

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15948

研究課題名（和文）異なる経路での腸腫瘍発生におけるクロマチンリモデリング因子の機能的役割の解明

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, 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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：それぞれの大腸腫瘍発生経路（Conventional 経路、Alternative経路）におけるArid1aの機能解析を行うために、モデルマウスに加え、ヒト大腸腺腫、ヒト大腸SSLそれぞれからオルガノイドを樹立し、腸腫瘍におけるArid1aの機能を検討した。in vivo, in vitroいずれにおいても、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ことが示された。加えて、網羅的遺伝子解析、ChIP解析を行ったところ、それぞれの経路における中心的な役割を果たす制御因子を特定し、それらの制御因子をArid1aがエピジェネティックに制御していることが示された。

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ことが世界で初めて示された。加えて、それぞれの経路において、中心的な役割を果たす制御因子に対する薬剤を用いたキャンセル実験の結果から、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た。これらの結果は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. Moreover, we successfully established organoid cells generated from human adenoma cells or human SSL cells. We found that key factors play the essential role in each pathways by RNA sequence and ChIP sequence analysis.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 エピジェネティクス Arid1a

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

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 Wnt 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、KRAS、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、それぞれの腸腫瘍発生経路における 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。これまでのノックアウトマウスから得られた独自知見に基づき、腸腫瘍における Arid1a の機能的役割の解明に迫る。さらに網羅的遺伝子発現解析・ChIP-Seq 解析により、Arid1a がクロマチン制御によって腫瘍形成に働く分子制御機構までも他に先んじて明らかにする点が独創的である。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すことで、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点も創造性に富む。

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する。さらに、マウスモデルから得られた結果を元に、ヒト大腸腺腫、ヒト大腸鋸歯状腺腫 (Sessile serrated lesion、以下 SSL) それぞれから樹立したオルガノイドを樹立し、ヒト大腸腫瘍における ARID1A の発現を検証した上で、それぞれのオルガノイドを用いて、ARID1A ノックダウン実験を行い、ヒト大腸腫瘍における ARID1A の機能解析を行う。さらに、マウスモデル、ヒト大腸腫瘍ノックダウン実験から得られた結果を元に、ヒト大腸腫瘍形成の中心となる制御因子を特定する。

4. 研究成果

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

Conventional 経路の腸腫瘍発生における Arid1a の機能解析を行うために、マウス腸幹細胞特異的にタモキシフェン投与下に 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); Arid1aflox/flox、以下 LCA マウス) を作成し、コントロールマウス (タモキシフェン投与下 カテニン恒常活性マウス、以下 LC マウス) と腸腫瘍形成能の比較解析を行なった。その結果、タモキシフェン投与 3 週後の検討では、LC マウスでは腸腫瘍を多数認めたのに対し、LCA マウスでは腸腫瘍はほぼ認めず、LC マウスと比べて生存曲線の著明な延長を認めた。

次に、Conventional 経路の腸腫瘍維持における Arid1a の機能解析を行うために、Apc 変異下に腸特異的に Arid1a 欠失させたマウス (Villin-Cre; Apc^{Min}; Arid1a flox/flox マウス、以下 VAA マウス) を作成し、コントロールマウス (Wnt 依存性腸腫瘍モデルマウス、Apc^{Min} マウス) と

腸腫瘍形成能の比較解析を行なった。その結果、Apc 変異単独マウスに比べ、VAA マウスでは腸腫瘍発生数の減少を認め、生存曲線の著名な延長を認めた。

Apc 変異単独マウス、LC マウスいずれにおいても、腸腫瘍部では カテニンの核内移行を認めたのに対し、LCA マウス、VAA 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。

さらに、LCA マウスに lacZ レポーターを加えた Lgr5CreERT2/+; Rosa26lacZ/+; Ctnnb1lox(ex3); Arid1aflox/flox マウス (以下、LRCA マウス) を用いて細胞系譜解析 (Lineage tracing) を行い、Arid1a 陰性腸幹細胞における子孫細胞供給能を検証した。タモキシフェン投与3週間後のコントロールマウス (Lgr5CreERT2/+; Rosa26lacZ/+; Ctnnb1lox(ex3)マウス、LRC マウス) では lacZ 陽性腸腫瘍を多数認めたのに対し、LRCA マウスでは、LCA マウス同様に腸腫瘍はほぼ認めず、加えて、lacZ 陽性細胞も認めなかった。

これらの結果から、Conventional 経路では腸腫瘍の発生、維持いずれにおいて 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。

次に、ヒト大腸腺腫から樹立したオルガノイドを用いて、腸腫瘍における Arid1a の機能を検討した。ヒト大腸腺腫から樹立したオルガノイドにおいて、ARID1A の発現が保たれていることを確認したうえで、ARID1A をノックダウン(KD)したところ、ARID1A KD オルガノイドでは増殖能が抑制され、マウスモデルに加え、ヒト大腸腺腫オルガノイドでも同様に ARID1A が腫瘍促進的に働くことが示唆された。加えて、遺伝子発現解析では ARID1A を KD したオルガノイドでは cell cycle 制御因子の発現が亢進していた。これらの結果から、Conventional 経路では Cell cycle 制御因子の発現を制御することで、腸腫瘍促進的に働いていることが示唆された。

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

Serrated pathway(Alternative 経路)では KRAS 変異、BRAF 変異を背景とした腫瘍形成が知られている。そこで、KRAS 変異、BRAF 変異それぞれで p53 ノックアウトを加え、さらに Arid1a を欠損させたマウス (Villin-Cre; Kras G12D; p53 flox/flox; Arid1a flox/flox マウス、Villin-Cre; BRAF V600E; p53 flox/flox; Arid1a flox/flox 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、BRAF V600E 単独発現マウス、Villin-Cre; Kras G12D; p53 flox/flox マウス、Villin-Cre; BRAF V600E; p53 flox/flox マウス) を作成し、それぞれの腸腫瘍形成能の比較解析を行った。Arid1a 欠失マウスでは陰窩の拡張や陰窩底部の変形・分岐等 SSL に特徴的な組織学的表現系を呈し、同時にヒト鋸歯状病変のマーカー発現の亢進を認めた。Arid1a 欠失マウスでは腸腫瘍数は増加し、炎症細胞の著明な増加を認め、浸潤癌・リンパ節転移、生存率の低下を認めた。

これらの結果から、Conventional 経路とは対照的に、Alternative 経路では Arid1a が腸腫瘍抑制的に働いていることが示唆された。さらに、Alternative 経路 Arid1a 欠損マウスにおいて、炎症細胞浸潤の著明な増加を認めたことに着目し、抗生剤投与を行ったところ、腸腫瘍形成は認めず、フェノタイプがキャンセルされた。

マウスモデルでの結果を踏まえ、ヒト大腸 SSL 由来オルガノイドを用いて炎症系因子の発現について検討したところ、ARID1A KD オルガノイドでは、腫瘍促進的に働く炎症系ケモカインに加え、ケモカインレセプターの発現上昇を認めた。これらの結果から、Alternative 経路においては、Arid1a は炎症系ケモカインの発現を制御することで腫瘍抑制的に働いていることが示唆された。

これらの結果は、Wnt 依存性 Conventional 経路、Wnt 非依存性 Alternative 経路それぞれにおいて、Arid1a の機能的役割が異なることを示唆する。

この結果を踏まえ、それぞれの経路において、中心的な役割を果たす制御因子に対する薬剤をそれぞれのマウスモデル、ヒト大腸腫瘍由来オルガノイドに対して投与を行ったところ、それぞれのフェノタイプがキャンセルされた。この結果を踏まえ、ヒト大腸腫瘍に対する新規薬剤候補因子として、今後さらなる検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

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 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.e6
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 -

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 113
2. 論文標題 JNK pathway plays a critical role for expansion of human colorectal cancer in the context of BRG1 suppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3417 ~ 3427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15520	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 Hiramatsu Yukiko, Utsumi Takahiro, Higuchi Hirokazu, Hayashi Jun, Horimatsu Takahiro, Nikaido Mitsuhiro, Nakanishi Yuki, Shimizu Takahiro, Muto Manabu, Seno Hiroshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Thermal tissue damage caused by new endoscope model due to light absorption	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1801 ~ 1805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15963	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 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 MM, Ferrer J, Tsuruyama T, Nakanuma Y, Taura K, Uemoto S, Seno H.	4. 巻 -
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 Res.	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) なし	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 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 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 Nagao Munemasa, Mizukoshi Kenta, Nakayama Shinnosuke, Namikawa Mio, Hiramatsu Yukiko, Maruno Takahisa, Nakanishi Yuki, Tsuruyama Tatsuaki, Fukuda Akihisa, Seno Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 p53 protects against formation of extrahepatic biliary precancerous lesions in the context of oncogenic Kras	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 276 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.28380	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 Kumagai Ken, Shimizu Takahiro, Nikaido Mitsuhiro, Hirano Tomonori, Kakiuchi Nobuyuki, Takeuchi Yasuhide, Minamiguchi Sachiko, Sakurai Takaki, Teramura Mari, Utsumi Takahiro, Hiramatsu Yukiko, Nakanishi Yuki, Takai Atsushi, Miyamoto Shin'ichi, Ogawa Seishi, Seno Hiroshi	4. 巻 259
2. 論文標題 On the origin of gastric tumours: analysis of a case with intramucosal gastric carcinoma and oxyntic gland adenoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 362 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6050	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 Araki et al.	4. 巻 42
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 2139 ~ 2152
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 -

1. 著者名 Namikawa et al.	4. 巻 260
2. 論文標題 Simultaneous activation of Kras, Akt and Notch pathways induces extrahepatic biliary cancer via the mTORC1 pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 478 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.6139	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 Masuda et al.	4. 巻 133
2. 論文標題 Pancreatic RECK inactivation promotes cancer formation, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	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) 10.1172/JCI161847	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 Omatsu et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 THBS1-producing tumor-infiltrating monocyte-like cells contribute to immunosuppression and metastasis in colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-023-41095-y	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
---------------------------	-----------------------	----

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