

令和 7 年 6 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K07935

研究課題名（和文）肝内胆管癌におけるエピゲノムaddictionの包括的解明

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of epigenome addiction in intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

木暮 宏史（KOGURE, Hirofumi）

日本大学・医学部・教授

研究者番号：60568921

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）：分子標的薬の癌に対する有効性の分子基盤として、oncogene addictionがある。肝内胆管癌ICCでは標的ゲノム異常が限られ、addictする分子機構の解明が望まれる。前研究でIDH1変異がPFK1の発現上昇を司り、BET阻害剤JQ1への感受性を増加させると報告した。ICCにはIDH1以外にクロマチンリモデリングに関する変異が見出される。ICCは豊富な間質を有するため、そこからの外部刺激を生存・増殖にリンクさせ、特異的なエピゲノム変化が誘導される可能性がある。よって本研究はICC特異的なクロマチン構造とその腫瘍生物学的意義、協調する遺伝子異常について解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではICCのDNAメチル化、ヒストン修飾とともに、クロマチン構造を解析するが、今のところ類似の報告はなされていない。現在の膵・胆道癌研究の殆どはヒト細胞株およびマウスモデルを用いるが、患者個々の癌細胞のエピゲノムプロファイルは必ずしも共通ではなく既存の細胞株では代用しえない。本研究では患者由来ICCオルガノイドを用いることで、臨床検体のクロマチン構造やその生物学的特性との相関を直接解析できる独自性を有する。またICCにおける遺伝子変異とクロマチン構造の相関は未解明であり、クロマチン構造の制御を念頭においた新たな抗腫瘍効果の分子機構を探索・提唱できる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：The molecular basis for the efficacy of molecularly targeted drugs against cancer is their ability to target oncogene addiction. Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC), one of the most intractable cancers, has a limited number of targetable genomic abnormalities such as IDH1 and FGFR. We reported that IDH1 mutations are responsible for upregulation of the glycolytic gene PFK1 and that IDH1 mutations increase sensitivity to the BET inhibitor JQ1 in ICCs. Epigenomic regulation, including chromatin dynamics, by IDH mutations may induce purposeful gene expression in response to chronic environmental responses. Since ICCs have a characteristic microenvironment consisting of abundant stroma, it is possible that important and specific epigenomic alterations may be induced that link the external stimuli to survival and proliferation. We analyzed ICC-specific chromatin structures, their biological significance and the genetic abnormalities that cooperate with IDH mutations.

研究分野：胆道、膵臓

キーワード：肝内胆管癌

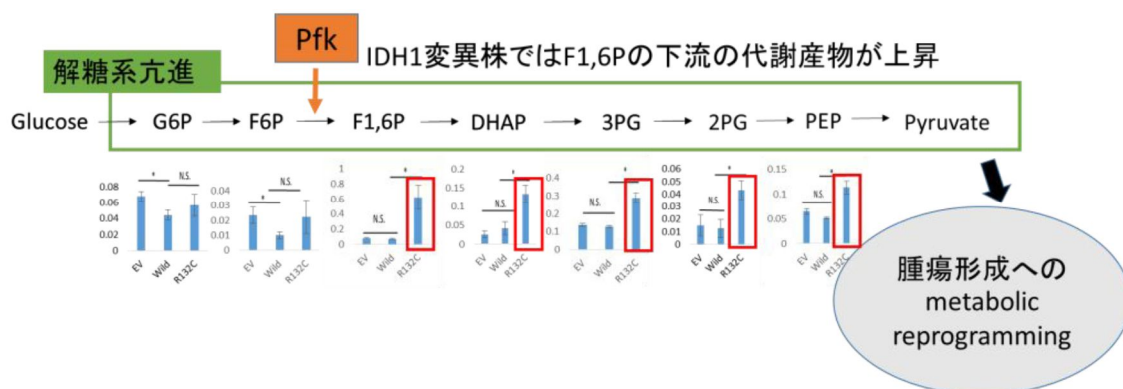
1. 研究開始当初の背景

癌に対する分子標的薬の有効性の分子基盤として、その癌細胞における oncogene addiction を標的化している点がある。これは癌細胞がその生存を依存するゲノム上の癌遺伝子の働きを阻害することに他ならない。一方で難治癌のひとつ肝内胆管癌 ICC では IDH1 や FGFR など、標的となりうるゲノム異常が限られており、肝内胆管癌細胞が addict する分子機構の包括的解明が望まれている。

IDH1/2 はイソクエン酸を還元し α -ケトグルタル酸 (α -KG) を産生する代謝酵素である。細胞内には 100 種類もの様々な α -KG 依存性脱水素酵素が存在し、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 (EGLN) も含まれる。IDH 遺伝子変異による特異的産物として α -KG から 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) が産生され、2-HG により前述の α -KG 依存性酵素群の活性が阻害される。その結果、細胞内エネルギー代謝のみならず、エピジェネティックな遺伝子発現制御や血管新生などにも影響が及びうる。

胆道癌ゲノム解析により、IDH 変異は肝内胆管癌の背景として知られる寄生虫感染や B 型/C 型肝炎を有さない症例に集積し、DNA メチル化と genomic instability が比較的多い独自のサブグループに層別化される。IDH 変異は一部の肝内胆管癌にとってドライバー変異の一つであると考えられている。

これまでに研究者は IDH 変異が胆管細胞のエネルギー代謝へ及ぼす影響を明らかにし (下図)、腫瘍形成への metabolic reprogramming の分子機序の一端として報告した。またその背景に α -KG 低下によるヒストン脱メチル化酵素の活性阻害が存在することを示した (Sci Rep. 2019 Dec 11;9(1):18859)。



一方で最近の報告では IDH 変異が DNA メチル化を変化させて転写のインスレーター機能に影響し、クロマチン構造全体を変化させることも明らかとなった (Nature. 2016 Jan 7;529(7584):110-4)。我々も IDH 変異がクロマチンリモデリングにかかわる BET 阻害薬への感受性を増加させることを見出し (Cancer Sci. 2018;109(11):3602-3610.) また肝内胆管癌では IDH 以外にクロマチンリモデリング因子 ARID1A や BRG1 の変異も認められることから、ICC 特異的なクロマチン制御の重要性が示唆される。

クロマチン動態を含めたエピゲノム制御は、ヒトの細胞が慢性的な環境応答に対する合目的な遺伝子発現を誘導・確立する可能性がある。肝内胆管癌においても膀胱癌と同様に豊富な間質から成る特徴的な微小環境を有するため、間質から慢性的な刺激を受ける過程で、その外部刺激を生存・増殖にリンクさせ、ICC 細胞が addict するような、重要で特異的なエピゲノム変化が誘導されている可能性がありうる。

しかしこれまでに肝内胆管癌特異的なクロマチン構造とその腫瘍生物学的意義、さらには IDH を含めた遺伝子変異との相関などについての検討はなされていない。

2. 研究の目的

本研究の主要目的は ICC 細胞が腫瘍生物学的に依存するクロマチン制御機構を明らかにすることであり、“エピゲノム addiction”とも表現されうる機構の可能性を探索することである。具体的には、前研究では肝内胆管癌の約 20%に存在する IDH 変異について検討し、それが胆管細胞のエネルギー代謝へ及ぼす影響、また ICC 細胞に及ぼす薬物感受性への影響について報告したが、一方で IDH 変異単独では胆管細胞の癌化には至らないことも明らかにした。肝内胆管癌には IDH 以外にクロマチンリモデリング因子 ARID1A や BRG1 の変異も時に認められることから、肝内胆管癌特異的なクロマチン制御の重要性が示唆される。よって本研究では肝内胆管癌特異的なクロマチン構造の解明とその腫瘍生物学的意義（肝内胆管癌が addict する分子機構でありうるのか）さらには肝内胆管癌特異的なクロマチン構造と IDH などの遺伝子変異との相互関係について解析する。

3. 研究の方法

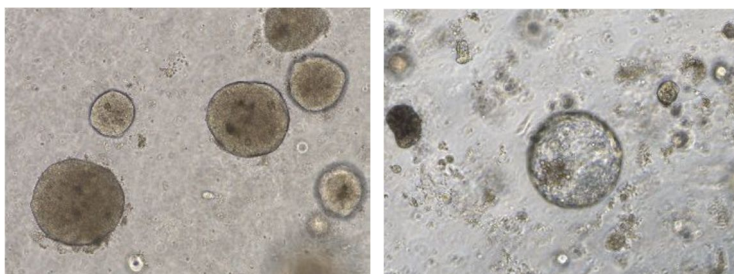
肝内胆管癌患者由来組織検体から樹立された複数ラインの肝内胆管癌オルガノイドを活用してクロマチン構造を解析し、付随する遺伝子発現から生物学的意義を検証する。そのために用いる ATAC-seq (Assay for Transposase- Accessible Chromatin) は、Transposases のゲノムへの accessibility を指標にクロマチンの立体構造を検出する解析系である。その解析から得られるオープンクロマチン領域は細胞種に特異的パターンを示し、その違いが様々な細胞系譜を区別しうる。さらには異なる原発部位の腫瘍細胞の鑑別についても有用性が示されている。

この ATAC-seq については前研究において、マウス胆管細胞を用いた IDH 変異の有無によるクロマチン open 領域プロファイルの違いについてすでに解析した経験を有しており、実験・解析条件については最適化している。

上記をふまえると、accessibility にもとづくクロマチン立体構造、いわばゲノムの 3D 構造情報が細胞に必須な遺伝子発現を誘導するエピジェネティックプロファイルを具現できると考えられるため、本研究においても IDH 変異のエピジェネティック制御に関わる意義の解析のために用いることとした。また IDH 変異と ARID1A, BRG1 変異との関連についてもマウスモデルを用いて検討する計画を立案した。

4. 研究成果

倫理委員会の承認のもと、肝内胆管癌患者由来の腫瘍組織と非腫瘍組織から肝内胆管癌および正常胆管上皮オルガノイドを樹立した。



肝内胆管癌（左）正常肝内胆管（右）から樹立したオルガノイド

現在オルガノイドなどを用いて、IDH変異の有無によるクロマチンopen領域プロファイルの違いについて検討中である。

またIDH変異トランスジェニックマウスとARID1A, BRG1の欠損マウスとの交配を行った。肝特異的なマウスモデルとして肝腫瘍発生の違いを解析したところ、遺伝子異常の組み合わせにより肝腫瘍の形成とその病理学的所見に明らかな違いを認めた。

これら本研究での知見を基に、さらにその分子機序について解析中であり、今後報告予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Noriyuki Kuniyoshi, Koji Yamada, Rota Osawa, Shuzo Nomura, Mariko Fujisawa, Kei Saito, Hiroo Imazu, Shinobu Masuda, Hirofumi Kogure	4. 巻 4
2. 論文標題 A comparison of diagnostic utility of new endoscopic scraper combined cell block method and conventional brush catheter for biliary tract cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 DEN Open	6. 最初と最後の頁 e331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/deo2.331	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 -
1. 著者名 Noriyuki Kuniyoshi, Hiroo Imazu, Ryota Masuzaki, Motomi Yamazaki, Suguru Hamana, Shuzo Nomura, Jo Hayama, Rota Osawa, Koji Yamada, Mariko Fujisawa, Kei Saito, Hirofumi Kogure	4. 巻 18
2. 論文標題 Diagnostic utility of quantitative analysis of microRNA in bile samples obtained during endoscopic retrograde cholangiopancreatography for malignant biliary strictures	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0289537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0289537	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 -
1. 著者名 Masuzaki Ryota, Kanda Tatsuo, Sasaki Reina, Matsumoto Naoki, Nirei Kazushige, Ogawa Masahiro, Karp Seth J., Moriyama Mitsuhiko, Kogure Hirofumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Suppressors of Cytokine Signaling and Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2549 ~ 2549
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14102549	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 Kanezawa Shini, Moriyama Mitsuhiko, Kanda Tatsuo, Fukushima Akiko, Masuzaki Ryota, Sasaki-Tanaka Reina, Tsunemi Akiko, Ueno Takahiro, Fukuda Noboru, Kogure Hirofumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Gut-Microbiota Dysbiosis in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats with Diet-Induced Steatohepatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4603 ~ 4603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24054603	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 Kogure Hirofumi, Kato Hironari, Nakai Yousuke, Isayama Hiroyuki, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 A Prospective Multicenter Study of “ Inside Stents ” for Biliary Stricture: Multicenter Evolving Inside Stent Registry (MEISter)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 2936 ~ 2936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10132936	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 Kato Hiroyuki, Tateishi Keisuke, et al.	4. 巻 162
2. 論文標題 MNX1-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
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 Saito Tomotaka, Takenaka Mamoru, Kuwatani Masaki, Doi Shinpei, Kogure Hirofumi, Nakahara Kazunari, Isayama Hiroyuki, Nakai Yousuke	4. 巻 25
2. 論文標題 WONDER-02: plastic stent vs. lumen-apposing metal stent for endoscopic ultrasound-guided drainage of pancreatic pseudocysts?study protocol for a multicentre randomised non-inferiority trial	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Trials	6. 最初と最後の頁 559-572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13063-024-08373-6	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 -

1. 著者名 Hakuta Ryunosuke, Ishida Kota, Nakai Yousuke, Kogure Hirofumi, Takahara Naminatsu, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 38
2. 論文標題 A retrospective comparative study of biliary drainage using balloon endoscopy and endoscopic ultrasound for malignant obstruction in patients with surgically altered anatomy	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 7269 ~ 7277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00464-024-11329-1	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 -

〔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)	
研究分担者	工藤 洋太郎 (KUDO Yotaro) (90608358)	東京大学・医学部附属病院・助教 (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
---------	---------