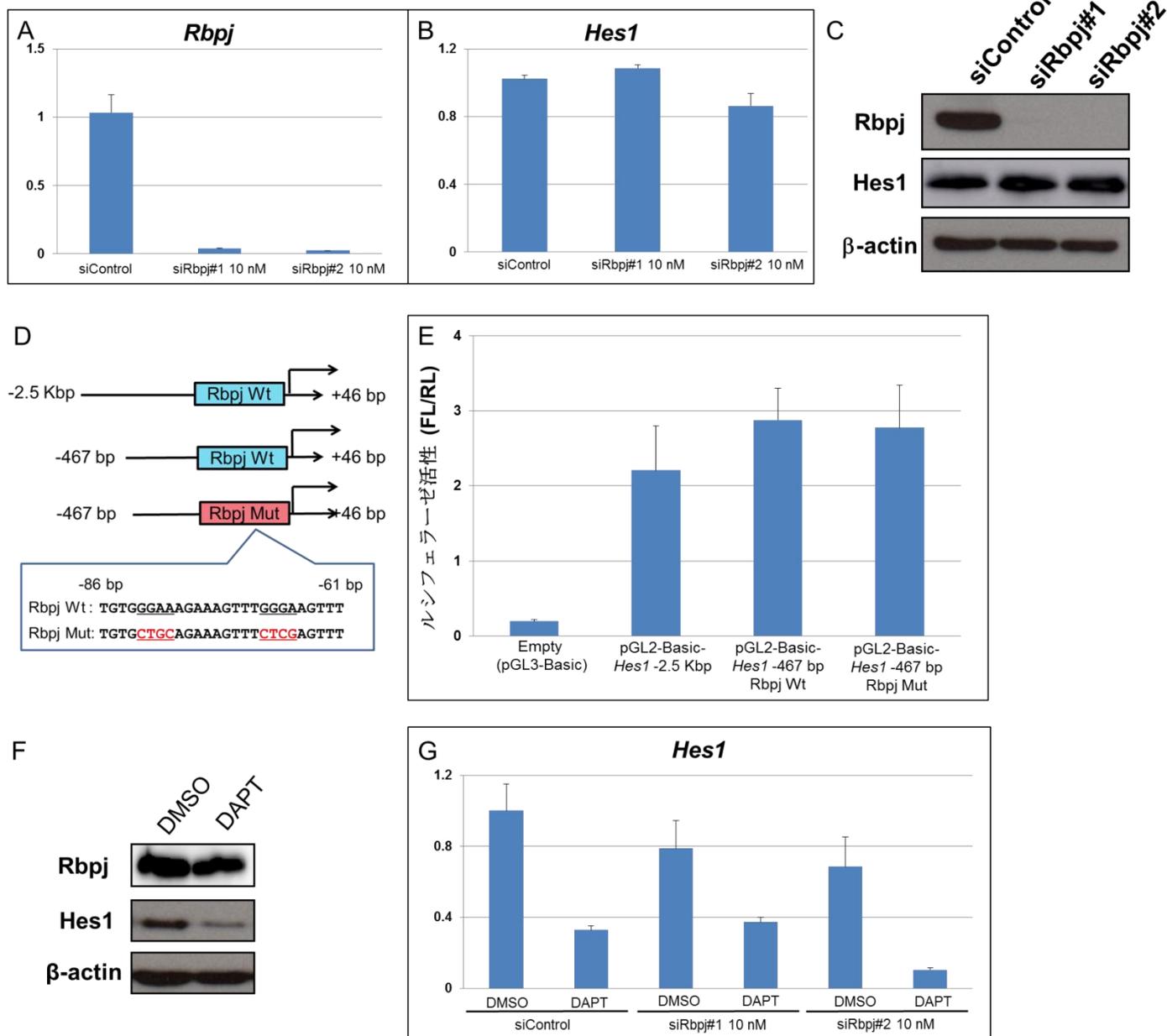


図 18 AKPP6 細胞における *Hes1* の古典的 Notch 経路による発現調節の検討 (A-C) siRbpj (siRbpj#1、#2) を処置による Rbpj、*Hes1* の発現変化。(A) *Rbpj* の発現 (RT-qPCR)。(B) *Hes1* の発現 (RT-qPCR)。(C) ウェスタンブロット。(D) 野生型と変異型 Rbpj 結合モチーフを含む *Hes1* レポータープラスミド。(E) 野生型と変異型 *Hes1* レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイ。(F) DAPT で処理した際の Rbpj、*Hes1* の発現変化 (ウェスタンブロット)。(G) Rbpj siRNA で処置後に、DMSO または DAPT を処理した際の *Hes1* の発現 (RT-qPCR)。

12. Mapk 経路による *Hes1* mRNA の制御機構の検討

Mapk 経路による *Hes1* mRNA 発現調節機構の同定のため、*Hes1* プロモーターの Mapk 経路による転写調節機序の解析を行った。*Hes1* の転写開始点から上流-4.6 kb までの 5'flanking 領域を導入したルシフェラーゼレポーター・プラスミド (pGL4.14-*Hes1* -4.6 Kbp)、を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。pGL4.14-*Hes1* -4.6 Kbp プラスミドを *AKPP6* 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定したところ (図 19A)、pGL4.14 ベクター (Empty) と比較して 57.7 倍増加していた (図 19B)。次に、pGL4.14-*Hes1* -4.6 Kbp プラスミドをトランスフェクションした後、24 時間後に MEK 阻害剤 (AZD6624) で処理すると (図 19C)、処理しない細胞に比べルシフェラーゼ活性が 0.35 倍に低下した。しかし、pGL4.14 ベクターをトランスフェクションした細胞においても、AZD6624 によりルシフェラーゼ活性が 0.37 倍に低下したことから (図 19D)、この低下は MEK 阻害剤による非特異的影響である可能性が強く疑われた。

A

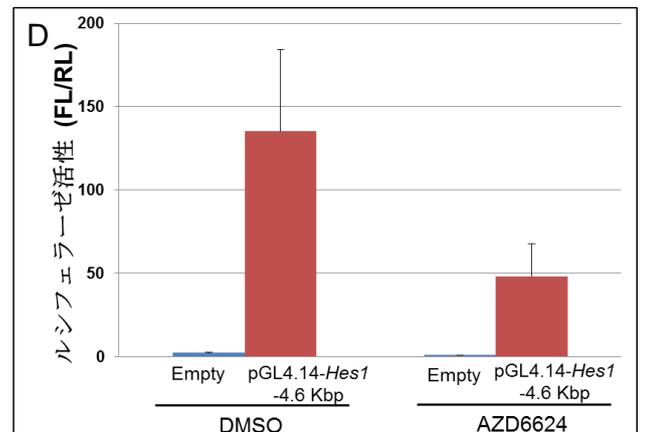
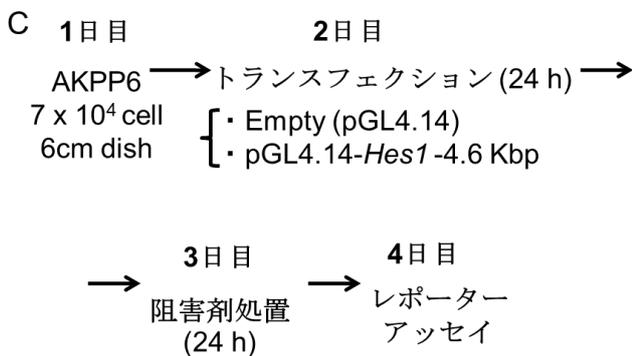
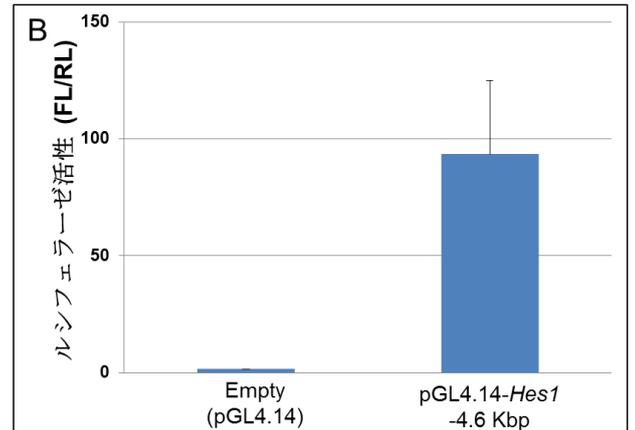
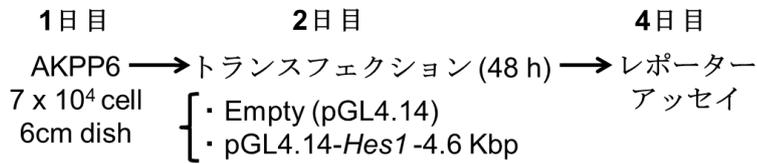


図 19 *Hes1* のルシフェラーゼ活性に対する MEK 経路阻害の効果

(A) ルシフェラーゼアッセイのプロトコール。(B) 5'flanking 領域 (*Hes1* -4.6 Kbp) のルシフェラーゼ活性。(C) 阻害剤を処理した際のルシフェラーゼアッセイのプロトコール。(D) MEK 阻害剤 (AZD6624)による 5'flanking 領域 (*Hes1* -4.6 Kbp) のルシフェラーゼ活性の変化。

次に、Mapk による *Hes1* 発現調節領域がイントロン内に存在する可能性を検討するため、最小限プロモーター (minimal promote: minP)を有するルシフェラーゼレポーターベクターpGL4.23 に、*Hes1* の intron 1, 2, 3 をそれぞれクローニングし、MEK 阻害剤によるルシフェラーゼ活性への影響を検討した。まず、それぞれの intron をクローニングしたレポータープラスミドを AKPP 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、intron 2 または intron 3

を含むプラスミドは、コントロールに比べそれぞれ 2.7 倍、3.3 倍とルシフェラーゼ活性の有意な上昇を認めたが、intron1 では有意な上昇を認めなかった (図 20A)。そこで intron 2 または intron 3 を含むプラスミドを用いて、AZD6624 存在下及び非存在下でルシフェラーゼ活性を検討したところ、intron 2 で 0.82 倍、intron 3 で 0.62 倍と MEK 阻害剤によるルシフェラーゼ活性の低下が認められた。しかし、コントロールでも AZD6624 により 0.73 倍にルシフェラーゼ活性が低下した (図 20B)。したがって、これらのルシフェラーゼ活性の低下は、MEK 阻害剤の非特異的作用によるものと考えた。更に *Hes1* の 3'-UTR を介した発現調節の可能性を検討するため、*Hes1* 遺伝子の 3'-UTR を pmirGLO ベクターにクローニングした pmirGLO-*Hes1*-3'-UTR を作製した。このプラスミド及びコントロールベクターを AKPP 細胞にトランスフェクションし、AZD6624 存在下・非存在下でルシフェラーゼアッセイを行った。pmirGLO-*Hes1*-3'-UTR をトランスフェクションした AKPP6 細胞では、AZD6624 処理によりルシフェラーゼ活性が 0.4 倍に減少していた。一方、pmirGLO ベクターをトランスフェクションした細胞においては、MEK 阻害剤によるルシフェラーゼ活性の減少が 0.64 倍であり、ルシフェラーゼ活性の低下に差が見られた (図 20C)。しかしながら、siMek1/2+siErk1/2 を AKPP6 細胞に処理しても、*Hes1* 3'-UTR を含むレポータープラスミドのルシフェラーゼ活性に影響を与えなかった (図 20D)。これらの結

果より、*Hes1* 3'-UTR にも Mapk 経路依存的な *Hes1* 発現調節領域は存在しないと考えられた。以上の結果から、Mapk 経路依存的な *Hes1* の発現調節は、*Hes1* の転写開始点より -4.6 kb の点よりもさらに遠隔の領域により転写調節されているか、転写ではなく RNA の安定性など他のメカニズムにより調節されている可能性が考えられた。

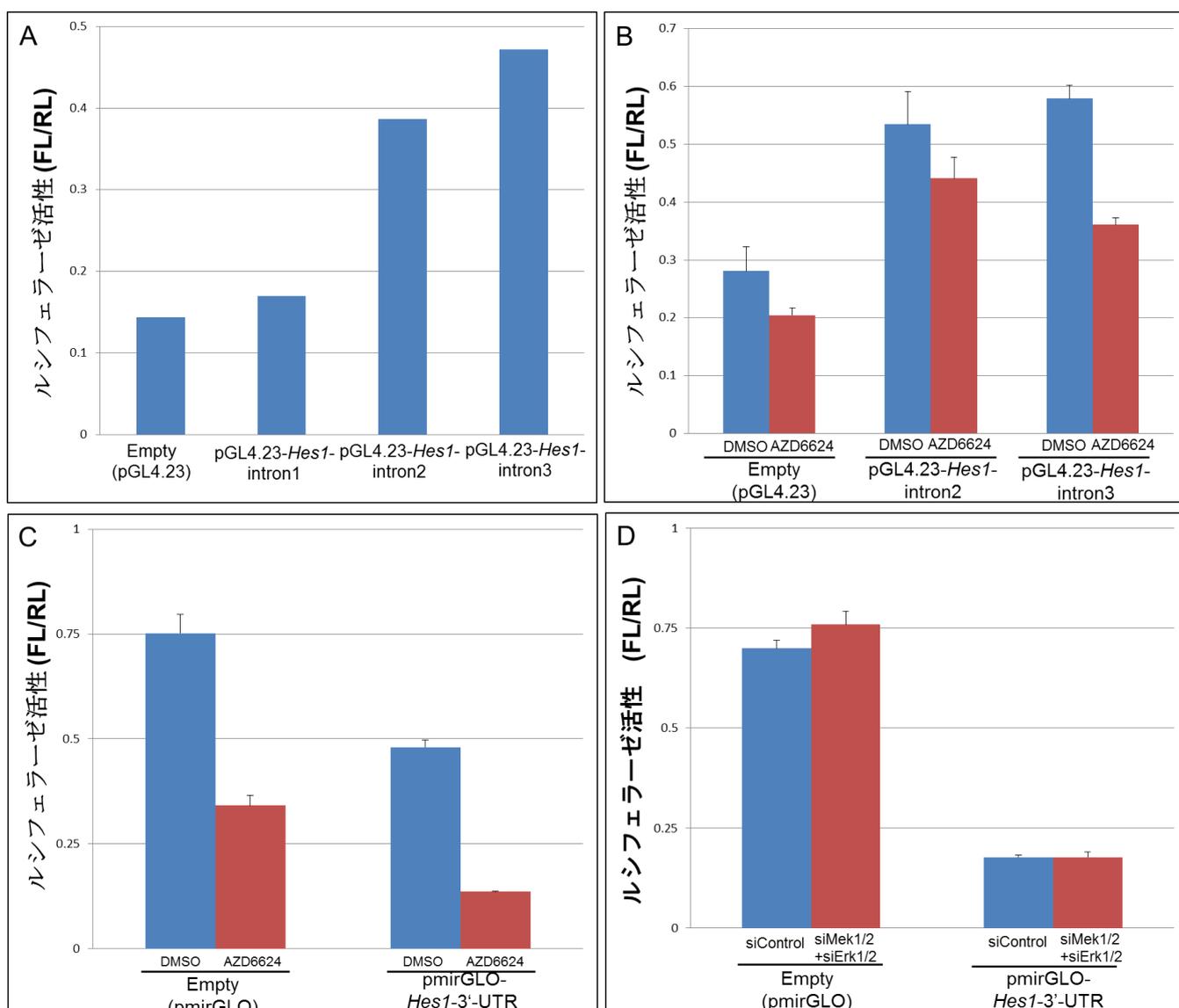


図 20 インترون領域及び 3'-UTR による *Hes1* の発現調節に対する MEK 経路阻害の効果の検討

(A) *Hes1* イントロン領域のルシフェラーゼ活性。(B) MEK 阻害剤 (AZD6624)によるイントロン領域のルシフェラーゼ活性の変化。(C) MEK 阻害剤 (AZD6624)による 3'-UTR のルシフェラーゼ活性の変化。(D) siMek1/2+siErk1/2 処置による 3'-UTR のルシフェラーゼ活性の変化。

13. 肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠損マウスの肝内胆管癌形成における、*Hes1* の関与の *in vivo* での検討

肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠損マウス (*AKPP* マウス)の肝内胆管癌形成において、*Hes1* の関与を *in vivo* で検討するため、*Hes1* の条件的ノックアウトマウス (*Hes1^{flox/flox}*) を *AKPP* マウスと交配した、*Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flox/flox}; Hes1^{flox/flox}* (*AKPPHH*) マウスを作製した。*AKPPHH* マウスの生存率は、*AKPP* と比較して有意差を認めなかった (図 21)。*AKPPHH* マウスは *AKPP* マウスと同様に、生後約 5 週齢頃から腹部が膨隆し、黄疸などの症状を呈した。また、*AKPP* と同様に肝臓には肝門部を中心とした硬いびまん性腫瘍病変を認めた (図 22A、B)。この肝病変の組織学的検討を行ったところ、生後 7~8 週齢においては、肝門部の胆管癌様病変、末梢部の胆管の過形成性変化が認められ、これらは *AKPP* マウスに生じる肝臓病変と類似していた (図 22C、D)。さらにマッソントリクローム染色では、*AKPP* マウス同様に腫瘍部周囲に発達した線維性変化が確認された (図 22E、F)。免疫染色では、腫瘍性病変において *Hes1* 陰性であることが確認された。これらの結果より、*Kras* 活性化と *Pten* 欠損による肝内胆管癌の形成に、*Hes1* は不可欠ではないことが示唆された (図 22G、H)。

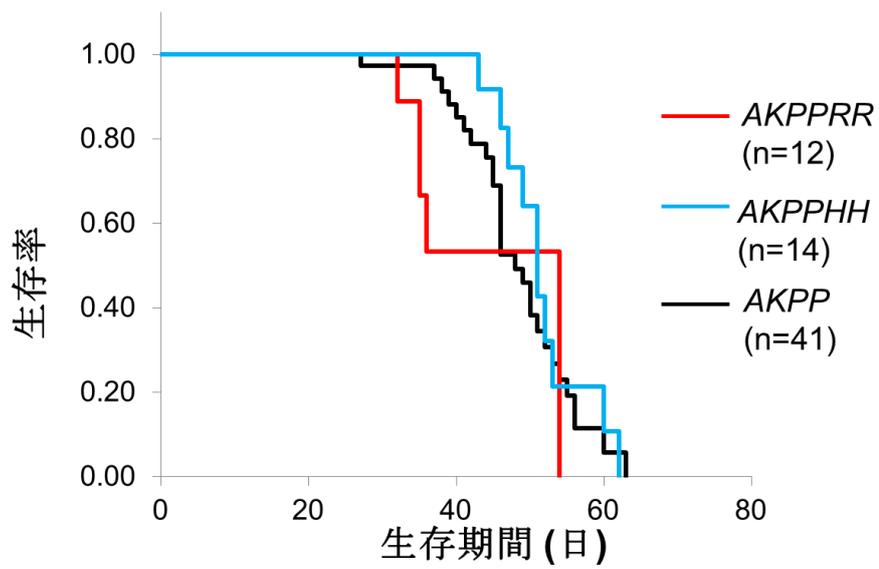
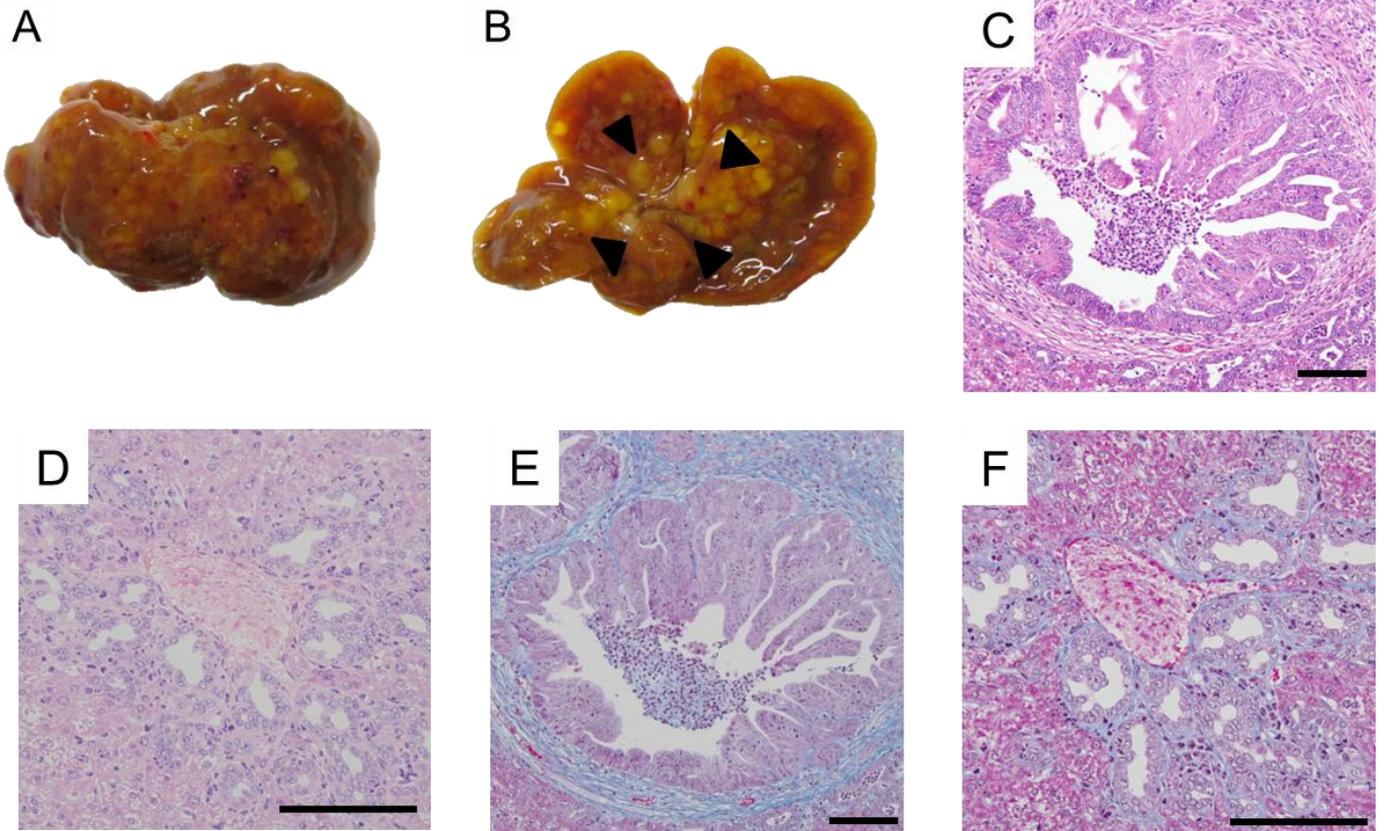


図 21 *AKPPRR* マウスと *AKPPHH* マウスの生存率
 (赤) *AKPPRR* マウス、(水色) *AKPPHH* マウス、(黒) *AKPP* マウスの生存率



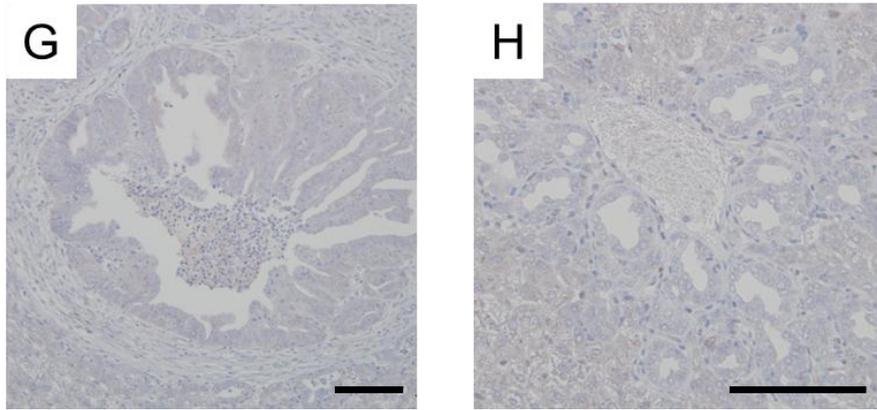


図 22 *AKPPHH* マウスの肉眼的・病理組織学的所見

(A、B) 生後 8 週齢における *AKPPHH* マウスの肝臓肉眼的所見。(A) 肝臓表。(B) 肝臓裏。(黒矢頭) 硬いびまん性腫瘍性病変。(C、D) *AKPPHH* マウスの病理組織像 (*HE* 染色)。(C) 肝門部の肝内胆癌様病変。(D) 末梢部の胆管過形成。(E、F) マッソントリクローム染色。(E) 肝門部。(F) 末梢部。(G、H) *Hes1* 免疫染色。(G) 肝門部。(H) 末梢部。バー:100 μm 。

14. 肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠損マウスの肝内胆管癌形成における *Rbpj* の関与の *in vivo* での検討

肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠損マウス (*AKPP* マウス)の肝内胆管癌形成において、Notch シグナルの重要な転写因子 *Rbpj* の関与を *in vivo* で検討するため、*Rbpj* の条件的ノックアウトマウス(*Rbpj^{flox/flox}*)を *AKPP* マウスと交配した、*Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flox/flox}; Rbpj^{flox/flox}* (*AKPPRR*)マウスを作製した。*AKPP* と比較して *AKPPRR* マウスの生存率にも有意な差は認めなかった (図 21)。*AKPPRR* マウスは、ヒト肝内胆管癌で高率に見られる黄疸を認めた。しかし、腹部膨隆は 8 週齢まで生存した一部のマウスに見られるのみで、大部分のマウスでは認められなかった。*AKPPRR* マウスにも肝門部に硬い腫瘍性病変を認めた (図 23A)が、*AKPP* マウスと比較して病変は軽度であった。また、肝表面に多数の点状出血を認めた (図 23B)。病理組織学的検討では、生後 5 週齢において肝門部に肝内胆管上皮の乳頭状変化が見られ、肝内胆管癌の前癌病変と考えられた (図 23C)。一方末梢部では、胆管の著明な減少を認めたが、肝門部で見られた肝内胆管上皮の乳頭状変化は認められなかった (図 23D)。肝表面の点状出血に一致して、肝臓内に多数の出血性壊死巣を認めた (図 23E)。さらにマッソントリクローム染色により、肝門部の病変周囲の膠原繊維の蓄積が明らかとなった (図 23F)

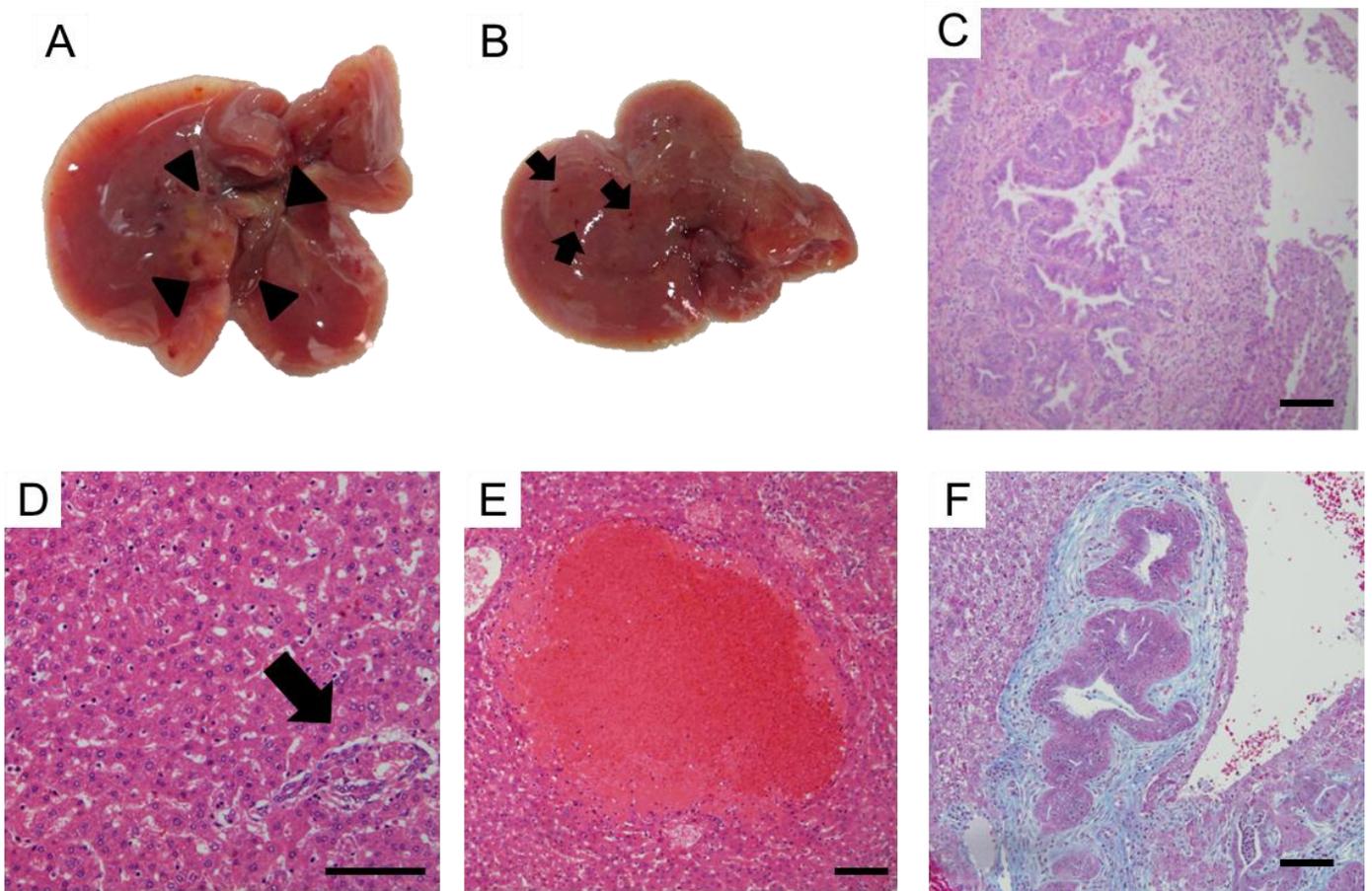


図 23 *AKPPRR* マウスの組織学的検討

(A、B) 生後 5 週齢における *AKPPRR* マウスの肝臓肉眼的所見。(A) 肝臓裏。(黒矢頭) 硬いびまん性腫瘍性病変。(B) 肝臓表。(黒矢印) 点状出血。(C-E) *AKPPRR* マウスの病理組織像 (HE 染色)。(C) 肝門部の核の極性の乱れを伴った肝内胆管癌様病変。(D)末梢部の胆管 (黒矢印)。(E) 出血性壊死巣。(F) 肝門部の肝腫瘍性病変のマッソントリクローム染色。バー：100 μm 。

Rbpj の免疫染色では、*AKPPRR* マウスの肝門部に生じた前癌病変において、*Rbpj* は陰性であった (図 24A)。一方、*AKPPRR* マウスの肝臓の末梢部において見られた胆管の一部は *Rbpj* 陽性であったが、大部分の細胞は *Rbpj* ノックアウトされており、*Rbpj* を抑制することで胆管形成が抑えられた (図 24B)。Ck19 の免疫染色では、肝門部の病変は陽性であり、胆管癌の性質を有していること

が確認された (図 24C)。古典的な Notch シグナル経路において *Rbpj* の下流分子として知られている *Hes1* と *Sox9* の発現を免疫染色によって検討したところ、肝門部の病変は両者ともに陽性であり、*Rbpj* 非依存的にこれらの分子が発現していることが明らかとなった (図 24D、E)。

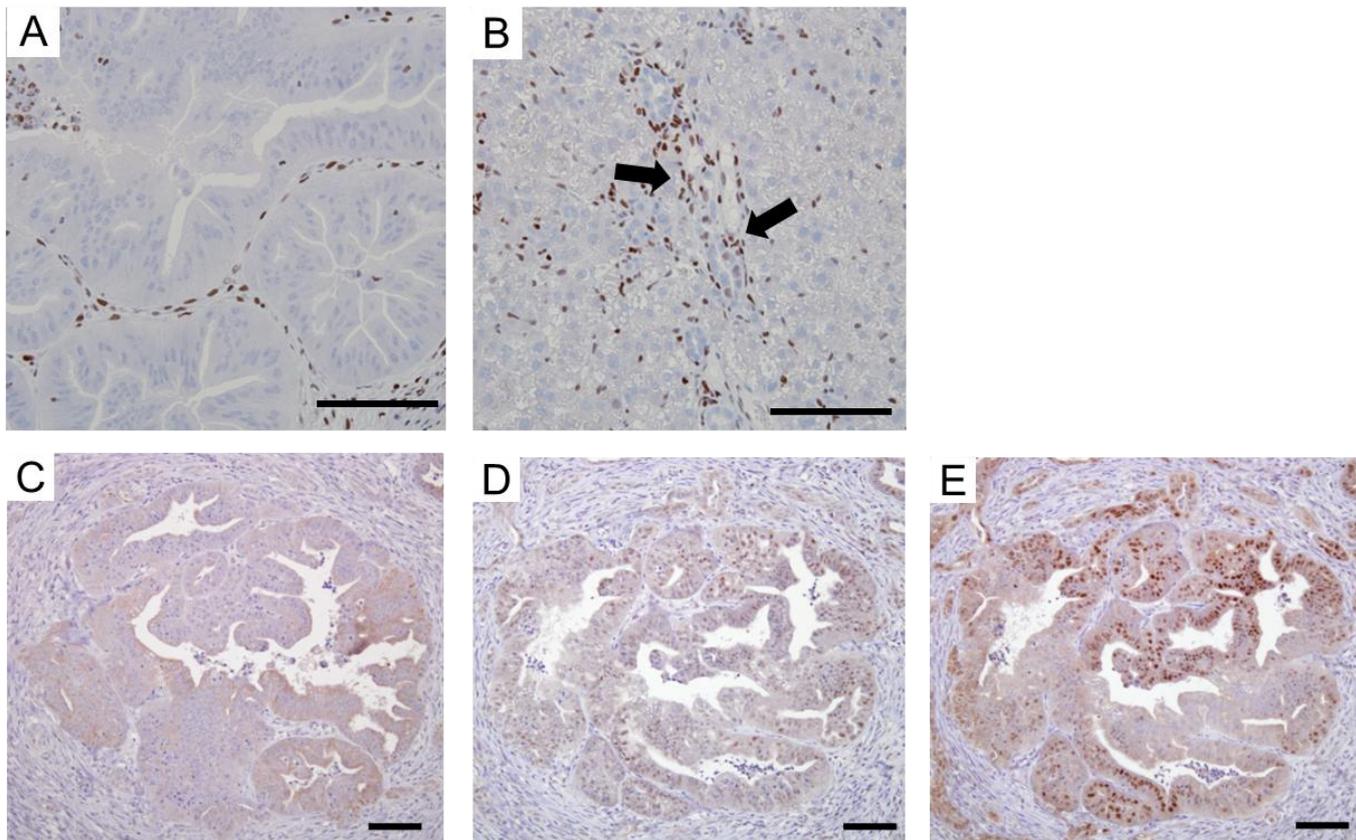


図 24 *AKPPRR* マウスの肝臓における *Rbpj* の免疫染色

(A-E) 生後 5 週齢の *AKPPRR* マウスを用いた免疫染色。(A、B) *Rbpj* 免疫染色。(黒矢印) *Rbpj* 陽性細胞。(C) *Ck19* 免疫染色。(D) *Hes1* 免疫染色。(E) *Sox9* 免疫染色。バー:100 μm 。

15. タモキシフェン誘導型遺伝子改変システムを用いた、肝特異的 *Kras* 活性化
Pten 欠損による肝末梢胆管病変における *Rbpj* の関与の検討

Alb-Cre マウスを使用した *AKPPRR* マウスでは、末梢での肝内胆管形成前の胎生後期において遺伝子改変により *Rbpj* が欠損しており、*AKPPRR* マウスにおける肝末梢での胆管病変の抑制は、*Rbpj* が末梢胆管由来の腫瘍発生に重要なのではなく、肝末梢での胆管の形成に必須な可能性がある。この可能性を検証するため、末梢での肝内胆管形成後に *Rbpj* 欠損を誘導できる、タモキシフェン誘導性の *Alb-Cre^{ERT2/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flox/flox};Rbpj^{flox/flox}* (*AERKPPRR*) マウスを作製した (図 25A、B)。肝門部だけではなく末梢の胆管も形成されている生後 10 日の *AERKPPRR* マウスにタモキシフェンを投与したところ、*AERKPP* マウスの場合 (図 25C)と同様に、肝門部中心に肝内胆管癌様病変を発生した (図 24D)が、核の極性の乱れはなく、分化度がより高かった。一方 *AERKPP* マウスで見られた肝末梢部の胆管の増生 (図 25E)は著明に減少していた (図 25F)。*Rbpj* の免疫染色を行ったところ、大部分の肝内胆管癌細胞において *Rbpj* は陰性であったが (図 25G)、末梢においては胆管を形成する細胞の多くは *Rbpj* 欠損が不完全な *Rbpj* 陽性であるが (図 25H)、*AERKPP* ほどの胆管過形成は見られなかった。これらの結果から、*Rbpj* は肝門部の腫瘍形成を抑制しないが、*Kras* 活性化及び *Pten* 欠損による末梢胆管形成の促進に必須であることが示唆された。

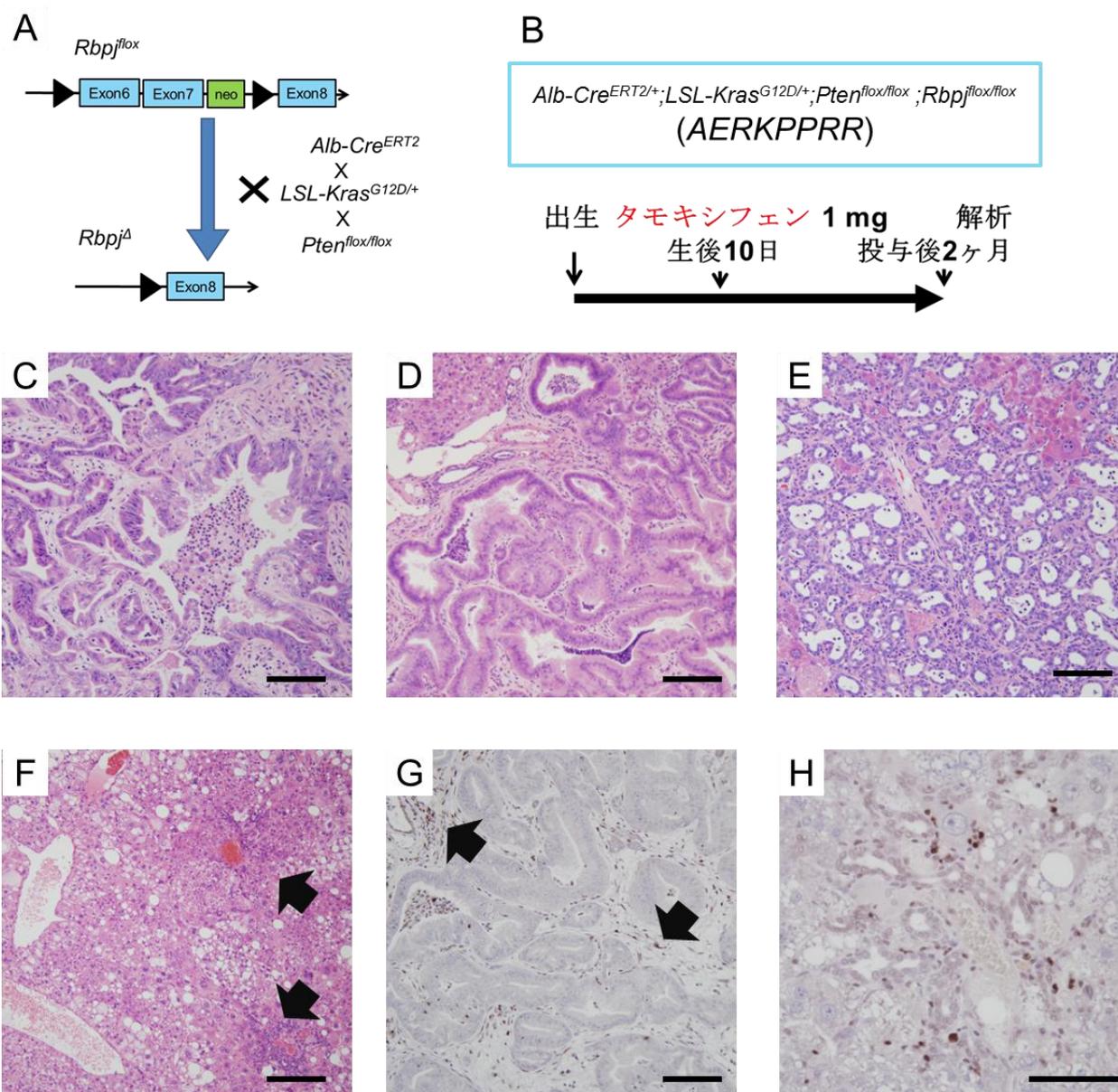


図 25 AERKPP および AERKPPRR マウスに生じた胆管病変と Rbpj の発現
 (A, B) タモキシフェン依存的 Cre 活性化マウス ($Alb-Cre^{ERT2/+}$) と $LSL-Kras^{G12D/+}$ マウス、 $Pten^{lox/flox}$ マウス、 $Rbpj^{lox/flox}$ マウスを用いた AERKPPRR マウスの作製。タモキシフェンは生後 10 日目に投与した。(C, E) タモキシフェン投与 2 か月後の AERKPP マウスの肝組織像 (HE 染色)。(C) 肝門部。(E) 末梢部。(D, F, G, H) タモキシフェン投与 2 か月後の AERKPPRR マウスの肝組織像。(D) 肝門部 (HE 染色)。(F) 末梢部 (HE 染色)。(矢印) 抑制された胆管形成。(G) 肝門部の Rbpj 免疫染色。(矢印) Rbpj 陽性細胞。(H) 末梢部の Rbpj 免疫染色。バー: 100 μ m。

考察

本研究の中で、私は肝特異的に活性型 *Kras* 変異と *Pten* ホモ欠損を導入することによって、新規肝内胆管癌マウスモデルを樹立した。このマウスモデル (*AKPP* マウス)は、腫瘍が肝内胆管癌に限られている点と、癌の発生・進展が非常に速い点で、これまでのマウスモデルとは異なっている。現在までにいくつかの遺伝子改変マウスを用いた、薬剤を用いない肝内胆管癌自然発生マウスモデルが報告されている (表 10)。例えば、肝特異的 *Pten* と *Smad4* のダブルノックアウトマウス¹⁶ であるが、このマウスモデルは肝内胆管癌のみを形成するが、腫瘍形成まで約 4~7 ヶ月と時間を有する。また、肝特異的活性型 *Kras* 変異と *p53* ホモ欠損マウスがある¹⁷ では、腫瘍形成まで約半年を有し、形成される腫瘍は肝内胆管癌だけとは限らず、肝内胆管癌と肝細胞癌の両者を生じることも、肝細胞癌のみを生じることもあると報告されている。薬剤を使用した肝内胆管癌発癌マウスモデルとしては、*Ck19Cre^{ERT}* マウスを用いて胆管上皮細胞特異的に *p53* 遺伝子をホモ欠損させたマウスモデルにおいて、チオアセトアミドによる慢性肝障害を誘導すると、肝内胆管上皮を起源とする肝内胆管癌が発生するとの報告がある⁴¹。

肝内胆管癌発生 遺伝子改変マウス	腫瘍の種類	問題点
① 肝特異的 Smad4 と Pten の ダブルノックアウトマウス	肝内胆管癌	発癌まで半年近くを要する。
② 肝特異的活性型 Kras 変異と p53 ノックアウトマウス	肝内胆管癌 肝細胞癌	肝内胆管癌だけでなく肝細胞癌も生じることがある。
③ 肝特異的 Sav1 ノックアウトマウス	肝内胆管癌 肝細胞癌	肝内胆管癌だけでなく肝細胞癌も生じることがある。
④ 肝特異的 Notch と細胞内ド メイン過剰発現マウス	肝内胆管癌	発癌まで半年近くを要する。

表 10 現在までに報告されている遺伝子改変マウスを用いた肝内胆管癌自然発生マウスモデル

しかも、ヒト肝内胆管癌の組織学的特徴のひとつである腫瘍部周辺の線維形成⁴⁴が、本マウスモデルの肝腫瘍部周辺に認められたことや、ヒト肝内胆管癌において認められる、*p16* 遺伝子プロモーター領域の高メチル化による *p16* の発現低下^{23,45,46}が、本マウスモデルの腫瘍部に認められることなど、本モデルマウスの腫瘍は **KRAS-MAPK** シグナル経路と **PI3K-AKT** シグナル経路に異常があるヒト肝内胆管癌の性質をよく反映しているものと考えられる。すなわち、このマウスモデルは肝内胆管癌のみを効率的に発生し、癌の発生・進展が速く、しかもヒトの肝内胆管癌の特徴を再現しており、肝内胆管癌の発生・進展メカニズムの解明に役立つと考えられる。また、腫瘍が早期に形成されることから、近年注目されているがん免疫療法⁵³などを行った際により早く治療効果の評価が出来、有用であると考えられる。

AKPP マウスとの比較のために作製した肝特異的活性型 *Kras* 変異 *Pten* ヘテロ欠損マウスは、生後 8 ヶ月以上経過すると肝内胆管癌とともに、肝細胞癌も形成した。興味深いことに、このマウスに発生した肝内胆管癌部では *Pten* の発現が消失していた。さらに、肝特異的に活性型 *Kras* 変異のみを導入したマウスは一部のマウスにしか肝腫瘍が発生しなかったが、生じる腫瘍はすべて肝細胞癌あるいはその前癌病変であった。これらの結果は、本マウスモデルにおける肝内胆管癌の形成に、*Kras* の活性化に加えて *Pten* 不活化による *Pi3k* 経路の活性化が不可欠であることを示唆している。生後約 7-8 週齢の *AKPP* マウスで肝細胞癌病変が認められなかった理由としては、*Kras* 変異と *Pten* の不活化による *Mapk* 経路と *Pi3k* 経路の共活性化が、肝細胞癌よりも胆管癌の発生をより強力に促進することに加え、胆管癌によるマウスの早期の死亡も原因となっている可能性があり、胆管癌によって早期に死亡しなければ肝細胞癌が形成される可能性が十分に考えられる。

近年いくつかの研究グループによって、ヒト肝内胆管癌の網羅的ながんゲノム解析結果が報告された^{24,27,49-52}。これらの研究結果から、ヒトの肝内胆管癌では *TP53* と *KRAS* の 2 つの遺伝子が、それぞれ 38~44%、17~25% と高頻度に変異があることが示された。また、*PI3K* 経路に関わる *PTEN* と *PIK3CA* の遺伝子変異の変異は、それぞれ 1~6%、4~8% と報告されており^{24,51}、しかもこれらの

遺伝子と *KRAS* 変異が共存する腫瘍もそれぞれ 1-3%、1-4%認められた^{24,50-52}。

さらに、103 人の肝内胆管癌患者のサンプルを用いたパスウェイ解析でも、*RAS* と *PI3K* 経路関連遺伝子の異常が高率に認められた²⁴。したがって本研究で作成された肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠損マウスは、*KRAS* 変異と *PI3K* 経路を活性化する変異を有する肝内胆管癌のモデルとして適切なマウスモデルであると考えられる。

現在、肝内胆管癌の起源細胞として、胆管上皮細胞・肝細胞・肝幹細胞の 3 種類が考えられている^{2,35-39}。Komuta らは、ヒト肝内胆管癌がその組織像から 3 つのグループに分類できることを提唱している⁵³。一つ目は、ムチンを産生する癌のみで構成される肝内胆管癌 (pure mucin-producing ICC (Muc-ICC))、二つ目は、大部分が肝細胞様の分化を示す領域とムチンを産生する胆管癌の領域によって占められ、一部に細胆管様領域を認める肝内胆管癌 (predominant mucin-producing ICC with hepatocytic differentiation areas and/or ductular areas in the tumor (mixed-ICC))、そして最後は、肝細胞様に分化する領域と細胆管様領域が優位に存在し、一部にムチンを産生する癌を認める胆管癌 (predominant ductular areas with hepatocytic differentiation areas with muc-producing ICC areas (cholangiolocellular carcinoma; CLC))である⁵³ (表 11)。彼らは、臨床病理と分子学的特徴から、Muc-ICC は胆管上皮細胞由来、Mixed-ICC と CLC は肝前駆細胞

由来であると提唱している⁵⁴。

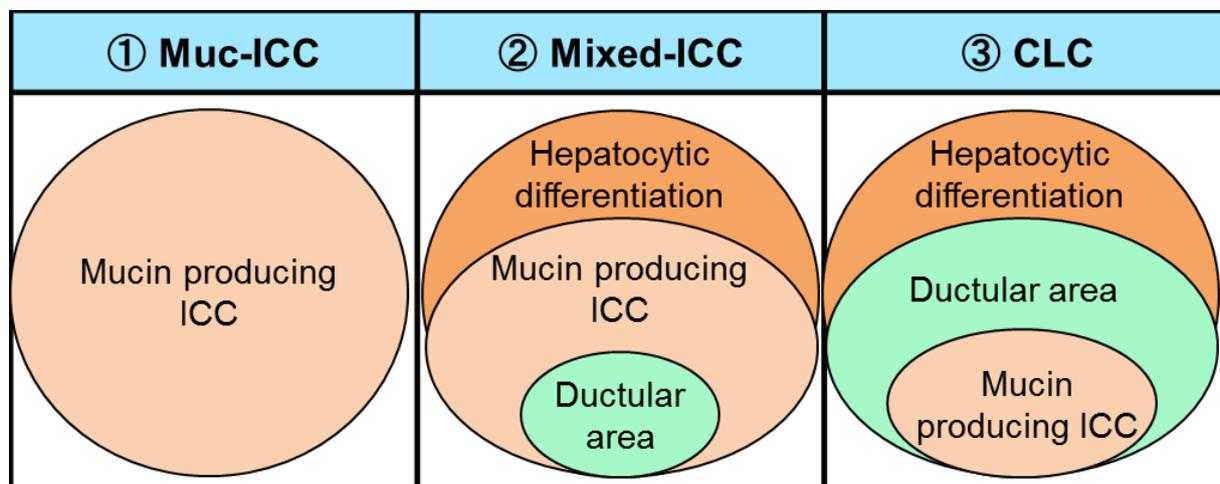


表 11 ヒト肝内胆管癌の分類 (Komuta M, Hepatology, 2012 Fig 1 より改変)

しかし他方ではマウスモデルを用いた実験によって、肝細胞が分化転換することにより肝内胆管癌の起源細胞となり得ることが複数のグループから報告されている^{40,42}。肝特異的に *Kras* 活性化 *Pten* 欠損を導入した *AKPP* マウスでは *Alb-Cre* マウスを使用しているため、肝における遺伝子改変が成熟した肝細胞だけでなく胎生後期の肝幹細胞である肝芽細胞でも起こり得る。我々は *Kras* 活性化 *Pten* 欠損によって発生したマウス肝内胆管癌の起源を明らかにするため、タモキシフェン投与依存的に *Cre* が活性化される遺伝子改変マウスを用いて、生後 10 日でタモキシフェンを投与したマウスには肝内胆管癌のみが発生するが、生後 8 週齢でタモキシフェンを投与したマウスは肝細胞癌のみが生ずることを示した。また *tdTomato/EGFP* を組み込んだ遺伝子改変マウス (*AERmTmG* マウス) を用いて、生後 10 日目と 8 週目にタモキシフェンを投与したマウスの肝臓を

調べたところ、前者では肝細胞だけでなく胆管上皮細胞でも遺伝子改変が起
 っていたのに対し、後者では肝細胞のみで遺伝子改変が起こっていた。このこ
 とは生後 10 日の幼若な胆管上皮細胞または幼若な肝細胞が、このマウス肝内
 胆管癌の起源細胞であることを示唆している。また、*Ck19Cre^{ERT}* マウスを用い
 て成熟した胆管上皮細胞に *Kras* 活性化 *Pten* 欠損を導入したところ、同様に肝
 内胆管癌様病変を生じた (図 26)。このことから、肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠
 損マウスにおける肝内胆管癌起源細胞は胆管上皮細胞または、分化転換を起こ
 した幼若な肝細胞であるであることが示唆された。

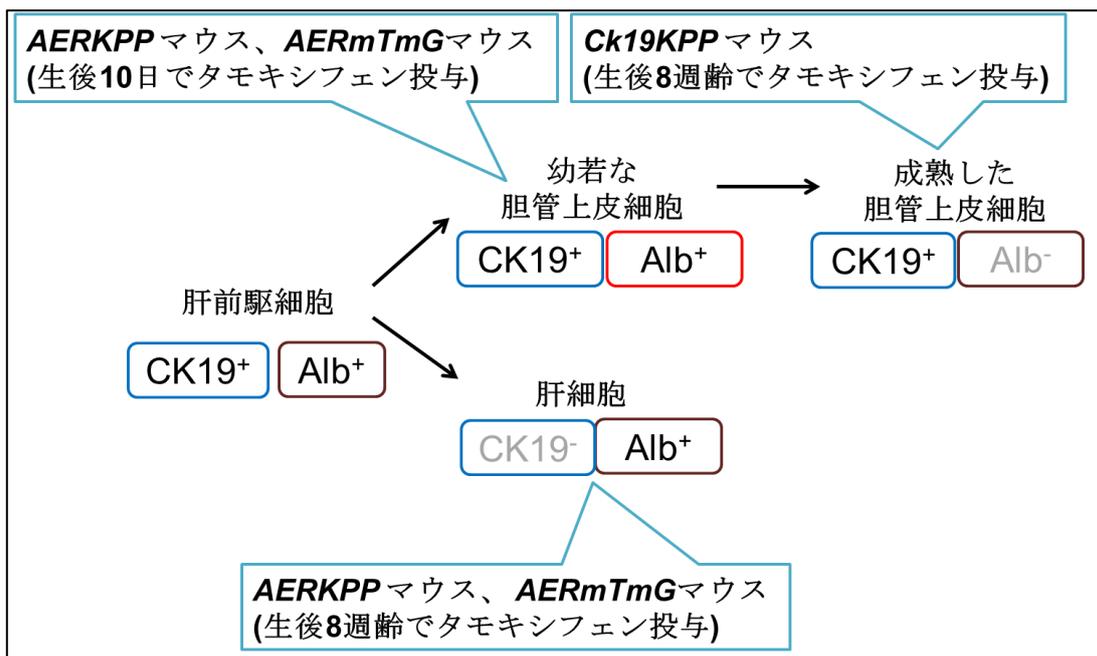


図 26 *AKPP* マウスから予想される Albumin、Ck19 の発現と肝前駆細胞の分化

しかしながら、肝特異的 *Kras* 活性化 *Pten* 欠損マウスにおける肝内胆管癌は、起
 源細胞がヒトの Muc-ICC と同様に胆管上皮細胞由来であるにもかかわらず、

Muc-ICC ほどムチン産生に富んではない。この点は、我々の研究で樹立したマウスモデルは、ヒトの胆管上皮由来肝内胆管癌と完全に一致しているわけではない。この原因としては、*Kras* 変異と *Pten* 欠損が胆管上皮細胞内でのムチン産生を誘導するのに十分ではない可能性や、マウスの胆管上皮細胞がヒトの胆管上皮細胞と比較してムチンの産生性が低い可能性などが考えられる。

本マウスモデルの腫瘍形成における Notch シグナル経路の解析では、*AKPP* マウスにおいてもヒト肝内胆管癌と同様に *Hes1* や *Sox9* など Notch シグナルの標的遺伝子の発現増加を認めたが、これらの遺伝子発現は古典的な Notch 経路に必須な転写因子 *Rbpj* に依存的ではなかった。*Hes1* や *Sox9* には Notch 経路以外の発現調節機序が報告されており⁵⁵⁻⁶¹、本マウスモデルの胆管癌においても、古典的な Notch 経路以外で、*Mapk* 経路に依存的な機序により発現が調節されていることが示唆された (図 27)。

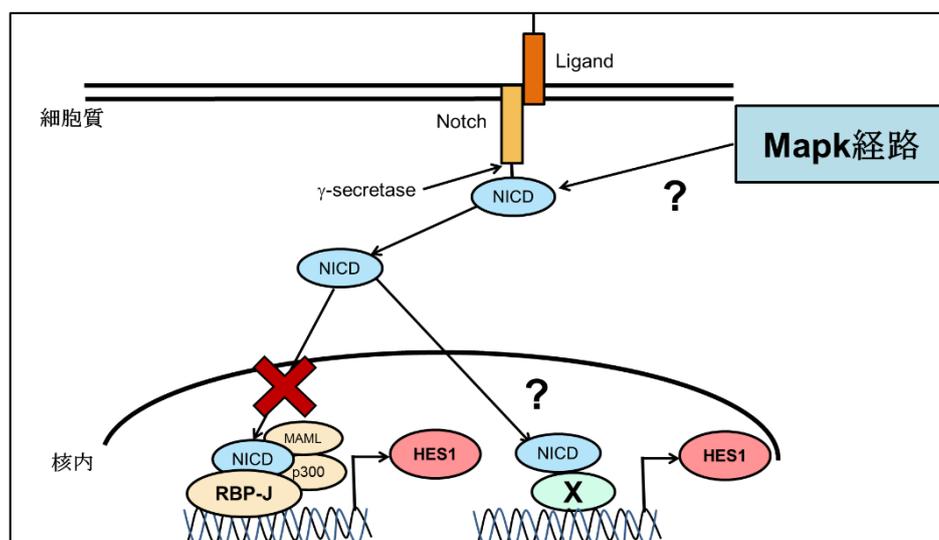


図 27 Mapk 経路と Hes1 の発現調節

本研究の中で Mapk 経路依存的な *Hes1* の発現調節機序を検討したが、*Hes1* の転写開始点から 4.6 kb 上流までのプロモーター領域、イントロン領域、3'-UTR には Mapk 依存的な転写調節領域は存在しなかった。Zanconato らは、*YAP/TAZ* が転写活性化を調節する領域の約 80% は標的遺伝子の転写開始点から 10-100 Kbp 離れた領域に存在していると報告している⁶²。Mapk 経路が *Hes1* 転写活性を調節する領域も今回検討した領域よりもさらに上流に存在する可能性がある。

Notch シグナルは胆管癌の形成のみならず、胆管の発生分化にも重要であることが報告されている^{19,63,64}。*Rbpj* や *Hes1* のノックアウトマウスを用いた研究により、これらの遺伝子の肝内胆管形成における重要性が示されている^{65,66}。本研究において樹立した肝内胆管癌マウスモデルに *Rbpj* あるいは *Hes1* の条件的ノックアウトマウスを交配し、それらの遺伝子の欠損による肝内胆管癌発生抑制効果を検証した。その結果、*Rbpj*、*Hes1* のいずれの欠損によってもマウスの生存期間に有意な延長効果は認めなかったが、腫瘍形成に関しては差異を認めた。*Hes1* 欠損は腫瘍形成にほとんど影響を与えず、このマウスモデルにおいて *Hes1* は胆管癌形成に不可欠ではないことが分かった。一方、*Rbpj* 欠損は肝門部の主要胆管における病変の形成には有意な抑制効果を示さなかったが、肝末梢部の胆管増生を中心とした病変を著明に抑制した。胎生後期から遺伝子改変を生じる *Alb-Cre* マウスを用いた実験と生後にタモキシフェン投与により遺伝子改変

を誘導する *Alb-Cre^{ERT2}* マウスを用いた実験でも同様な結果が得られたことから、*Rbpj* は既存の胆管に生じる腫瘍性変化には必須ではないが、新たな胆管の形成に不可欠であることが示唆された。最近、乳がんやリンパ腫など一部のヒトの癌において *RBPJ* 遺伝子の欠損が認められ、*in vitro* でのアポトーシス抵抗性に寄与しているとの報告がある⁶⁷。本研究では、*Rbpj* の欠損による *in vivo* での胆管癌の発生・進展に対する促進効果は見られなかった。本マウスの肝内胆管がんモデルでは主に *Pi3k-Akt* の活性化によるアポトーシス抵抗性が働いているために、*Rbpj* 欠損によるアポトーシス抵抗性誘導の影響が少なかった可能性がある。

以上をまとめると、肝特異的に *Kras* 活性化と *Pten* 欠損を導入することにより新規肝内胆管癌マウスモデルを樹立することができた。さらに、このマウスに生じる肝内胆管癌は胆管上皮細胞由来であることを明らかにした。また、古典的 *Notch* シグナルに重要な転写因子 *Rbpj* は肝内胆管の新生に必須であり、肝末梢部での発癌に重要だが、*Notch* シグナルのエフェクター分子 *Hes1* は当マウスモデルの胆管癌の発生進展には必ずしも必要ないことが示唆された。今後は、このマウスモデルを用いて、腫瘍で発現が変化している遺伝子の解析や、マウス肝内胆管癌の発生を抑制する分子の同定を通じて、詳細な発がんメカニズムの解明に役立てたい。

謝辞

本論文の作成にあたり懇切なるご指導並びにご鞭撻を承りました東京大学医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野古川洋一教授、池上恒雄准教授に謹んで御礼を申し上げます。

本研究の遂行に当たりましては、以下の先生方にご協力を承りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野 山口貴世志特任講師

東京大学医学部消化器内科 小池和彦教授、立石敬介講師、伊地知秀明講師

自治医科大学病理学講座統合病理学部門 松原大祐准教授

佐々木研究所腫瘍ゲノム学系臨床研究部門 藤井智明先生

朝日生命成人病研究所 引場陽子先生

その他、様々な点でご協力頂いた以下の方々に感謝いたします。

東京大学医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野

野口玲さん、朱赤さん、大杉友之さん、朔あかりさん、畠山晴良さん、山口有子さん、幸保莉香さん、遊佐希さん

引用文献

- 1 Malhi, H. & Gores, G. J. Cholangiocarcinoma: modern advances in understanding a deadly old disease. *J Hepatol* **45**, 856-867, 2006.
- 2 Blechacz, B. R. & Gores, G. J. Cholangiocarcinoma. *Clin Liver Dis* **12**, 131-150, 2008.
- 3 Okuda, K. Past hepatitis studies in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* **17 Suppl**, 2002.
- 4 Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol* **37**, 806-813, 2002.
- 5 Patel, T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* **33**, 1353-1357, 2001.
- 6 Rizvi, S. & Gores, G. J. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. *Gastroenterology* **145**, 1215-1229, 2013.
- 7 がん対策情報センター, 国立がんセンター.
- 8 Sriraksa R, Zeller C, El-Bahrawy MA, Dai W, Daduang J, Jearanaikoon P, Chau-In S, Brown R, Limpiboon T. CpG-island methylation study of liver fluke-related cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* **104**, 1313-1318, 2011.
- 9 Gores, G. J. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. *Hepatology* **37**,

- 961-969, 2003.
- 10 Valle J, Wasan H, Palmer DH, Cunningham D, Anthoney A, Maraveyas A, Madhusudan S, Iveson T, Hughes S, Pereira SP, Roughton M, Bridgewater J; ABC-02 Trial Investigators. Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. *N Engl J Med* **362**, 1273-1281, 2010.
 - 11 Hingorani SR, Picot EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437-450, 2003.
 - 12 Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, Redston MS, DePinho RA. Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* **17**, 3112-3126, 2003.
 - 13 Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, DePinho RA. Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* **20**, 3130-3146, 2006.
 - 14 Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban

- RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* **7**, 469-483, 2005.
- 15 Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, Wright CV, Moses HL. Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev* **20**, 3147-3160, 2006.
- 16 Xu X, Kobayashi S, Qiao W, Li C, Xiao C, Radaeva S, Stiles B, Wang RH, Ohara N, Yoshino T, LeRoith D, Torbenson MS, Gores GJ, Wu H, Gao B, Deng CX. Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *J Clin Invest* **116**, 1843-1852, 2006.
- 17 O'Dell MR, Huang JL, Whitney-Miller CL, Deshpande V, Rothberg P, Grose V, Rossi RM, Zhu AX, Land H, Bardeesy N, Hezel AF. Kras(G12D) and p53 mutation cause primary intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res* **72**, 1557-1567, 2012.
- 18 Lu L, Li Y, Kim SM, Bossuyt W, Liu P, Qiu Q, Wang Y, Halder G, Finegold MJ, Lee JS, Johnson RL. Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1437-

- 1442, 2010.
- 19 Zender S, Nickeleit I, Wuestefeld T, Sørensen I, Dauch D, Bozko P, El-Khatib M, Geffers R, Bektas H, Manns MP, Gossler A, Wilkens L, Plentz R, Zender L, Malek NP. A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. *Cancer Cell* **23**, 784-795, 2013.
- 20 Kobayashi, S., Werneburg, N. W., Bronk, S. F., Kaufmann, S. H. & Gores, G. J. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* **128**, 2054-2065, 2005.
- 21 Ohashi K, Nakajima Y, Kanehiro H, Tsutsumi M, Taki J, Aomatsu Y, Yoshimura A, Ko S, Kin T, Yagura K, Konishi Y, Nakano H. Ki-ras mutations and p53 protein expressions in intrahepatic cholangiocarcinomas: relation to gross tumor morphology. *Gastroenterology* **109**, 1612-1617, 1995.
- 22 Tada, M., Omata, M. & Ohto, M. High incidence of ras gene mutation in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer* **69**, 1115-1118, 1992.
- 23 Tannapfel A, Benicke M, Katalinic A, Uhlmann D, Köckerling F, Hauss J, Wittekind C. Frequency of p16(INK4A) alterations and K-ras mutations in intrahepatic cholangiocarcinoma of the liver. *Gut* **47**, 721-727, 2000.

- 24 Zou S, Li J, Zhou H, Frech C, Jiang X, Chu JS, Zhao X, Li Y, Li Q, Wang H, Hu J, Kong G, Wu M, Ding C, Chen N, Hu H. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun* **5**, 5696, 2014.
- 25 Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* **53**, 549-554, 1988.
- 26 Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* **418**, 934, 2002.
- 27 Fujimoto A, Furuta M, Shiraishi Y, Gotoh K, Kawakami Y, Arihiro K, Nakamura T, Ueno M, Ariizumi S, Nguyen HH, Shigemizu D, Abe T, Boroevich KA, Nakano K, Sasaki A, Kitada R, Maejima K, Yamamoto Y, Tanaka H, Shibuya T, Shibata T, Ojima H, Shimada K, Hayami S, Shigekawa Y, Aikata H, Ohdan H, Marubashi S, Yamada T, Kubo M, Hirano S, Ishikawa O, Yamamoto M, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Tsunoda T, Nakagawa H. Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity. *Nat Commun* **6**, 6120, 2015.
- 28 Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Maad IB, Calderaro

- J, Bioulac-Sage P, Letexier M, Degos F, Clément B, Balabaud C, Chevet E, Laurent A, Couchy G, Letouzé E, Calvo F, Zucman-Rossi J. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **44**, 694-698, 2012.
- 29 Momoi H, Itoh T, Nozaki Y, Arima Y, Okabe H, Satoh S, Toda Y, Sakai E, Nakagawara K, Flemming P, Yamamoto M, Shimahara Y, Yamaoka Y, Fukumoto M. Microsatellite instability and alternative genetic pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol* **35**, 235-244, 2001.
- 30 Tannapfel A, Sommerer F, Benicke M, Katalinic A, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. *Gut* **52**, 706-712, 2003.
- 31 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* **15**, 356-362, 1997.
- 32 Ross JS, Wang K, Gay L, Al-Rohil R, Rand JV, Jones DM, Lee HJ, Sheehan CE, Otto GA, Palmer G, Yelensky R, Lipson D, Morosini D, Hawryluk

- M, Catenacci DV, Miller VA, Churi C, Ali S, Stephens PJ. New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing. *Oncologist* **19**, 235-242, 2014.
- 33 Simbolo M, Fassan M, Ruzzenente A, Mafficini A, Wood LD, Corbo V, Melisi D, Malleo G, Vicentini C, Malpeli G, Antonello D, Sperandio N, Capelli P, Tomezzoli A, Iacono C, Lawlor RT, Bassi C, Hruban RH, Guglielmi A, Tortora G, de Braud F, Scarpa A. Multigene mutational profiling of cholangiocarcinomas identifies actionable molecular subgroups. *Oncotarget* **5**, 2839-2852, 2014.
- 34 Selaru FM, Olaru AV, Kan T, David S, Cheng Y, Mori Y, Yang J, Paun B, Jin Z, Agarwal R, Hamilton JP, Abraham J, Georgiades C, Alvarez H, Vivekanandan P, Yu W, Maitra A, Torbenson M, Thuluvath PJ, Gores GJ, LaRusso NF, Hruban R, Meltzer SJ. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Hepatology* **49**, 1595-1601, 2009.
- 35 Gatto M, Bragazzi MC, Semeraro R, Napoli C, Gentile R, Torrice A, Gaudio E, Alvaro D. Cholangiocarcinoma: update and future perspectives. *Dig Liver Dis* **42**, 253-260, 2010.
- 36 Lee CH, Chang CJ, Lin YJ, Yeh CN, Chen MF, Hsieh SY. Viral hepatitis-

- associated intrahepatic cholangiocarcinoma shares common disease processes with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* **100**, 1765-1770, 2009.
- 37 Roskams, T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* **25**, 3818-3822, 2006.
- 38 Sempoux C, Fan C, Singh P, Obeidat K, Roayaie S, Schwartz M, Fiel MI, Thung SN. Cholangiolocellular carcinoma: an innocent-looking malignant liver tumor mimicking ductular reaction. *Semin Liver Dis* **31**, 104-110, 2011.
- 39 Shaib, Y. H., El-Serag, H. B., Davila, J. A., Morgan, R. & McGlynn, K. A. Risk factors of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a case-control study. *Gastroenterology* **128**, 620-626, 2005.
- 40 Fan B, Malato Y, Calvisi DF, Naqvi S, Razumilava N, Ribback S, Gores GJ, Dombrowski F, Evert M, Chen X, Willenbring H. Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J Clin Invest* **122**, 2911-2915, 2012.
- 41 Guest RV, Boulter L, Kendall TJ, Minnis-Lyons SE, Walker R, Wigmore SJ, Sansom OJ, Forbes SJ. Cell lineage tracing reveals a biliary origin of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res* **74**, 1005-1010, 2014.
- 42 Sekiya, S. & Suzuki, A. Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest* **122**, 3914-3918, 2012.

- 43 Marin, F., Luquet, G., Marie, B. & Medakovic, D. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Curr Top Dev Biol* **80**, 209-276, 2008.
- 44 Sirica, A. E. The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**, 44-54, 2011.
- 45 Caca K, Feisthammel J, Klee K, Tannapfel A, Witzigmann H, Wittekind C, Mössner J, Berr F. Inactivation of the INK4a/ARF locus and p53 in sporadic extrahepatic bile duct cancers and bile tract cancer cell lines. *Int J Cancer* **97**, 481-488, 2002.
- 46 Yoshida S, Todoroki T, Ichikawa Y, Hanai S, Suzuki H, Hori M, Fukao K, Miwa M, Uchida K. Mutations of p16Ink4/CDKN2 and p15Ink4B/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* **55**, 2756-2760, 1995.
- 47 Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L. & Luo, L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* **45**, 593-605, 2007.
- 48 Means, A. L., Xu, Y., Zhao, A., Ray, K. C. & Gu, G. A CK19(CreERT) knockin mouse line allows for conditional DNA recombination in epithelial cells in multiple endodermal organs. *Genesis* **46**, 318-323, 2008.
- 49 Chan-On W, Nairismägi ML, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, Lim KH, McPherson JR, Cutcutache I, Heng HL, Ooi L, Chung A, Chow P, Cheow

- PC, Lee SY, Choo SP, Tan IB, Duda D, Nastase A, Myint SS, Wong BH, Gan A, Rajasegaran V, Ng CC, Nagarajan S, Jusakul A, Zhang S, Vohra P, Yu W, Huang D, Sithithaworn P, Yongvanit P, Wongkham S, Khuntikeo N, Bhudhisawasdi V, Popescu I, Rozen SG, Tan P, Teh BT. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nat Genet* **45**, 1474-1478, 2013.
- 50 Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, Selaru FM, Streppel MM, Lucas DJ, Niknafs N, Guthrie VB, Maitra A, Argani P, Offerhaus GJ, Roa JC, Roberts LR, Gores GJ, Popescu I, Alexandrescu ST, Dima S, Fassan M, Simbolo M, Mafficini A, Capelli P, Lawlor RT, Ruzzenente A, Guglielmi A, Tortora G, de Braud F, Scarpa A, Jarnagin W, Klimstra D, Karchin R, Velculescu VE, Hruban RH, Vogelstein B, Kinzler KW, Papadopoulos N, Wood LD. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Nat Genet* **45**, 1470-1473, 2013.
- 51 Nakamura H, Arai Y, Totoki Y, Shiota T, Elzawahry A, Kato M, Hama N, Hosoda F, Urushidate T, Ohashi S, Hiraoka N, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T. Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat Genet* **47**, 1003-1010, 2015.

- 52 Ong CK, Subimerb C, Pairojkul C, Wongkham S, Cutcutache I, Yu W, McPherson JR, Allen GE, Ng CC, Wong BH, Myint SS, Rajasegaran V, Heng HL, Gan A, Zang ZJ, Wu Y, Wu J, Lee MH, Huang D, Ong P, Chan-on W, Cao Y, Qian CN, Lim KH, Ooi A, Dykema K, Furge K, Kukongviriyapan V, Sripan B, Wongkham C, Yongvanit P, Futreal PA, Bhudhisawasdi V, Rozen S, Tan P, Teh BT. Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Nat Genet* **44**, 690-693, 2012.
- 53 McNutt M. Cancer Immunotherapy. *Science* **342**, 1417, 2013.
- 54 Komuta M, Govaere O, Vandecaveye V, Akiba J, Van Steenberghe W, Verslype C, Laleman W, Pirenne J, Aerts R, Yano H, Nevens F, Topal B, Roskams T. Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes. *Hepatology* **55**, 1876-1888, 2012.
- 55 Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, Clevers H, Jay P. SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol* **166**, 37-47, 2004.
- 56 Curry, C. L., Reed, L. L., Nickoloff, B. J., Miele, L. & Foreman, K. E. Notch-independent regulation of Hes-1 expression by c-Jun N-terminal kinase signaling in human endothelial cells. *Lab Invest* **86**, 842-852, 2006.

- 57 Ingram, W. J., McCue, K. I., Tran, T. H., Hallahan, A. R. & Wainwright, B. J. Sonic Hedgehog regulates Hes1 through a novel mechanism that is independent of canonical Notch pathway signalling. *Oncogene* **27**, 1489-1500, 2008.
- 58 Sanalkumar R, Indulekha CL, Divya TS, Divya MS, Anto RJ, Vinod B, Vidyanand S, Jagatha B, Venugopal S, James J. ATF2 maintains a subset of neural progenitors through CBF1/Notch independent Hes-1 expression and synergistically activates the expression of Hes-1 in Notch-dependent neural progenitors. *J Neurochem* **113**, 807-818, 2010.
- 59 Sato T, Shimazaki T, Naka H, Fukami S, Satoh Y, Okano H, Lax I, Schlessinger J, Gotoh N. FRS2alpha regulates Erk levels to control a self-renewal target Hes1 and proliferation of FGF-responsive neural stem/progenitor cells. *Stem Cells* **28**, 1661-1673, 2010.
- 60 Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, Scherer G, Sander M. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1865-1870, 2007.
- 61 Stockhausen, M. T., Sjolund, J. & Axelson, H. Regulation of the Notch target gene Hes-1 by TGFalpha induced Ras/MAPK signaling in human neuroblastoma cells. *Exp Cell Res* **310**, 218-228, 2005.

- 62 Zanconato F, Forcato M, Battilana G, Azzolin L, Quaranta E, Bodega B, Rosato A, Bicciato S, Cordenonsi M, Piccolo S. Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat Cell Biol* **17**, 1218-1227, 2015.
- 63 Sparks, E. E., Perrien, D. S., Huppert, K. A., Peterson, T. E. & Huppert, S. S. Defects in hepatic Notch signaling result in disruption of the communicating intrahepatic bile duct network in mice. *Dis Model Mech* **4**, 359-367, 2011.
- 64 Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, Stanger BZ. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* **136**, 1727-1739, 2009.
- 65 Geisler, F. & Strazzabosco, M. Emerging roles of Notch signaling in liver disease. *Hepatology* **61**, 382-392, 2015.
- 66 Kodama, Y., Hijikata, M., Kageyama, R., Shimotohno, K. & Chiba, T. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* **127**, 1775-1786, 2004.
- 67 Kulic I, Robertson G, Chang L, Baker JH, Lockwood WW, Mok W, Fuller M, Fournier M, Wong N, Chou V, Robinson MD, Chun HJ, Gilks B, Kempkes B, Thomson TA, Hirst M, Minchinton AI, Lam WL, Jones S, Marra M, Karsan A.

Loss of the Notch effector RBPJ promotes tumorigenesis. *J Exp Med* **212**, 37-52, 2015.