

令和 4 年 6 月 24 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：2020～2021

課題番号：20K22841

研究課題名(和文)腸腫瘍におけるArid1aの機能解析

研究課題名(英文)Functional role of Arid1a in intestinal tumor

研究代表者

林 由紀子(平松由紀子)(Hayashi (Hiramatsu), Yukiko)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：60876184

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):腸幹細胞において、カテニン恒常活性単独マウスでは腸腫瘍を多数認めた。一方、カテニン恒常活性と同時にArid1aを欠失させたマウスでは腸腫瘍産生を認めなかった。また、Arid1aを欠失させたマウスではWnt関連遺伝子の発現低下を認めた。Kras活性下にArid1aを欠損したマウス(以下、VKAマウス)を作成した。コントロールマウスでは腸腫瘍発生は認められなかったのに対して、VKAマウスには腸腫瘍の自然発生を認めた。VKAマウスに腸特異的p53変異を加えたマウス(VKPA)を解析したところ、VKPマウスに比べ、VKPAマウスでは遠位大腸癌の自然発生が多く認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの結果から、Arid1aは腸腫瘍発生経路によって異なる役割を果たしている可能性が示唆された。マウスモデルで得られた知見を基に、ヒト大腸腫瘍における治療ターゲットとなり得る候補因子を導き出し、ヒト大腸腫瘍の治療戦略を大きく発展させることが期待される。加えて、申請者らが膵癌におけるArid1aの機能解析で得られた知見と比較することで、大腸腫瘍だけでなく、膵癌における治療戦略につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文):We generate and investigate the mouse model in Wnt depending tumor pathway and Wnt independing tumor pathway.

In Wnt depending pathway, Arid1a plays an essential role in intestinal tumor cells for the maintenance of established intestinal tumors in a mouse model. RT-qPCR analysis revealed that Wnt signaling is depressed in Arid1a conditional knock out mice.

In contrast, in Wnt independing pathway, loss of Arid1a suppresses intestinal tumor cells. Arid1a also plays a pivotal role in cell survival and stemness in human CRC cells. Thus, Arid1a represents a new therapeutic target for human CRC.

研究分野：大腸腫瘍

キーワード：大腸癌 エピジェネティクス Arid1a

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな遺伝子発現制御と発癌、組織発生・恒常性維持との関連を示唆する報告がなされている。SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体は、9-12 個のサブユニットからなり、ATP 依存性のクロマチンリモデリングによって遺伝子発現を制御している。申請者らのグループは、膵臓特異的に活性化 KrasG12D を発現させると共に、SWI/SNF サブユニットの1つである Brg1 または Arid1a をノックアウトした遺伝子改変マウスを作成し、Brg1 及び Arid1a が IPMN および IPMN 由来膵癌の形成を抑制し、Brg1、Arid1a による遺伝子発現制御が膵癌の発生に重要な働きをしていることを世界で初めて明らかにした(Nat Cell Biol.2014, J Clin Invest 2018, Gastroenterology 2018)。

一方で、Arid1a の腸恒常性維持、腸発癌における役割は依然不明であった。そこで、申請者らは、腸上皮特異的に Arid1a を欠失させたマウス (Arid1a-cKO マウス) を作成・解析した。その結果、腸幹細胞が枯渇し、腸上皮 crypt-villi 構造の著明な異常を認め、腸オルガノイドの形成能 (=幹細胞能) が損なわれることを見出した。さらに、Arid1a-cKO マウスの腸では Sox9 を含めた Wnt シグナル関連遺伝子の発現減少を認めた。そこで、Arid1a-cKO マウスに Sox9 の過剰発現を加えたレスキュー実験を行った結果、Arid1a-cKO マウスで認めたフェノタイプがレスキューされた。以上より、Arid1a は Sox9 を含めた Wnt シグナルの発現制御を介して、マウス小腸上皮の幹細胞・恒常性維持に必須であることを初めて明らかにした (Hiramatsu et al. PNAS 2019)。

一方、ヒト大腸癌では①Wnt シグナル関連遺伝子である APC の変異を高頻度で認める Conventional 経路と、②KRAS、BRAF の活性化を背景に Wnt 非依存性に腸腫瘍を産生する Alternative 経路が知られている。ヒト大腸癌の網羅的遺伝子解析の結果、ARID1A の不活化変異が高頻度に認められたことから(Nature 2012)、Arid1a が大腸癌の発癌機構において腫瘍抑制的に働いていることが予想されたが、Arid1a の腸でのそれぞれの経路における発癌での役割は依然不明である。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らのこれまでの一連の成果、及び上記背景を踏まえ、Conventional & Alternative 経路での腸腫瘍発生における Arid1a の機能的役割とその分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

Conventional 経路 (Wnt 依存性) 及び、Alternative 経路 (Wnt 非依存性) の腸腫瘍における Arid1a の機能解析を行うために、それぞれの経路におけるマウス腸腫瘍モデルを用いて Arid1a を腸特異的、または腫瘍幹細胞特異的にノックアウトし、腸腫瘍形成・維持における Arid1a の機能的役割を検討した。

4. 研究成果

(1) Conventional 経路の腸腫瘍における Arid1a の機能解析：

Lgr5CreERT2/+を用いて、タモキシフェン投与下に、腸幹細胞においてβカテニン恒常活性と同時に Arid1a を欠失させたマウス (Lgr5CreERT2/+; Ctnnb1lox(ex3); Arid1a flox/flox) を作成・解析したところ、βカテニン恒常活性単独マウスでは腸腫瘍を多数認めるのに対して、βカテニン恒常活性と同時に Arid1a を欠失させたマウスでは腸腫瘍産生を認めなかった。加えて、上記マウスにレポーター (Rosa26LacZ) を導入したマウス (Lgr5CreERT2/+; Rosa26 lacZ/lacZ; Ctnnb1lox(ex3); Arid1a flox/flox) を作成し、lineage tracing を行った。タモキシフェン投与3日後、βカテニン恒常活性単独マウス、βカテニン恒常活性と同時に Arid1a を欠失させたマウスいずれにおいても、Xgal 染色を行うと陰窩底部から腸上皮まで LacZ 陽性細胞が観察された。加えて、βカテニン恒常活性と同時に Arid1a を欠失させたマウスで Arid1a 免疫染色を行うと、Arid1a の発現消失を認めた。タモキシフェン投与21日後では、βカテニン恒常活性単独マウスでは陰窩底部から腸上皮まで LacZ 陽性細胞が観察される一方、βカテニン恒常活性と同時に Arid1a を欠失させたマウスでは陰窩底部、腸上皮いずれにおいても LacZ 陽性細胞が観察されず、同時に、Arid1a 陽性細胞に置き換わっていた。

次に、Apc 変異下腸特異的 Arid1a 欠損マウスを作成したところ、Apc 変異単独マウスに比べ、腸腫瘍発生の減少を認めた。タモキシフェン投与下に腸幹細胞特異的にβカテニン恒常活性と同時に Arid1a を欠失したマウス、Apc 変異下腸特異的 Arid1a 欠損マウスいずれにおいてもβカテニンの核内移行の低下を認め、Wnt 関連遺伝子の発現低下を認めた。

以上の結果から、Conventional 経路では腸腫瘍の発生、維持において Arid1a の存在が必須であり、Arid1a は Wnt 経路を介して腸腫瘍発生、維持に必須な役割を果たしていることが示された。

(2) Alternative 経路の腸腫瘍における Arid1a の機能解析：

Kras 活性下に Arid1a を欠損したマウス (Villin-Cre; Kras G12D; Arid1a flox/flox マウス、以下、VKA マウス) を作成し、コントロールマウス (腸特異的 Arid1a 欠損マウス、および活性化 KrasG12D 単独発現マウス) と比較解析した。その結果、コントロールマウスでは腸腫瘍発生は認められなかったのに対して、VKA マウスには腸腫瘍の自然発生が多数認められた。上記、VKA

マウスに腸特異的 p53 変異を加えたマウス (VKPA) を解析したところ、VKP マウスに比べ、VKPA マウスでは遠位大腸癌の自然発生が多く認められた。これらの結果から、Alternative 経路では、Conventional 経路と反対に、Arid1a が腸腫瘍抑制的に働くことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maruno Takahisa, Fukuda Akihisa, Goto Norihiro, Tsuda Motoyuki, Ikuta Kozo, Hiramatsu Yukiko, Ogawa Satoshi, Nakanishi Yuki, Yamaga Yuichi, Yoshioka Takuto, Takaori Kyoichi, Uemoto Shinji, Saur Dieter, Chiba Tsutomu, Seno Hiroshi	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 1,24
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagao M, Fukuda A, Omatsu M, Namikawa M, Sono M, Fukunaga Y, Masuda T, Araki O, Yoshikawa T, Ogawa S, Masuo K, Goto N, Hiramatsu Y, Muta Y, Tsuda M, Maruno T, Nakanishi Y, Taketo M M, Ferrer J, Tsuruyama T, Nakanuma Y, Taura K, Uemoto S, Seno H	4. 巻 82
2. 論文標題 Concurrent Activation of Kras and Canonical Wnt Signaling Induces Premalignant Lesions That Progress to Extrahepatic Biliary Cancer in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1803 ~ 1817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-2176	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 Yoshikawa Takaaki, Fukuda Akihisa, Omatsu Mayuki, Namikawa Mio, Sono Makoto, Fukunaga Yuichi, Masuda Tomonori, Araki Osamu, Nagao Munemasa, Ogawa Satoshi, Masuo Kenji, Goto Norihiro, Hiramatsu Yukiko, Muta Yu, Tsuda Motoyuki, Maruno Takahisa, Nakanishi Yuki, Kawada Kenji, Takaishi Shigeo, Seno Hiroshi	4. 巻 255
2. 論文標題 Brg1 is required to maintain colorectal cancer stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 257 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5759	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 Fukunaga Yuichi, Fukuda Akihisa, Omatsu Mayuki, Namikawa Mio, Sono Makoto, Masuda Tomonori, Araki Osamu, Nagao Munemasa, Yoshikawa Takaaki, Ogawa Satoshi, Hiramatsu Yukiko, Muta Yu, Tsuda Motoyuki, Maruno Takahisa, Nakanishi Yuki, Ferrer Jorge, Tsuruyama Tatsuaki, Masui Toshihiko, Hatano Etsuro, Seno Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Loss of Arid1a and Pten in Pancreatic Ductal Cells Induces Intraductal Tubulopapillary Neoplasia via the YAP/TAZ Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	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) 10.1053/j.gastro.2022.04.020	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 平松由紀子
2. 発表標題 小腸におけるArid1aの機能的役割
3. 学会等名 日本消化器病学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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