

主論文の要旨

**Trefoil factor family 2 inhibits cholangiocarcinogenesis
by regulating the PTEN pathway in mice**

〔 TFF2 は PTEN 経路の活性化を介して
胆管癌発生を抑制する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：江畑 智希 教授)

長谷部 圭史

【緒言】

胆管癌は肝原発悪性腫瘍のうち 2 番目に頻度の高い疾患であり、世界的にも癌関連死亡の原因の約 3%を占めている。その予後は不良であり、診断後の平均生存期間は 2 年未満とされている。遠隔転移がなく手術で切除し得た胆管癌でもその 5 年生存率は 20–40%にとどまっております、また化学療法の効果も限定的である。胆管癌に代表的な遺伝子異常としては癌抑制遺伝子である PTEN 遺伝子の異常が指摘されているが、その詳細は未だ明らかではない。胆管癌の発癌メカニズムの解明および新規胆管癌治療薬の開発は喫緊の課題である。

【対象および方法】

名古屋大学医学部附属病院において肝切除を施行されたヒト胆管癌の標本 23 例、28 領域を評価した。組織学的な内訳は高分化癌・乳頭癌が 6 例、中分化癌が 16 例、低分化癌・硬癌が 6 例であった。また肝発癌マウスモデルとして、遺伝子改変肝特異的活性化型 KRAS ノックインマウス (Alb-Cre/LSL-KRAS^{G12D}; KC) と TFF2 遺伝子ノックアウトマウス (TFF2KO) を用いた。両マウスを交配し KC/TFF2KO マウスを作成し、その肝臓および胆管を評価した。ヒトおよびマウスの組織標本は HE 染色および免疫染色にて評価した。

また、ヒト胆管癌培養細胞株である HuCCT1 に対して、TFF2 過剰発現プラスミドベクターを用いて TFF2 の発現を導入し、TFF2 の胆管癌細胞に対する影響を評価した。ベクター導入の方法は *electroporation* と *lipofection* を用いた。細胞は免疫染色、ウェスタンブロット法、*real time PCR*、WST-1 アッセイ、細胞浸潤アッセイ (Boyden-chamber assay)、細胞遊走アッセイ (Scratch assay)、アポトーシスアッセイ (MuseTM Annexin V & Dead Cell Kit) を用いて評価した。結果はすべて SPSS を用いて解析した。

【結果】

ヒト胆管癌標本を用いて、腫瘍細胞の TFF2 発現を免疫染色で評価した。発現の強さから、*negative*、*weak*、*strong* の 3 段階に分類した。結果、胆管癌の前癌病変である BilIN (Biliary Intraepithelial Neoplasm) や胆管癌の一部に TFF2 の発現を認めた (Fig. 1A, B)。胆管癌においては特に高分化癌において TFF2 の発現が多くみられた (Fig. 1C)。これらの結果から、TFF2 は胆管癌発癌過程に関与していることが示唆された。

次に培養胆管癌細胞 HuCCT1 での TFF2 強制発現の効果を検討した。*electroporation* を用いて発現導入した細胞では、細胞免疫染色により濃度依存的な TFF2 陽性細胞の増加を確認した (Fig. 2AB)、また TFF2 による細胞増殖能の低下が認められた (Fig. 2C)。*Lipofection* を用いて発現導入した細胞では、*real time PCR* とウェスタンブロット法により濃度依存的な TFF2 の発現増加を確認し (Fig. 2D, E)、また TFF2 によるアポトーシスの増加が認められた (Fig. 2F, G)。また細胞浸潤アッセイでは TFF2 による浸潤能の低下を示し、細胞遊走アッセイでは遊走能も低下を示した (Fig. 3)。これらの結果は、TFF2 は胆管癌細胞の増殖・浸潤を抑制し、細胞死を誘導することを示している。

また PTEN シグナル伝達経路が胆管癌において重要な役割を果たすことを考慮し、TFF2 と PTEN の関係についてウエスタンブロット法を用いて検討した (Fig. 4)。結果、PTEN の発現は TFF2 プラスミド導入群と対照群の間で変化を認めなかったが、不活性化型である pPTEN は TFF2 プラスミド導入群で容量依存的に低下を示し、相対的に PTEN が活性化されていると考えられた。また PTEN シグナル伝達経路の下流にある AKT のリン酸化を評価したところ、対照群と比較し TFF2 導入群において、AKT の活性化型である pAKT の減少を示し、AKT も TFF2 によって抑制されることが示唆された。これらの結果は、TFF2 は癌抑制因子である PTEN を活性化することで癌抑制作用を發揮していることを示唆している。

次に、12 か月齢の KC および KC/TFF2KO から肝臓と胆管を採取し、これを組織学的に評価した。結果、KC/TFF2KO マウスでは肝門部胆管に BilIN の発生を 12 例中 11 例と高頻度に認めた (Fig. 5A, B)。これらは KRAS 活性化を背景とした TFF2 の欠損が肝門部胆管に前癌病変を引き起こすことを示唆している。また免疫染色法で評価したところ、正常胆管上皮細胞では全例に PTEN の発現が認められるのに対して、KC/TFF2KO マウスに発生した BilIN においては PTEN の発現は 13 例中 2 例しか認められなかった (Fig. 5C, D)。これは TFF2 の欠損が PTEN 発現の低下を介して BilIN の発生につながったことを示唆している。さらに KC/TFF2KO マウスの一部では BilIN の発生に加え、その近傍から腫瘍の発生も認めた (Fig.6)。腫瘍細胞は CK19 陽性、AFP 陰性であり、胆管癌として矛盾しない形質を示した。また PTEN は陰性であった。これらの結果は、TFF2 は BilIN および胆管癌の発生を抑制する作用を持つことを示唆している。

【考察】

今回我々は胆管上皮の癌化過程に TFF2 の発現が関与していることを明らかとし、かつ TFF2 は PTEN シグナル経路の抑制を介して、胆管癌に対して腫瘍抑制因子として機能していることを見出した。

これまでの報告で、PTEN と胆管癌の関係は遺伝子改変マウスを用いて明確に示されている。これは PTEN 欠損マウスに胆管癌が発生する事から明らかとされた現象であるが、一方で胆管癌における PTEN 遺伝子の変異は頻度としては低く、実際に PTEN 経路の異常が胆管癌発生に寄与する機序については明らかにされていない。しかしながら PTEN の作用は遺伝子そのものの異常のみならず、転写後の修飾によっても制御されることが明らかとなりつつある。その点では、今回の研究で BilIN および胆管癌が発生した KC/TFF2KO マウスでは理論的には PTEN 遺伝子は正常であり、TFF2 による PTEN 経路への干渉は転写後修飾によるものと考えられる。実際、PTEN のリン酸化は *in vitro* での TFF2 発現と関連しており、今後は TFF2 による PTEN 修飾の詳細なメカニズムを明らかにすることが求められる。

今後の展望

胆管癌に対する治療は外科的切除が唯一の根治的治療法だが、発見された時点で転移が見つかって切除できないことも多いのが現状で、化学療法も効果が限定されている。今後 TFF2 の抗癌作用を利用する新たな治療法も期待される。

【結語】

TFF2 は胆管癌に対して、抗腫瘍効果を呈する可能性が示唆された。