

新規肝外胆管癌マウスモデルを用いた分子発生機序解明

東京大学医学部附属病院消化器内科

中川 勇人

1. はじめに

胆管癌は発生部位から肝内胆管癌・肝外胆管癌に分類され、いずれも切除以外に有効な治療法がないため新規治療・予防法の開発が急務である。危険因子として原発性硬化性胆管炎（PSC）・膵胆管合流異常症・肝吸虫症などが知られ、発症基盤に慢性炎症の存在が示唆されているが、その発癌機構は不明な点が多い。

発癌の分子機序解明には動物モデルが有力なツールとなり、最近肝内胆管癌においては遺伝子改変や発癌剤を用いたマウスモデルによって、その病態が徐々に明らかとなってきた。注目すべきは、レポーターマウスを用いた細胞系譜の追跡により、胆管上皮だけでなく肝細胞が胆管癌起源細胞となりうる（特に慢性肝障害時において）ことが明らかとなった点である¹。癌の起源が異なれば発症機序や生物学的特性が異なる可能性があり、これはきわめて重要な所見である。

一方、肝外胆管は肝内胆管と発生学的に由来が異なり、その生物学的特性も異なる可能性がある。最近ヒトおよびマウス胆管の組織学的な検討から、胆管周囲付属腺に胆管前駆細胞が存在し、肝外胆管癌の起源細胞となり得るとの説が提唱され注目されている。しかしながら肝外胆管癌には適切な動物モデルがないため、発症機序や起源細胞についてエビデンスレベルの高い研究はほとんどない。そこで本研究では申請者が最近樹立した新規肝外胆管癌発症システムを用いて、その分子発生機序および起源細胞解明を試みる。

2. 方法と結果

2.1 肝外胆管癌マウスモデルの樹立

最近の次世代シーケンサーによる解析で、ヒト肝内胆管癌・肝外胆管癌いずれも Ras 経路および TGF/Smad 経路の遺伝子異常が高頻度に存在することが明らかとなった。そこで新たな胆管癌モデルを樹立すべく、タモキシフェン依存的に K19 陽性細胞で Cre を発現する K19-Cre^{ERT} マウスと、LSL-Kras^{G12D} マウス・Tgfbr2^{F/F} マウスを交配させ、胆管上皮全体で Kras 活性化・TGFβR2 欠損を誘導するマウス (KT-K19Cre^{ERT}) を作製した。しかし同マウスは肝外胆管上皮の軽度過形成を生じるのみで、胆管癌は発症しなかった。そこでさらなる発癌促進因子が必要と考え、申請者は以前肝臓において接着因子 E-cadherin (CDH1) を欠損させると肝発癌が有意に促進することを見出していたことから²、KT-K19Cre^{ERT} に CDH1^{F/F} マウスを交配させたマウス (KTC-K19Cre^{ERT}) を作製した。すると驚くべきことにタモキシフェン投与わずか 4 週で肝外胆管全長に渡り這うように進展する胆管癌を発症した。組織学的には胆管壁に沿って進展する、いわゆる“胆管壁浸潤型胆管癌”の像を呈しており、リンパ管への浸潤が高頻度にみられ、所属リンパ節への転移も認められた。またヒト胆管癌と同様に、間質の線維化や線維芽細胞活性化、炎症細胞浸潤を伴っており、ヒト胆管癌の周囲微小環境も模倣していると考えられた。

2.2 肝外胆管癌の発癌過程

胆管上皮幹細胞および癌起源細胞の存在部位はまだ明らかとなっていないが、最近、胆管上皮でネットワークを形成する胆管周囲付属腺 (peribiliary gland; PBG) 内に前駆細胞が存在し、癌の起源細胞ともなり得るとの説が提唱され注目されている。しかし明確なエビデンスはない。そこで申請者は本マウスの発癌過

程を詳細に解析した。すると興味深いことに、タモキシフェン投与1週間後から、胆管表層上皮細胞がポロポロと胆管内腔に脱落し、胆管周囲に強い炎症反応が起こっていた。E-cadherin 免疫染色および LacZ レポーターマウスとの交配により遺伝子改変細胞の細胞系譜を追跡すると、胆管表層では遺伝子改変細胞が E-cadherin 欠損に伴い脱落し、正常細胞に置き換わっていく（修復される）一方で、胆管付属腺内では遺伝子改変細胞が生存しつづけることがわかった。さらに胆管付属腺では、胆管障害に対する修復反応として強い増殖反応が起き、次第に胆管付属腺が異型性をもって増大していく様子が観察された。これらの結果から、E-cadherin 欠損により胆管内腔の上皮細胞が剥がれ死に、そこから放出される alarmin を起点として代償性の炎症・再生反応が生じ、結果として胆管付属腺からの発癌を促進しているのではないかと仮説を立てた。実際に PSC や肝内結石症患者では、胆管付属腺の増生や付属腺内の Kras 変異も報告されている^{3, 4}。よってこのモデルは慢性胆管障害からの発癌過程をよく模倣しており、機序解明に重要な示唆を与えると考えられた。また一方で、KC-K19Cre^{ERT} マウスや TC-K19Cre^{ERT} マウスも作製してタモキシフェン投与後の組織像を解析したが、いずれも胆管癌の発生は認められず、肝外胆管癌発症には Kras, TGFβR2, E-cadherin すべての変異が必要であった。

2.3 胆管オルガノイドを用いた解析

マウス肝外胆管からオルガノイド培養法を確立し、Cre 陰性 LSL-Kras^{G12D};Tgfbr2^{F/F}; CDH1^{F/F} マウス (KTC マウス) からオルガノイドを作製、Cre 発現レンチウイルスで遺伝子変異を導入したところ、興味深いことに、胆管上皮細胞が脱落していく現象がオルガノイドでも再現された。次いでこのオルガノイドを免疫不全マウスの皮下に移植することによって、in vivo 同様の腺癌を形成することにも成功した。すなわち胆管オルガノイドは、in vivo で胆管上皮内に起きている変化を周囲の環境と切り離して解析できる有力なツールになり得ると考えられた。また KTC マウス以外の遺伝子改変の組み合わせのマウス (KT マウス、TC マウス、KC マウス、K マウス、T マウス、C マウス) から胆管オルガノイドを培養したところ、やはり E-cadherin が欠損した場合のみ胆管上皮細胞が脱落していく現象が確認され、E-cadherin 欠失が胆管上皮脱落の真の原因であることが明らかとなった。さらにこれらのオルガノイドも免疫不全マウスに皮下移植してみたところ、TC マウス由来オルガノイドが 2/12 で腫瘍を形成したが、それ以外はすべて腫瘍形成に至らなかったことから、オルガノイド由来腺癌モデルにおいても、やはりこの3つの遺伝子が協調的に発癌を促進していることがわかった。

2.4 肝外胆管癌進展における IL-33 の関与

KTC マウス由来オルガノイドを用いて cDNA マイクロアレイを行ったところ、3つの遺伝子改変によって炎症性サイトカイン IL-33 の発現が著明に上昇していることが分かった。IL-33 は、2型自然リンパ球やマスト細胞、制御性 T 細胞などの血球系細胞に作用し、組織修復に寄与すると考えられていると同時に、死細胞が放出する”alarmin”としても注目されている⁵。そこでこの死んだ胆管上皮から放出される alarmin として IL-33 に着目して検討を行った。KTC-K19Cre^{ERT} マウスの胆管では IL-33 mRNA の発現が亢進しており、免疫染色を行うと E-cadherin が欠失し胆管上皮が破綻しているところに特に強く発現していた。また血液中や胆汁中の IL-33 濃度の上昇も見られた。さらに KTC-K19Cre^{ERT} マウスの肝臓組織を用いてフローサイトメトリーを行ったところ、2型自然リンパ球の浸潤が有意に増加しており、下流のサイトカインである IL-5, IL-13, amphiregulin などの発現も有意に上昇していることが分かった。KTC マウス由来オルガノイドから細胞株を樹立し、細胞上清中の IL-33 を ELISA にて測定したところ、通常培養条件ではほとんど分泌されていなかったが、凍結融解を反復することによってネクロシスを誘導すると多量の IL-33 が検出されたことから、やはり IL-33 は細胞死が起きることによって細胞外に放出されることが明らかとなった。

次いで KTC-K19Cre^{ERT} マウスに IL-33 の中和抗体を投与する実験を行った。すると IL-13, amphiregulin の発現低下とともに、胆管付属腺の増殖反応は有意に低下し、結果として肝外胆管癌の進展が抑制された。また、仮に E-cadherin 欠失によって剥がれ死ぬ胆管上皮細胞から放出される IL-33 が胆管癌発症に重要な

役割を果たしているとするならば、E-cadherin ノックアウトは外的に IL-33 を投与することで代用できるのではないかと考えた。そこで E-cadherin がノックアウトされていない KT-K19Cre^{ERT} マウスにタモキシフェンを投与した後、IL-33 を 3 日間連続投与したところ、4 週間後には肝外胆管から肝門部まで著明な腫瘍性変化を誘導することができた。すなわち、IL-33 は Kras や TGFβ2 の変異と協調的に胆管癌を促進する作用を持つことが分かった。

3. まとめ

- ① マウス胆管上皮特異的に Kras, TGFβ2, E-cadherin の 3 つの遺伝子変異を誘導することで、胆管壁浸潤型肝外胆管癌を誘導することに成功した。
- ② 本マウスモデルの発癌過程には E-cadherin 欠失による胆管上皮障害とそれに続く再生反応が発癌のドライバーになっており、最近胆管の stem cell niche として注目されている胆管付属腺が癌起源細胞となっている可能性が示唆された。
- ③ マウス胆管からオルガノイドを培養し、in vivo 同様の現象を ex vivo で再現することに成功し、それをを用いた検討から発癌促進候補分子として IL-33 を同定した。
- ④ IL-33 は死んだ胆管上皮細胞から分泌され、2 型自然リンパ球などを介して胆管再生を促し、結果として発癌を促進していることが分かった。

謝辞

本研究は、アステラス病態代謝研究会研究助成の援助を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

4. 参考文献

1. Li J, Razumilava N, Gores GJ, et al. Biliary repair and carcinogenesis are mediated by IL-33-dependent cholangiocyte proliferation. *J Clin Invest* 2014;124:3241-51.
2. Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, et al. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:1090-5.
3. Carpino G, Cardinale V, Renzi A, et al. Activation of biliary tree stem cells within peribiliary glands in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2015;63:1220-8.
4. Hsu M, Sasaki M, Igarashi S, et al. KRAS and GNAS mutations and p53 overexpression in biliary intraepithelial neoplasia and intrahepatic cholangiocarcinomas. *Cancer* 2013;119:1669-74.
5. Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity* 2015;42:1005-19.