

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18141

研究課題名(和文)胆管がんにおけるARID1A遺伝子の機能解析と治療薬の開発

研究課題名(英文)Functional analysis of ARID1A and development of therapeutic agents for cholangiocarcinoma

研究代表者

赤須 雅文(Akasu, Masafumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：90836941

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)：肝内胆管癌の臨床検体を用いて、免疫染色を実施したところ、ARID1A negativeグループにおいて、予後不良であった。ARID1Aノックアウト肝内胆管癌細胞株を作成し、分子腫瘍学的機序を解析したところ、ALDH1A1に対して抑制的に働き、予後の悪化に寄与していることがわかった。さらにノックアウトにおいて使用したCRISPR/Cas9システムを用いて、肝細胞癌細胞株のCTNNB1ノックアウト細胞株を作成、 β -cateninの内因性活性化を促し、免疫応答との関連を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆道がんは、日本をはじめアジアで多いがんであるが、近年は欧米でもその罹患率は増加傾向である。本邦における5年生存率は20%以下と膵がんが続く予後不良ながんである。切除不能胆道がんに対する治療としては、Gemcitabine + Cisplatinがファーストラインで推奨されているが、セカンドラインの治療薬、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬といった治療薬は確立されていない。胆管がんにおいて、ARID1Aの変異は胆道がんの予後に影響を与えることが知られている。そこで、ARID1Aの機能を明らかにすることで、新規薬剤の開発に有効となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：When immunohistochemistry was performed using a clinical specimen of intrahepatic cholangiocarcinoma, the prognosis was poor in the ARID1A negative group. ARID1A knockout intrahepatic cholangiocarcinoma cell line was established and the molecular oncological mechanism was analyzed. As a result, we discovered that ARID1A exhibits a tumor suppressive effect on ICC through the regulation of ALDH1A1 and it contributes to the deterioration of prognosis. Furthermore, using the CRISPR / Cas9 system used in its knockout process, we established CTNNB1 knockout cell line for hepatocellular carcinoma cell lines, promoted intrinsic activation of β -catenin, and showed its association with immune response.

研究分野：分子腫瘍医学

キーワード：胆管がん ARID1A CRISPR/Cas9 β -catenin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆道がんは、日本をはじめアジアで多いがんであるが、近年は欧米でもその罹患率は増加傾向である。本邦における5年生存率は20%以下と膵がんが続く予後不良ながんである。切除不能胆道がんに対する治療としては、Gemcitabine + Cisplatin がファーストラインで推奨されているが、セカンドラインの治療薬、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬といった治療薬は確立されていない。本邦で胆道がんの大規模な遺伝子解析の結果、AT-rich interactive domain containing protein 1A (ARID1A) は3番目に変異が多い遺伝子と報告され、ARID1Aの変異は胆道がんの予後に影響を与えることが知られている。遺伝子診断に基づく治療方針の決定に役立つと考え、この遺伝子に着目した。本研究の目的は、ARID1Aの機能を明らかにすることであり、ARID1A遺伝子に変異を有する、卵巣がん、胃がん、肝細胞がんなど、他のがん腫にも有効に働くことが期待される。

2. 研究の目的

ARID1Aの機能を明らかにし、ARID1Aの変異を有する胆道がんの有効な治療につなげることを目的とした。

ARID1Aは、2015年本邦において胆道がんでも変異が多いと報告された。ARID1Aのノックアウト細胞株を作成し、研究を進展させていく。

さらに、ノックアウト細胞株を作成する際に使用したCRISPR/Cas9 systemを用いて、肝細胞癌細胞株に応用した。β-catenineの変異・活性化をさせた肝細胞癌細胞株にて免疫応答の機序解明を企図した。

3. 研究の方法

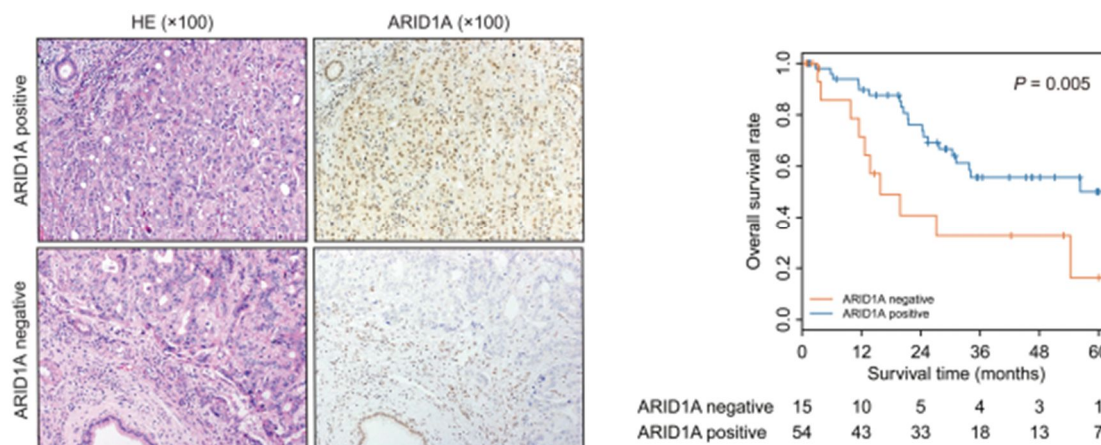
肝内胆管癌の臨床検体症例を用いて、免疫染色を実施、そこからARID1Aの予後との相関を検討した。

肝内胆管癌細胞株(HuCCCT-1、RBE)において、CRISPR/Cas9システムを用いて、ARID1Aのノックアウト細胞株を作成、予後不良へつながる機序の解明を進めた。

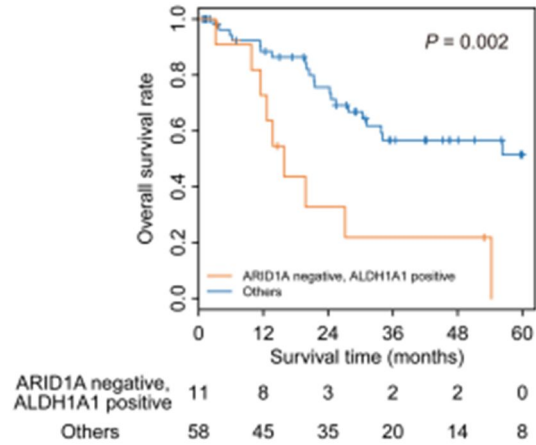
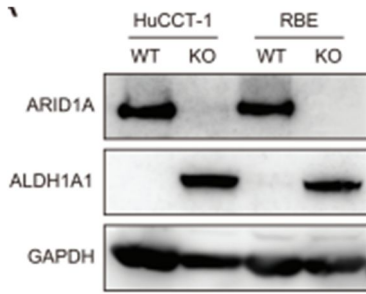
そのCRISPR/Cas9システムを応用し、肝細胞がん細胞株においてもβ-catenineの変異・活性化を惹起させ、免疫応答との関連を解明した。

4. 研究成果

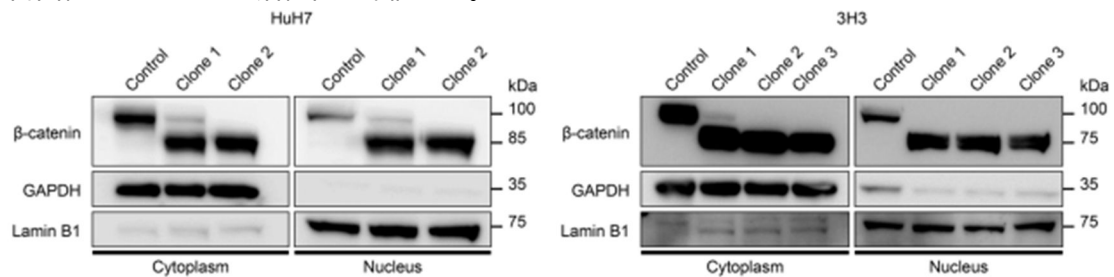
肝内胆管癌の臨床検体を用いて、免疫染色を実施。ARID1A negative/positiveにグループ分けを行い、予後との関連を検討したところ、ARID1A negativeグループにおいて、予後不良であった。



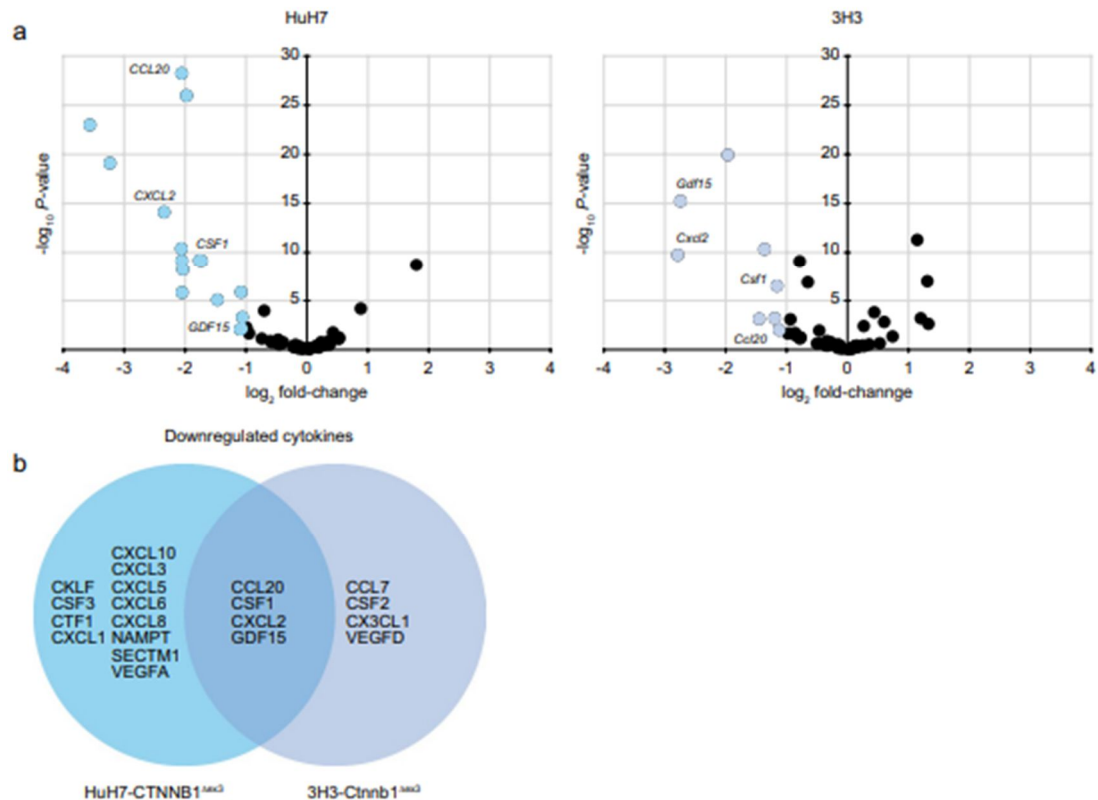
そこで、ヒト肝内胆管癌細胞株 HuCCCT-1、RBE において、ARID1A ノックアウト細胞株を作成した。その際には、CRISPR/Cas9 システムを使用した。さらに、ノックアウト細胞株において、ALDH1A1 の上昇を確認した。ARID1A は ALDH1A1 に対して、抑制的に働き、予後の悪化に寄与している。



さらに、今回使用した、CRISPR/Cas9 システムを応用し、肝細胞癌に関する免疫応答の検討を進めた。CTNNB1 (β -catenin) 変異サブタイプは、免疫抑制性の腫瘍微小環境を呈することが分かっており、その分子メカニズムに注目した。今回は、ヒト (HuH7) およびマウス (3H3) における肝細胞癌細胞株に関して、CTNNB1 ノックアウト細胞株を作成した。ノックアウト細胞株では、内因性 β -catenin の活性化を確認した。



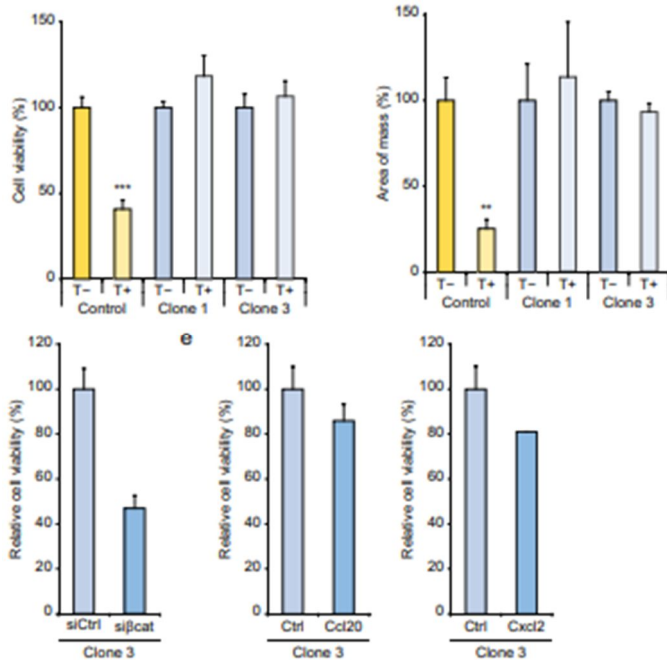
定量的 RT-PCR 解析にて、ヒトとマウスの内因性 β -catenin 活性化細胞株では、それぞれ 16 種類と 8 種類のサイトカインが顕著に抑制されていることを確認した。



そこで、ヒトとマウスの内因性 β -catenin 活性化細胞株を用いて、T 細胞殺傷に関して検討した。単球、T リンパ球を用いて、 β -catenin 活性化細胞株との共培養を行い、殺傷能を評価したところ、コントロール細胞株と比較し β -catenin 活性化細胞株においては細胞数の変化を認め

なかった。 β -catenin 活性化細胞株において、siRNA による β -catenin ノックダウンを行うと、T リンパ球による細胞殺傷能が回復することが確認でき、 β -catenin 活性化により免疫逃避応答が起きていることが分かった。

上記サイトカインのうち、CCL20、CXCL2 に注目し、同サイトカインを過剰発現させた内因性 β -catenin 活性化細胞株を作成し、同様に免疫応答反応を調べると、細胞数の減少が確認できた。T リンパ球による細胞殺傷能が回復することが示せた。



CRISPR/Cas9 システムを応用することで、肝細胞癌における、 β -catenin 活性化を促すことができ、そこから、免疫逃避のメカニズム解析につながった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Akasu Masafumi, Shimada Shu, Kabashima Ayano, Akiyama Yoshimitsu, Shimokawa Masahiro, Akahoshi Keiichi, Kudo Atsushi, Yamaoka Shoji, Tanabe Minoru, Tanaka Shinji	4. 巻 11
2. 論文標題 Intrinsic activation of β -catenin signaling by CRISPR/Cas9-mediated exon skipping contributes to immune evasion in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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/s41598-021-96167-0	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 -

〔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
---------	---------