

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 寺門(千野) 侑美

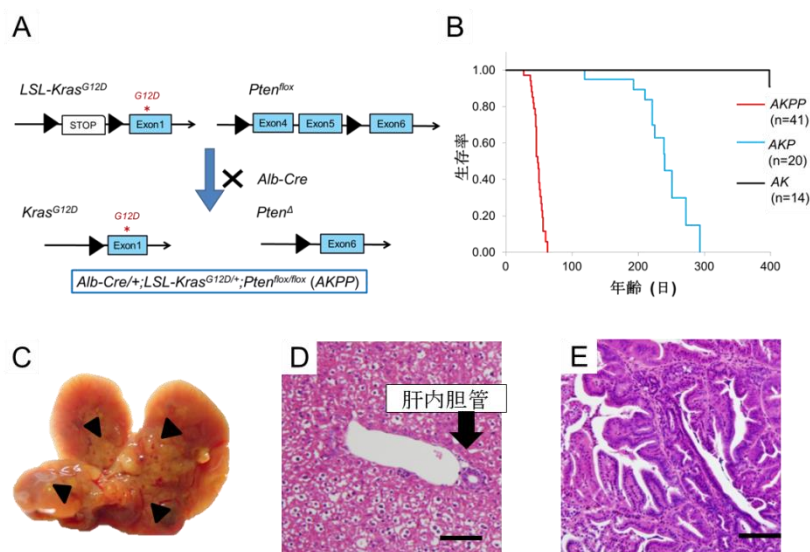
要旨

肝内胆管癌は、原発性肝癌の中では約 10-15%を占め、肝細胞癌に次いで多い。根治的治療は外科的切除によるが、切除可能な場合においても 5 年生存率は約 30%と予後不良である。切除が不可能な場合は、標準治療としてシスプラチンとゲムシタビンの併用による化学療法が行われるが、予後改善効果は十分とは言えず、より効果のある肝内胆管癌の新規治療薬開発が望まれる。

新規治療法や予防法を開発するためには、肝内胆管癌の発生・進展メカニズムの解明とともに、ヒト肝内胆管癌を反映するマウスモデルの樹立が必要である。これまでに、4 種類の肝内胆管癌マウスモデルの報告があるが、腫瘍を形成するまでに約半年と時間を要することや、形成される腫瘍が肝内胆管癌に限らないという問題点があり、肝内胆管癌のみを早期に発症する遺伝子改変マウスモデルの樹立が望まれていた。

そこで、新規肝内胆管癌マウスモデル樹立のため、ヒト肝内胆管癌で重要性が示唆されている MAPK 経路と PI3K 経路、二つのシグナルに注目し、マウス肝特異的活性化型 *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した、*Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flx/flx}* (*AKPP*) マウスを作製した (図 1A)。*Pten* をヘテロでノックアウトした *Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flx/+}* (*AKP*) マウスと、*Kras* 変異のみの *Alb-Cre⁺; LSL-Kras^{G12D/+}* (*AK*) マウスと比較したところ、*AKPP* マウスは早期に死亡し、平均寿命はわずか 46 日であった (図 1B)。生後 8 週齢の *AKPP* マウスの肝臓の肉眼的所見では、肝門部を中心とした硬いびまん性腫瘍病変を認めた (図 1C)。組織学的検討を行ったところ、*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 1D)が、生後 7~8 週齢においては、肝門部腫瘍周辺に高度な線維化を伴う、ヒト肝内胆管癌

に類似した腫瘍性病変を認めた (図 1E)。しかし、興味深いことに肝細胞癌様の



腫瘍性病変、多臓器への転移や浸潤は全く見られなかった。

図 1 *AKPP* マウスの生存曲線と肝組織の肉眼的・組織学的所見

AKPP マウスの肝臓内腫瘍細胞の性質を明らかにするため、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ところ、肝腫瘍部は pan-Ckと Ck19 が陽性で、Hnf4 α は陰性であった。これらの結果から、腫瘍を形成している細胞は胆管上皮細胞の性質を持つことが明らかとなった。また、この腫瘍部ではヒトの肝内胆管癌で高率にみられる、*p16* の発現低下と *p16* 遺伝子プロモーター領域の高メチル化が認められた。

また、現在までに肝内胆管癌起源細胞として、複数の細胞が候補として提唱されている。本 *AKPP* マウスモデルにおける肝内胆管癌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モデルを作製した。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、*Alb-Cre^{ERT2/+};LSL-Kras^{G12D/+};Pten^{flx/flx}* (*AERKPP*)マウスを作製し、生後 8 週齢 (Exp1)と生後 10 日 (Exp2)の二つの条件でタモキシフェンを投与した (図 2A)。生後 8 週齢の *AERKPP* マウスにタモキシフェンを投与すると、投与後 3 ヶ月で肝臓内に多数の腫瘍が形成された (図 2B)。組織学的検討を行ったところ、腫瘍は肝細胞癌またはその前癌病変であった (図 2C)。幼若な肝細胞が起源細胞になるかどうかを検討するため、生後 10 日の *AERKPP* マウスにタモキシフェンを投与したところ、投与後約 2 ヶ月で死亡し、肝臓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 2D)。組織学的検討を行ったところ、肝内胆管癌を形成したが、肝細胞癌様の病変は全く認

めず、*AKPP* マウスの表現型に類似していた (図 2E)。

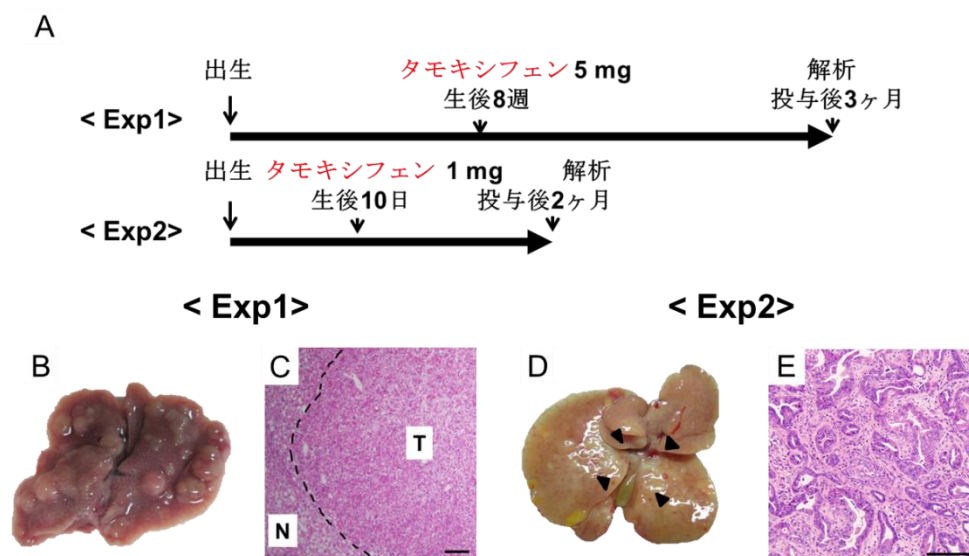


図 2 *AERKPP* マウスを用いた肝内胆管癌起源細胞の検討

以上の結果から、マウスの週齢依存的に異なった種類の細胞で Cre 依存的遺伝子組み換えが起こった可能性を考慮し、*Alb-Cre^{ERT/2+}; R26R^{mTmG/+}* マウス (*AERmTmG*) を作製した。生後 8 週齢と生後 10 日の二つの条件で遺伝子組み換えが起こる細胞を検討したところ、生後 8 週齢の *AERmTmG* マウスは、遺伝子組み換えが起こる細胞は肝細胞のみであったのに対し、生後 10 日のマウスでは、肝細胞だけでなく胆管上皮細胞でも遺伝子組み換えが起こっていた。この結果は、*AERKPP* マウスにおける肝内胆管癌は肝細胞由来ではなく、胆管上皮細胞由来の可能性が高いことを示している。さらに、胆管上皮特異的に遺伝子改変の起こる *Ck19Cre^{ERT/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; Pten^{flx/flx}* (*Ck19KPP*) マウスを作製し、肝臓における病理組織学的検討を行った。その結果、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が、肝細胞癌様の病変は全く見られなかった。これらの結果より、活性型 *Kras* 変異と *Pten* ホモ欠損による肝内胆管癌は、胆管上皮細胞由来であることが示唆された。

近年 Notch シグナルの胆管癌発症における重要性と治療標的としての可能性が注目されている。そこで私は、本肝内胆管癌マウスモデルの腫瘍における Notch シグナルの関与を検討した。Notch シグナルに必要な転写因子である *Rbpj* の発現と、下流の重要なエフェクター遺伝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評価したところ、いずれの分子も陽性であった。Ras-Mapk シグナル経路と Pi3k-Akt 経路による、*Hes1* 及び *Sox9* の発現の調節機序に

ついて検討しところ、Ras-Mapk シグナル経路阻害により、Hes1、Sox9 の発現はタンパク質レベル、mRNA レベルでともに抑制されたが、Pi3k-Akt 経路阻害では、Hes1、Sox9 の発現はタンパク質レベルでともに抑制されたが、Hes1 の mRNA レベルは変化がなかった。すなわち Pi3k-Akt 経路による Hes1 の発現制御には転写は関与しないことが示唆された。Mapk 経路による Hes1 の mRNA 発現調節機構の同定のため、Hes1 のプロモーター、イントロン、3'UTR の Mapk 経路依存転写調節領域の同定を試みたが、特定には至らなかった。

AKPP マウスの肝内胆管癌発生における Hes1 の役割を *in vivo* で検討するため、Hes1 の条件的ノックアウトマウス ($Hes1^{flox/flox}$) と AKPP マウスを交配した $Alb-Cre^+$; $LSL-Kras^{G12D/+}$; $Pten^{flox/flox}$; $Hes1^{flox/flox}$ (AKPPHH) マウスを作製した。AKPPHH マウスは、AKPP マウスと同様に肝門部で肝内胆管癌様病変を形成していたことから、Hes1 はこのマウスの腫瘍形成において不可欠ではないことが示唆された。

AKPP マウスの肝内胆管癌発生における Rbpj の役割を *in vivo* で検討するため、Rbpj の条件的ノックアウト ($Rbpj^{flox/flox}$) と AKPP マウスを交配した $Alb-Cre^+$; $LSL-Kras^{G12D/+}$; $Pten^{flox/flox}$; $Rbpj^{flox/flox}$ (AKPPRR) マウスを作製した。生後 5 週齢において、AKPPRR マウスの肝門部に肝内胆管癌前癌病変と考えられる症状を認めた。一方、末梢部では肝門部で見られたような胆管の変化は見られず、胆管の著明な減少を認めた。このことから Rbpj は胆管形成自体に必須であることが示唆された。

本研究により、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。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が示唆された。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、同シグナルのエフェクター分子 Hes1 は、このマウス胆管癌の発生・進展には関与しないことが示唆された。MAPK 経路や PI3K 経路の異常を認めるヒト肝内胆管癌は少なくない。今後このマウスモデルが、ヒト肝内胆管癌の治療標的分子の同定や、治療薬の前臨床試験に利用されることを期待している。