

令和元年6月22日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06805

研究課題名(和文) 膵前癌病変PanINと膵癌におけるクロマチンリモデリング因子BRG1の役割の探索

研究課題名(英文) Investigation of the role of BRG1 in acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis

研究代表者

津田 喬之(Tsuda, Motoyuki)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：30802764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体の中心分子であるBRG1が前癌病変PanINを介した膵発癌過程においてどのような役割を果たすかの検討を行った。膵腺房細胞特異的にBRG1を欠失させるマウスを用い、Brg1の欠失によりPanINが著明に減少することを見出した。また、BRG1はSOX9の発現を直接調節しており、SOX9の強制発現により「BRG1の欠失によるPanINの減少」が見られなくなることを示した。さらに、新規マウスモデルを用いてPanINの維持にもBRG1が必要であることを証明した。このBRG1とSOX9の相関関係はヒト膵癌においても認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は最難治癌であり、新規治療標的の探索が望まれている。BRG1は膵癌の14%で変異を認めるSWI/SNF複合体の中心分子で、膵癌の10%程度で発現消失している。我々は以前にBRG1の欠失により膵管細胞から予後良好な前癌病変IPMNが形成され膵癌に至ることを報告したが、膵癌の大多数を占め、より予後不良な膵癌に至るPanINにおけるBRG1の役割は不明であった。本研究により、IPMNとは逆に、より予後不良な膵癌に至るPanINの形成・維持においてBRG1が必要であることが明らかになり、今後膵癌におけるBRG1やSOX9をターゲットとした創薬の検討につながる重要な結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：BRG1, a core subunit of SWI/SNF chromatin remodeling complex, is silenced in approximately 10% of human pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA). We previously showed that BRG1 inhibits the formation of intraductal pancreatic mucinous neoplasm (IPMN) and that IPMN-derived PDA originated from ductal cells. However, the role of BRG1 in pancreatic intraepithelial neoplasia-derived (PanIN-derived) PDA that originated from acinar cells remains elusive. Here, we found that exclusive elimination of Brg1 in acinar cells impaired the formation of PanIN in mice. Brg1 directly regulated SOX9 expression and SOX9 overexpression canceled this PanIN-attenuated phenotype. Furthermore, Brg1 deletion in established PanIN resulted in regression of PanIN in mice. Finally, BRG1 expression correlated with SOX9 expression in human PDA. In summary, BRG1 is critical for PanIN initiation and progression through positive regulation of SOX9. Thus, the BRG1/SOX9 axis is a potential target for PanIN-derived PDA.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 エピジェネティクス SWI/SNF BRG1

1. 研究開始当初の背景

SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体は、膵癌の 14%程度に不活化変異が認められ、その進展に重要な役割を持っていると考えられる。SWI/SNF 複合体の中心的分子である BRG1 はヒト膵癌の 10%程度で発現が消失しているとされ、我々はこれまで BRG1 に注目し研究を行ってきた。マウスモデルを用い膵上皮特異的に *Kras* 変異を導入し *Brg1* を欠失させることにより、約 20%の比較的予後良好な膵癌の前癌病変である IPMN が形成され膵癌に進展することを見出した。さらにその起源細胞が膵管細胞であることを証明し、世界初の IPMN マウスモデルとして報告した(Nat Cell Biol. 2014)。

また、その後、変異 *Kras* の存在下において、BRG1 が欠失することにより膵管細胞が脱分化し膵管細胞の腫瘍化を引き起こすこと、また、BRG1 が欠失した膵管細胞由来の IPMN 由来膵癌細胞株において、BRG1 を再発現させることにより上皮間葉転換を引き起こし腫瘍増殖が促進されることが報告された(Genes Dev. 2015)。つまり、膵管細胞由来の IPMN からの発癌過程において、BRG1 は、その前期では腫瘍抑制的に働き、後期では腫瘍促進的に働くといった状況依存性に異なった働きをもつ分子であることが明らかになった。

しかし、残りの約 80%を占める予後不良な膵癌の前癌病変である、膵腺房細胞由来の PanIN における BRG1 の役割は依然不明であった。

申請者は、PanIN・PanIN 由来膵癌における BRG1 の役割を明らかにすべく研究を行っており、本研究の開始までに、膵腺房細胞特異的に *Kras* を活性化させ *Brg1* を欠失させたマウス (*Ptf1a-Cre^{ER}; Kras^{G12D}; Brg1^{fl/fl}* マウス、以下 KBC マウス)を作成し、*Brg1* の欠失により PanIN 形成が著明に抑制されることを見出した。また、マウス膵腺房細胞において *Brg1* の欠失により PanIN 形成に必須の因子である *Sox9* の発現が早期より低下することを見出した。このことから、BRG1 は直接的な SOX9 の発現調節を介し PanIN の形成に必須の役割を果たしているのではないかと考えられた。また、この結果とは反対に、我々のグループは以前にヒト PanIN 由来膵癌の免疫染色で BRG1 陰性群の方が予後不良であることを見出しており(Nat Cell Biol 2014)、膵管細胞由来の発癌過程の前期と後期で BRG1 が異なった働きをもつように、PanIN 由来の発癌過程においても、その前期と後期で BRG1 が異なった働きを持つ可能性が考えられ、その詳細な解析が必要と考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、下記 5 点に関して、主にマウスモデルを用いた実験により検討することを目的とした。

他の膵癌マウスモデルでも BRG1 欠失により PanIN 形成が抑制されるかどうかを検証する。

PanIN 形成において BRG1 の下流因子として SOX9 が中心的な役割を果たしているかどうかを解明する。

PanIN の維持・進行において BRG1 がどのような役割を果たしているかを解明する。

PanIN 由来膵癌の維持・進行において BRG1 がどのような役割を果たしているかを解明する。

ヒト膵癌における BRG1/SOX9 経路の役割を解明する。

3. 研究の方法

一般に膵炎は膵癌と密接な関係をもつことが知られている。膵腺房細胞特異的に *Kras* を活性化させ *Brg1* を欠失させたマウス(*Ptf1a-Cre^{ER}; Kras^{G12D}; Brg1^{fl/fl}* マウス;KBC マウス)に、セルレインを投与し膵炎を起こし、膵炎下でも PanIN の減少がみられるかを検討した。

また、ヒト膵癌において *p53* 変異は *Kras* 変異に次いで多い遺伝子変異であることから、KBC マウスに *LSL-Trp53^{R172H}* マウスを交配し、膵腺房細胞特異的に変異 *Kras*、*p53* を導入し *Brg1* を欠失させたマウスを作成し、*p53* 変異の存在下でも PanIN、膵癌の形成が減少するかどうかを組織学的に検証した。

これまでの研究結果から、「BRG1 は SOX9 を介して PanIN の形成に寄与している」と仮説を立てており、この仮説を *in vivo* で検証することとした。具体的には、膵腺房細胞特異的に *Kras* を活性化させ *Brg1* を欠失し、かつ *Sox9* を強制発現させたマウスを作成し(*Ptf1a-Cre^{ER}; Kras^{G12D}; Brg1^{fl/fl}; Sox9OE* マウス)、*Sox9* の強制発現により、*Brg1* の欠失により PanIN が著明に減少するフェノタイプがみられなくなるかどうかを検証した。

また、膵腺房細胞において、BRG1 が SOX9 の発現をどのように調節しているかを明らかにするため、マウスから膵腺房細胞を単離しクロマチン免疫沈降法を用いた実験を行った。具体的には、ワイルドタイプマウスの膵腺房細胞において BRG1 が SOX9 のプロモーター領域に結合するかを評価した。また、ワイルドタイプマウス、*Ptf1a-Cre^{ER}; Brg1^{fl/fl}* マウスの両者から膵腺房細胞を単離し、SOX9 の発現を直接調節することが知られている PDX1 タンパクの SOX9 プロモーター領域、エンハンサー領域への結合が、BRG1 の有無により、どのように変化するかを評価した。

上述した Cre recombinase を用いた遺伝子改変マウスモデルでは、*Kras*、*p53* 変異の導入と同時に *Brg1* の欠失が起こってしまうため、厳密な意味では PanIN、膵癌形成後に *Brg1* がどのような働きを持っているかを検証することが不可能であった。

近年考案された、Flippase-Frt と Cre-LoxP の両者を用いた「dual recombinase system」(Nat Med. 2014)を用いることで、膵発がんにおける段階的な目的遺伝子の改変が行えるようになった。このシステムを用い、胎生期に膵特異的に *Kras* 活性化を起こし PanIN を形成させ、タモキシフェン投与により任意の時期に膵特異的に *Brg1* を欠失させることができるマウス (*Pdx1-Flp; FSF-Kras^{G12D}; FSF-Rosa26^{CreERT2}; Brg1^{fl/fl}* マウス)を作成し、PanIN の維持・進行に BRG1 がどのような役割を果たしているかを検証した。

同マウスに PanIN が形成された後にタモキシフェンを投与し *Brg1* を欠失させることでどのような変化が起こるかを組織学的に検証した。

上述した dual recombinase system を用い、胎生期に膵特異的に *Kras* 活性化・*p53* 欠失を起こすことで膵発癌を誘導し、タモキシフェン投与により任意の時期に膵特異的に *Brg1* を欠失させることができるマウス (*Pdx1-Flp; FSF-Kras^{G12D}; Trp53^{fl/+}; FSF-Rosa26^{CreERT2}; Brg1^{fl/fl}* マウス)を作成し、膵癌の形成後にタモキシフェンを投与し *Brg1* を欠失させることでどのような変化が起こるか組織学的に検証することとした。

ヒト膵癌の外科切除組織の免疫染色で、BRG1 と SOX9 のタンパク発現に相関があるかを検証した。また、国際的ゲノムプロジェクトである The Cancer Genome Atlas (TCGA)、International Cancer Genome Consortium (ICGC)で解析されたヒト膵癌の網羅的な mRNA 発現のデータを用い、*BRG1* と *SOX9* の mRNA 発現に相関があるかを検証した。具体的には、cBioportal からデータを抽出し、相関解析を行った。

4 . 研究成果

KBC マウスにおいて、膵炎下でも PanIN が著明に減少していることを見出した。また、膵腺房細胞特異的に変異 *Kras*、*p53* を導入し *Brg1* を欠失させたマウスにおいても PanIN が著明に減少していることを見出した。さらには、同マウスを長期飼育することにより膵癌を形成させたところ、*Brg1* が欠失したマウスでできた膵癌は BRG1 陽性であること、つまり遺伝子改変効率の問題で BRG1 の欠失を免れた細胞が癌化していることが判明した。

これらの結果から、様々なマウスモデルにおいて BRG1 が PanIN 形成に重要な役割を果たしていることが明らかになり、さらには膵癌形成においても BRG1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

Ptf1a-Cre^{ER}; Kras^{G12D}; Brg1^{fl/fl}; Sox9OE マウスの解析により、コントロールの *Ptf1a-Cre^{ER}; Kras^{G12D}; Sox9OE* マウスと同程度 PanIN が形成されることが明らかになった。つまり、SOX9 の強制発現により、BRG1 の欠失により PanIN が減少するというフェノタイプが消失することを見出し、BRG1 が SOX9 を介して PanIN 形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

また、膵腺房細胞を用いてクロマチン免疫沈降アッセイを行い、膵腺房細胞において、BRG1 が *Sox9* のプロモーター領域に直接結合することを証明した。また、膵腺房細胞において、BRG1 が欠失することにより SOX9 の制御に関わることが知られている PDX1 の SOX9 のプロモーター領域・エンハンサー領域への結合がなくなることを見出した。つまり、BRG1 は *Sox9* のプロモーター領域に直接結合するのみならず、他の転写調節因子の *Sox9* プロモーター領域・エンハンサー領域へのリクルートメントにも重要な役割を果たすことを示し、BRG1 が SOX9 を制御するメカニズムを明らかにした。

Pdx1-Flp; FSF-Kras^{G12D}; FSF-Rosa26^{CreERT2}; Brg1^{fl/fl} マウスの解析により、PanIN の形成後に *Brg1* を欠失させると PanIN が著明に減少することを見出した。また、その機序として *Brg1* を欠失させた PanIN ではアポトーシスを起こしている細胞が有意に増加していることを見出した。このことから、BRG1 は PanIN の維持・進行にアポトーシスの制御を介して必須の役割を持つことが明らかになった。

なお、膵癌形成後の BRG1 の役割に関しては *Pdx1-Flp; FSF-Kras^{G12D}; Trp53^{frt/+}; FSF-Rosa26^{CreERT2}; Brg1^{flf}* マウスを用いて現在検証中である。

当院の膵癌手術検体 27 例を用いて BRG1、SOX9 の免疫染色を行なった結果、BRG1 発現が低下したヒト膵癌 5 例では全例で SOX9 発現が低下していることを見出した。この結果は BRG1 高発現症例での SOX9 発現と比べ有意な変化であった。

また、TCGA、ICGC で解析された mRNA 発現データベースを用いて BRG1 と SOX9 の mRNA 発現量の相関につき検討を行い、*BRG1* 発現低下群では高発現群に比べ、*SOX9* の発現量が有意に低下していることを見出した。このことから BRG1/SOX9 経路はヒト膵癌においても維持されていることが示唆された。

当研究において、PanIN の形成に BRG1 が重要な役割を持つことが明らかになり、また、そのメカニズムとして BRG1 による SOX9 の直接的な転写制御が中心的役割を果たしていることが明らかになった。さらには、PanIN の維持進行にも BRG1 がアポトーシスの制御を介して重要な役割を持っていることが明らかになり、BRG1/SOX9 経路はヒト膵癌でも保存されていることが示唆された。

これらの結果は、今後、膵癌の大多数を占め予後不良群である前癌病変 PanIN を経由した膵癌において、BRG1 や SOX9 をターゲットとした創薬の検討につながる重要な結果であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Motoyuki Tsuda, Akihisa Fukuda, Nilotpal Roy, et al, The BRG1/SOX9 axis is critical for acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 査読有 2018 Aug 1;128(8):3475-3489.
<https://www.jci.org/articles/view/94287>, doi: 10.1172/JCI94287.

〔学会発表〕(計 5 件)

津田 喬之 他、BRG1 is indispensable for acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis through controlling SOX9 expression、第 76 回日本癌学会総会、2017 年

津田 喬之 他、BRG1 は Sox9 の発現制御を介し PanIN の形成・維持に重要な役割をはたす JDDW2017 2017 年

Motoyuki Tsuda, Akihisa Fukuda, Hiroshi Seno, The BRG1/SOX9 axis plays a critical role for acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis、AACR meeting:Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care (国際学会) 2018 年

津田 喬之、福田 晃久、妹尾 浩、Brg1 は PanIN の維持・PanIN 由来膵癌の形成に apoptosis の制御を介し重要な役割を果たす、第 49 回日本膵臓学会大会 2018 年

Motoyuki Tsuda, Akihisa Fukuda, Hiroshi Seno, BRG1/SOX9 axis is critical for acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年

〔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：

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。