

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03639

研究課題名(和文) 浸潤性膵癌形成後の維持・進行におけるクロマチン制御因子の機能とその分子機構の解明

研究課題名(英文) The functional role of chromatin regulator in established PDAC

研究代表者

福田 晃久 (Fukuda, Akihisa)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：70644897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌におけるBrg1の機能的役割を解明するため、形成された膵癌で任意の時期にBrg1をKOできる独自の膵癌マウスモデルを作成した。増殖能に関しては、Brg1 KOマウス膵癌細胞では増殖が減少し、アポトーシスが著増した。さらに、Brg1 KOにより膵癌細胞の転移能は著しく抑制され、幹細胞性が低下することが明らかになった。RNA-seq、CHIP-seq解析および機能解析実験の結果、その分子機序として、増殖にはMycの標的因子、転移にはHif1aの標的因子の発現制御を介していることが判明した。ヒト膵癌細胞に対して、CRISPR/Cas9によるBRG1KOを行った結果、増殖が有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has one of the worst prognoses among all human malignancies. It is urgently needed to develop novel therapeutic approaches for this lethal disease. This study revealed that Brg1 is required for established PDAC and could be a novel therapeutic target for PDAC.

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) has one of the worst prognoses among all human malignancies. It is urgently needed to develop novel therapeutic approaches for this lethal disease. We previously reported that BRG1/SOX9 axis is required for PDAC formation in mice and that BRG1 is expressed in approximately 80% of human PDAC. In this study, we aimed to clarify the functional role of Brg1 in established PDAC in mice using a dual recombinase system and in human PDAC cells. We found that Brg1 knockout (KO) in established PDAC leads to increased apoptosis and reduced growth in mice. BRG1 is required for metastasis of PDAC cells in mice. Brg1 plays a critical role for cancer stemness of PDAC cells. BRG1 knockdown (KD) or KO leads to increased apoptosis and decreased cell growth in human PDAC cells in vitro and in vivo. These data indicate that Brg1 could be a novel therapeutic target for PDAC.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵癌 分子機序 クロマチンリモデリング因子

1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後不良な難治性癌であり、罹患患者数・死亡数ともに増加傾向にある。したがって、膵癌の分子メカニズムの理解に基づいた新規の治療法開発は喫緊の課題である。膵癌は2つの異なる前癌病変、PanIN (pancreatic intraductal neoplasia)と IPMN (intraductal papillary mucinous neoplasm)から発生する。近年、ヒト膵癌ゲノムの網羅的解析により、ヒト膵癌の遺伝子変異は10種に分類・集約されることが示された。SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体はこの中の1つであり、約15%の膵癌でその構成因子に不活化変異が認められ、膵癌の発生・進行に重要な役割をもつことが示唆され(Nature 2016)、最近、大きく注目されるようになった。SWI/SNF 複合体は、10個程のサブユニットで構成され、ATP加水分解のエネルギーを利用してクロマチン構造の動的変動を行い、転写因子などがDNAにアクセスできるように調節することで遺伝子発現を制御する。「SWI/SNF 複合体の必須因子 BRG1」はATPaseとDNA結合ドメインを持ち、ARID1AはDNA結合蛋白として働く。

申請者らは、SWI/SNF 複合体の中で「ATPaseを含む必須因子 BRG1」と「ヒト膵癌で最も変異頻度の高い ARID1A」に焦点を当て、世界に先駆けて、膵癌における BRG1 と ARID1A の機能的役割をこれまで明らかにしてきた。即ち、「BRG1 と ARID1A は、IPMN 及び IPMN 由来膵癌の発生を抑制すること」、「IPMN の起源細胞は膵管細胞であること」を初めて明らかにした(Fukuda et al. Nat Cell Biol 2014, Kimura, Fukuda et al. Gastroenterology 2018)。

一方、重要なことに、申請者らは最近、「BRG1/SOX9 経路」が、ヒト膵癌の大多数を占める、「膵腺房細胞を起源」とする「PanIN 由来の通常型膵癌」の形成には必須であり、BRG1 が SOX9 のプロモーターに直接結合して発現を促進することから、SOX9 が BRG1 の下流の KEY 分子であること、BRG1 ノックアウトにより、既に形成された膵前癌病変 PanIN がアポトーシスをきたして退縮すること、「BRG1/SOX9 経路」はヒト膵癌においても保存されていることを、世界で初めて見出した(Tsuda, Fukuda et al. J Clin Invest. 2018)。

しかしながら、臨床上一番問題になっている、「既に形成された浸潤性膵癌」において、「浸潤性膵癌の維持・進行」における BRG1 の機能的役割は未だに明らかでなく、「BRG1 阻害により、既に形成された浸潤性膵癌の増大抑制が得られるか？」および「その分子機構の解明」が本研究の核心をなす学術的「問い」である。

従来、膵癌モデルマウスは、Cre-LoxP システムによる膵上皮の Kras 活性化&p53等の不活化によるものであったため、膵癌形成後での、特定の分子機能は、マウスの個体レベルでは解明することが出来なかった。そこで、申請者らは、国際共同研究の下、「独自の dual recombinase system」により、「Flp-FRT システム」にて膵特異的に Kras 活性化、p53 の不活化を引き起こして膵癌を形成し、さらに膵癌の形成後にタモキシフェン誘導の「Cre-loxP システム」を用いて、「目的の遺伝子 (BRG1) を任意の時期にノックアウトする新しい画期的なシステム」を用いることを考えた(Nat Med 2014、J Clin Invest. 2018)。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが、世界に先駆けて独自に膵癌における BRG1 の役割を明らかにしてきた研究をさらに展開し、独自の「dual recombinase による新規膵癌モデルマウス」を用いて、「既に形成された浸潤性膵癌」の維持・進行における BRG1 の機能的役割およびその分子機構を解明する。これにより「BRG1 阻害により形成された浸潤性膵癌の増大抑制効果が得られるか」を明

らかにし、「BRG1 を標的とした新規膵癌治療法の開発」にむけた基盤を確立する。

3 . 研究の方法

本研究では、*Pdx1-Fip; FSF-Kras^{G12D}; Trp53^{+/-}; FSF-Rosa26^{CreERT2}; Brg1^{f/f}* マウスを作成し、浸潤性膵癌を形成後の段階で、タモキシフェン投与し、BRG1 を KO することにより、「既に形成された浸潤性膵癌の増大抑制が得られるか」を検証する。そのため、マウスに膵癌が形成されたことをマウス専用エコーで確認後、エコーにて腫瘍サイズの変化を評価する。その後の膵癌の増大が有意に抑制されるか、膵癌が退縮するか、マウスの予後延長が得られるかを検証する。膵癌組織についても組織学的検討を加え、アポトーシス等について解析する。

4 . 研究成果

浸潤性膵がんにおける Brg1 の機能的役割を解明するため、dual recombinase システムを用いて、形成された膵がんにおいてタモキシフェン投与により任意の時期に Brg1 を KO できる独自の膵がんモデルマウスを作成した。このマウスに形成された膵がんから細胞株を樹立し、Brg1 を KO することにより、増殖・転移への影響について検討した。

増殖能に関しては、Brg1 KO マウス膵がん細胞では増殖が減少し、cleaved caspase3 の増加により、アポトーシスが著増することが判明した。さらに、*in vivo*における xenograft モデルにおいて、および dual recombinase システムを用いた自然発症の膵癌モデルマウスにおいてもマウスの個体レベルにおいて、Brg1 KO により膵がん細胞の増殖、膵癌の増大が抑制されることを見出した。

次に、転移能について、Brg1 を KO した膵がん細胞とコントロールの膵がん細胞をマウスの脾臓に移植し肝転移巣の形成について比較解析した。その結果、形成された肝転移巣は Brg1 KO 群で著明に少なく、Brg1 KO により膵がん細胞の転移能は著しく抑制された。重要なことに、Brg1 KO 群で稀に少数形成された肝転移巣は、全て Brg1 陽性の膵がん細胞（即ち、Brg1 KO を免れた escaper 細胞）のみで構成されており、Brg1 陰性の膵がん細胞はみとめられなかった。さらにバイオイメージングを用いた詳細な解析の結果、Brg1 を KO した膵がん細胞は、脾臓移植後 1 日・2 日・4 日には肝臓にいったん生着するものの、徐々に肝転移巣は減少していき、8 日目にはほぼ消失することが判明した。組織学的な解析の結果、Brg1KO 膵癌群の肝転移巣において cleaved caspase3 陽性細胞が有意に増加しており、アポトーシスが亢進していた。さらに、Brg1 KO した膵がん細胞を腹腔内に移植したモデルで解析した結果においても、同様の結果が得られた。これらの結果より、マウス膵がん細胞の転移巣形成には Brg1 が必須であること、そのメカニズムとして、Brg1 KO によりアポトーシスが生じ、Brg1KO 膵がん細胞は細胞自律的に淘汰されることが明らかになった。

また、Brg1KO 膵がん細胞では幹細胞性が低下することが、sphere formation assay および dilution assay の結果で示された。これに合致して、Brg1KO 膵がん細胞では膵がん幹細胞マーカーの発現が低下していた。

以上より、マウス膵がん細胞は Brg1 欠失により、増殖・転移がいずれも著明に抑制され、幹細胞性の低下、アポトーシスが亢進することが示され、BRG1 を標的とした膵がん治療が有効となる可能性が強く示唆された。

網羅的な遺伝子発現解析（RNA-seq）および CHIP-seq 解析の結果、Brg1KO した膵癌細胞では hypoxic pathway の発現が著しく減少しており、Hif1a が標的遺伝子に結合して Hif1a の標的遺伝子を発現させるのに Brg1 が重要であることが示された。さらに Hif1a 阻害実験の結果、Brg1

は膀胱癌の幹細胞性、増殖、転移巣形成、アポトーシス回避に重要な働きをしていること、そのメカニズムとしてはBrg1によるHif経路の発現制御によるものであることが明らかになった。

これらの研究成果については、論文発表した(*Oncogene*. 2023 May 18. doi: 10.1038/s41388-023-02716-4.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ogawa S, Fukuda A, Matsumoto Y, Hanyu Yu, Sono M, Fukunaga Y, Masuda T, Araki O, Nagao M, Yoshikawa T, Goto N, Hiramatsu Y, Tsuda M, Maruno T, Nakanishii Y, Hussein S.M, Tsuruyama T, Takaori K, Uemotoio S, Seno H. | 4. 巻 159 |
| 2. 論文標題 Setdb1 inhibits p53-mediated apoptosis and is required for formation of pancreatic ductal adenocarcinomas in mice. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 682-696 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.04.047 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Motoyuki Tsuda, Akihisa Fukuda, Munenori Kawai, Osamu Araki, Hiroshi Seno. | 4. 巻 112 |
| 2. 論文標題 The role of SWI/SNF chromatin remodeling complex in pancreatic cancer. *corresponding author | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 490-497 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14768 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Takahisa Maruno, Akihisa Fukuda, Norihiro Goto, Motoyuki Tsuda, Kozo Ikuta, Yukiko Hiramatsu, Satoshi Ogawa, Yuki Nakanishi, Yuichi Yamaga, Takuto Yoshioka, Kyoichi Takaori, Shinji Uemoto, Dieter Saur, Tsutomu Chiba, Hiroshi Seno | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Visualization of stem cell activity in pancreatic cancer expansion by direct lineage tracing with live imaging | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e55117 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.55117 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Fukunaga Y, Fukuda A, Omatsu M, Namikawa M, Sono M, Masuda T, Araki O, Nagao M, Yoshikawa T, Ogawa S, Hiramatsu Y, Muta Y, Tsuda M, Maruno T, Nakanishi Y, Ferrer J, Tsuruyama T, Masui T, Hatano E, Seno H | 4. 巻 163 |
| 2. 論文標題 Loss of Arid1a and Pten in Pancreatic Ductal Cells Induces Intraductal Tubulopapillary Neoplasm via the YAP/TAZ Pathway. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Gastroenterology | 6. 最初と最後の頁 466-480 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2022.04.020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Araki O, Tsuda M, Omatsu M, Namikawa M, Sono M, Fukunaga Y, Masuda T, Yoshikawa T, Nagao M, Ogawa S, Masuo K, Goto N, Muta Y, Hiramatsu Y, Maruno T, Nakanishi Y, Koyasu S, Masui T, Hatano E, Saur D, Fukuda A, Seno H. | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Brg1 controls stemness and metastasis of pancreatic cancer through regulating hypoxia pathway. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-023-02716-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 妹尾 浩 (Seno Hiroshi) (90335266) | 京都大学・医学研究科・教授 (14301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |