

令和 5 年 4 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08353

研究課題名(和文) エピゲノム異常がもたらす肝内胆管癌の高悪性度形質の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular Basis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma Caused by Epigenomic Abnormalities

研究代表者

白田 龍之介 (Hakuta, Ryunosuke)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10843716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌発生マウスモデルを用いて、エピゲノム関連遺伝子異常が悪性度あるいは腫瘍間質形成に及ぼす影響を検討した。ICCにおける豊富な間質についてもクロマチン制御阻害が抑制効果を持つ可能性を検討する。方法として野生型IDH1あるいは変異型IDH1(R132C)を組織特異的に発現誘導可能な遺伝子改変マウス；CAG-LSL-IDH1WT TgおよびCAG-LSLIDH1(R132C mutant) Tgを作製した。これまでにAlb-Creマウスとの交配で肝臓における導入IDH1遺伝子の発現と変異マウス特異的な2-HGの産生を確認した。これらを他の遺伝子改変マウスと交配し、解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICCで変異が認められるエピゲノム関連遺伝子が、その悪性度や豊富な腫瘍間質形成に及ぼす影響については全く不明であり、同時にクロマチン修飾制御との関連も解明されていない。最近ではそれら遺伝子異常がICCにおいても癌細胞のみならず腫瘍間質に作用している可能性が考えられ、同時にクロマチン修飾との関連も推察されるが、その分子機序を解明した報告はない。さらに遺伝子異常の標的化が間質細胞や免疫反応を介した抗腫瘍戦略として有効である可能性も想起される。本研究はエピゲノム異常がもたらす肝内胆管癌の高悪性度形質の分子基盤を明らかにする学術的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Using a mouse model of intrahepatic cholangiocarcinogenesis, we examined the effects of epigenome-related gene aberrations on malignancy or tumor stroma formation, and the possibility that inhibition of chromatin regulation may also have inhibitory effects on abundant stroma in ICCs. We generated genetically engineered mice capable of inducing tissue-specific expression of wild-type IDH1 or mutant IDH1 (R132C); CAG-LSL-IDH1WT Tg and CAG-LSLIDH1(R132C mutant) Tg. We have confirmed expression of the transgenic IDH1 gene in the liver and production of 2-HG specific to the mutant mice by crossing them with Alb-Cre mice. These were crossed with other transgenic mice and analyzed.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆管癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌の遺伝子変異は、周囲の間質細胞や免疫細胞を含めた腫瘍微小環境形成にも影響を及ぼすが、そのメカニズムや特性は癌種あるいは変異ごとに多彩であると考えられる。IDH 変異は急性骨髄性白血病やグリオーマと同様に肝内胆管癌の約 30%で認められる。IDH は代謝酵素としてイソクエン酸を還元し  $\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) を産生するが、その遺伝子変異はさらに  $\alpha$ -KG から 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) を産生する。2-HG は多くの  $\alpha$ -KG 依存性酵素群の活性を阻害し、特に DNA やヒストンの脱メチル化酵素 (TET, JMJ family)、低酸素因子 HIF1 の分解酵素などを阻害する結果、細胞内エネルギー代謝、遺伝子発現のクロマチン制御や血管新生などに影響する。興味深いことにグリオーマでの検討で、細胞外に分泌された 2-HG が腫瘍間質での免疫反応に影響することが報告された (Clin Cancer Res. 2018;24:5381-5391.)。同様に 2-HG が活性化 T cell の遺伝子転写活性や代謝状態を変更させ、走化性や活性に影響することも報告された (Genes Dev. 2017;31(8):774-786, Nat Med. 2018;24(8):1192-1203, Oncoimmunology. 2018;7(7):e1445454)。

クロマチンリモデリングを司る SWI/SNF 複合体の構成因子の一つ ARID1A についても、ARID1A 変異が mismatch repair を阻害して癌の変異負荷を増大させ、免疫チェックポイント療法の感受性を高めるとの知見が報告された (Nat Med. 2018;24(5):556-562)。

これらの知見から IDH や ARID1A の異常が ICC においても癌細胞のみならず腫瘍間質に作用している可能性が考えられ、同時にクロマチン修飾との関連も推察されるが、その分子機序を解明した報告はない。さらにそれら遺伝子異常の標的化が間質細胞や免疫反応を介した抗腫瘍戦略として有効である可能性も想起されるが、未だ検討されてはいない。

## 2. 研究の目的

本研究は、IDH および ARID1A 変異が ICC の癌細胞のみならず、間質や免疫細胞に影響を与えるかどうかを遺伝子改変マウスモデルとヒト検体を用いて解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では独自に樹立した遺伝子改変マウスを用いる。研究分担者らが以前報告した ICC 自然発生モデル *Alb-Cre/ Kras<sup>G12D</sup>/ PTEN<sup>flx/flx</sup>* マウス (Ikenoue T, Tateishi K, et al. Sci Rep. 2016;6:23899.) に、野生型および変異型 IDH1 をそれぞれ肝臓特異的に発現するマウス、あるいは ARID1A 欠損マウスを交配する。その結果発生する ICC の病理学的表現型、とくに間質に及ぼす影響を解析するとともに、影響を受ける遺伝子発現プロファイルを解析することで、その分子機序を明らかにする。

## 4. 研究成果

野生型 IDH1 あるいは変異型 IDH1 (R132C) を組織特異的に発現誘導可能な遺伝子改変マウス; *CAG-LSL-IDH1<sup>WT</sup> Tg* および *CAG-LSL-IDH1 (R132C mutant) Tg* を作製した。これまでに *Alb-Cre* マウスとの交配で肝臓における導入 IDH1 遺伝子の発現と変異マウス特異的な 2-HG の産生を確認した。野生型 IDH1、変異型 IDH1 (R132C) を単独で肝臓で発現させたマウスでは、いずれも生後 6 か月の時点では肝内に腫瘍を発生しないとの知見を得ている。これは変異型 IDH1 遺伝子の発現単独では発癌には至らないとの他の既報にも合致した (Nature. 2012;488:656-9, Nature. 2014;513:110-4.)。ICC 自然発生マウス *Alb-Cre/ Kras<sup>G12D</sup>/ PTEN<sup>flx/flx</sup>* マウスと上記の IDH1 発現マウス、また *ARID1A<sup>flx/flx</sup>* マウスを交配し、その表現型を解析中である。

今後はDH1変異の有無あるいはARID1A欠損により形成されるICCの組織像、とくに腫瘍間質の活性化及び免疫細胞浸潤への影響を解析する。具体的にはHE染色、Ki67染色による腫瘍増殖率、Azan/Masson trichrome染色による間質線維、alphaSMA染色による線維芽細胞の活性化状態、各種免疫細胞マーカー染色（CD3,CD4,CD8およびFoxp3, CTLA4, PD-1など）による免疫細胞浸潤プロファイルなどについて比較解析する。さらには生じたICC組織からRNAを抽出し、RNAseqによる発現解析を行い比較検討する。

上記でマウスモデルから得られた知見を、ヒト肝内胆管癌組織でも検証する。当院で手術が行われた肝内胆管癌臨床検体の組織切片からDNAを抽出し、IDH1変異あるいはARID1A異常の有無を確認、HE染色による病理学的特徴の有無、Ki67染色による腫瘍増殖率、Azan/Masson trichrome染色による間質線維成分、alphaSMA染色による線維芽細胞の活性化状態について検討する。また各種免疫細胞マーカー染色（CD3,CD4,CD8およびFoxp3, CTLA4, PD-1など）による免疫細胞浸潤プロファイルをマウス同様にスコア化し、比較する。IDH1変異あるいはARID1A異常の有無と臨床学的予後との相関について検討する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato Hiroyuki, Tateishi Keisuke, Ryunoske Hakuta, et al.	4. 巻 162
2. 論文標題 MX1-HNF1B Axis Is Indispensable for Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm Lineages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1272 ~ 1287.e16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.12.254	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 -

1. 著者名 Hakuta Ryunosuke, Nakai Yousuke, Oyama Hiroki, Noguchi Kensaku, Kanai Sachiko, Nomura Yusuke, Suzuki Tatsunori, Ishigaki Kazunaga, Saito Kei, Saito Tomotaka, Hamada Tsuyoshi, Takahara Naminatsu, Mizuno Suguru, Kogure Hirofumi, Moriya Kyoji, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Increased risk of biliary infection after biliary stent placement in users of proton pump inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DEN Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/deo2.129	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Suzuki Yukari, Saito Kei, Nakai Yousuke, Oyama Hiroki, Kanai Sachiko, Suzuki Tatsunori, Sato Tatsuya, Hakuta Ryunosuke, Ishigaki Kazunaga, Saito Tomotaka, Hamada Tsuyoshi, Takahara Naminatsu, Tateishi Ryosuke, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Early skeletal muscle mass decline is a prognostic factor in patients receiving gemcitabine plus nab-paclitaxel for unresectable pancreatic cancer: a retrospective observational study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Supportive Care in Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00520-023-07659-w	査読の有無 無
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 -

〔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	立石 敬介  (Tateishi Keisuke)  (20396948)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員    (12601)	

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
---------	---------