

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15525

研究課題名(和文) 胃発がんにおけるARID1Aドライバー変異の影響

研究課題名(英文) Impacts of ARID1A driver mutation in gastric cancer development

研究代表者

藤木 亮次 (Ryoji, Fujiki)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40534516

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)：ARID1Aは胃がんを高頻度に変異を生じるがん抑制遺伝子であり、クロマチン構造調節の主要因子として多くの遺伝子発現の調節に関与している。しかし、特異的DNA配列への結合能は知られておらず、そのがん抑制能については多くの不明な点が残されていた。本研究では、この分子の機能発現にAP-1転写因子が介在することを見出した。ARID1A遺伝子を欠損させた胃上皮細胞ではAP-1の結合配列周辺でクロマチン構造の閉塞が観察され、周辺の胃上皮細胞の形質決定に関わる一部がん抑制遺伝子の抑制が見られた。従って、ARID1A機能喪失によるAP-1周辺のクロマチン構造異常が胃発がんに寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARID1A機能喪失変異は特に胃がんが多く見出され、免疫チェックポイント阻害薬やATR阻害薬などの効果が検証されているものの、今のところ決定的な治療法は確立されていない。その原因の一つには、ARID1Aの分子機能が多岐にわたり、その大部分が未だ解明されていないことが挙げられる。本研究はこれまでARID1A異常の創薬標的として注目されてきたDNA修復機構に加え、AP-1転写因子周辺のクロマチン構造の調節を下流遺伝子の発現制御に関与する可能性を示した。こうした新たな機構を担う責任因子が見つかることにより、新たな治療標的の発見や抗がん剤の創出などにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：ARID1A is one of the most frequently mutated gene in human gastric cancer. ARID1A regulates transcription of the downstream tumor suppressive genes through its ATP-dependent chromatin remodeling activity. However, since this factor has no DNA recognition activity, its tumor suppressive functions has long been unclear. In this study, we found AP-1 transcription factor was targeted by ARID1A and facilitated its genomic actions. In gastric epithelial GES1 cells, loss of ARID1A function strongly reduced chromatin accessibility around AP-1 binding motives, resulting in downregulations of their neighbor tumor suppressor genes in part related to epithelial cell morphology. Hence, ARID1A loss led to downregulation of tumor suppressor genes involved in epithelial cell maintenance and this may contribute to cancer development.

研究分野：分子生物学

キーワード：ARID1A クロマチンリモデリング エピジェネティクス がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ARID1A は胃がんで高頻度に機能喪失 (LOF) 変異が見られる代表的がん抑制遺伝子である。一方、ARID1A は SWI/SNF 複合体の構成因子としてゲノム領域特異的なクロマチン構造の弛緩と凝集を司り、細胞を特徴づける遺伝子発現ネットワークの構築に寄与することが知られていた。しかし、ARID1A を介するクロマチン制御の破綻と胃上皮細胞のがん化がどのように関連しているのか、依然として多くの不明な点が残されていた。

2. 研究の目的

SWI/SNF は ARID ドメイン因子 (ARID1A, ARID1B, ARID2) や ATP 加水分解酵素 (BRG1, BRM) など~15 程度の構成因子からなる巨大タンパク質複合体であり、時期・組織特異的なクロマチン構造と転写ネットワークの構築を担っている。しかし、ARID1A ほか SWI/SNF 複合体構成因子には特異的 DNA 配列への結合能は知られておらず、これら標的遺伝子の選別機構はよく分かっていない。そこで本研究では、ARID1A な機能発現に DNA 結合性転写因子の介在が必要と考え、それら因子群の同定を試みた (図 1)。本研究はこれら ARID1A 機能不全の背景にある責任分子を明らかにし、胃がん発症に至る分子病態の解明を目指すものである。



図 1: 本研究の目的。代表的ながん抑制遺伝子である ARID1A は、SWI/SNF 複合体の構成因子としてゲノム領域特異的なクロマチン構造の弛緩と凝集を司る。一方、その ATP 依存性クロマチンリモデリング活性を介することにより、周辺遺伝子の発現制御に関与している。本研究では、正常上皮細胞における ARID1A の機能と発がん初期に生じる分子病態の解明を目的として、SWI/SNF のゲノム作用点を規定する DNA 結合性転写因子の同定を試みた。図中の TF は DNA 結合性転写因子を表す。

3. 研究の方法

ヒト正常胃上皮 GES1 細胞は 10%ウシ胎児血清存在下の RPMI1640 中で培養した。これら細胞のゲノム編集には CRISPR-Cas9 技術を利用した。ARID1A など対象遺伝子の short guide RNA (sgRNA) のデザインには GPP sgRNA designer を利用し、それら配列を持つ合成塩基を pSpCas9(BB)-2A-Puro ベクターに挿入した。作成したベクターをリポフェクション法で GES1 細胞に導入し、48 時間後にピューロマイシン選択を開始した。さらに 48 時間の薬剤選別ののち、シングルセルソーティングによって単一細胞クローンシリーズを得た。それぞれクローン細胞の遺伝子ノックアウト (KO) の確認はウェスタンブロットティング法で行った。

ARID1A 機能を介する転写因子の探索を目的に、次世代シーケンシング (NGS) 技術を利用した横断的エピゲノム解析を行った。本研究での横断的エピゲノム解析とは、各種認識抗体を使ったクロマチン免疫沈降 (ChIP-Seq) 法、マイクロコッカスヌクレアーゼ (MNase) を使ったクロマチン構造の部分的リンカー-DNA 切断による MNase-Seq 法、Tn5 トランスポザターゼを使った弛緩状態のクロマチン断片化による ATAC-Seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin-Sequencing) 法、RNA-Seq 法によって得られた NGS データの統合解析を指す。簡単に、ChIP-Seq 法では GES1 細胞のクロマチンを 1%のホルマリウムで固定させ、超音波ないし MNase で部分切断することによって可溶化させた。ARID1A, ARID1B, ARID2 や BRG1, BRM, SNF5 など SWI/SNF 複合体主要構成因子、pol2, p300, CTCF など代表的転写制御領域の責任分子、あるいはヒストン H3 リシン 4 番目のトリ/モノメチル化修飾 (H3K4me3/me1)、H3 リシン 27 番目のアセチル化修飾 (H3K27ac) など代表的エピゲノムマーカーが集積しているゲノム DNA をそれぞれ特異的に認識する抗体で分離した。一方、MNase-Seq 法、ATAC-Seq 法では、GES1 細胞の細胞核を界面活性剤で単離したのち、ヌクレオソーム単位構造を持つゲノム DNA あるいは弛緩したクロマチン領域のゲノム DNA をそれぞれ MNase と Tn5 の部分消化によって得た。最後に、RNA-Seq 法では GES1 細胞から全 RNA を調製し、そこから市販キットを使って mRNA のみを単離したのち逆転写反応で cDNA を得た。最終的に得られた DNA 分子について、市販キットでライブラリ化したものを NGS 解析の鋳型として、それぞれ解析に応じて 2,000 万分子 (ChIP-Seq)、5,000 万分子 (ChIP-Seq)、2,000 万分子 (RNA-Seq) 程度の配列情報を取得した。

ChIP-Seq, ATAC-Seq のデータは GRCh38/hg38 をリファレンスとして bowtie2 でマッピングし、MACS2 でピーク検出した。RNA-Seq のデータは GRCh38/hg38 をリファレンスとして HISAT2 でマッピングし、stringtie を使って定量した。検出ピークのオーバーラップ解析や転写量の差分解析など NGS データのさらなる処理には、python3、perl、R などの言語とそれらに付随するパッケージを適宜利用して行った。抽出された領域に対するモチーフ解析には HOMER パッケージを利用した。

4. 研究成果

本研究では、胃がんの解析モデルに GES1 細胞を選んだ。この細胞においては、発がんウイルスの感染に伴って、DNA メチル化などエピゲノムコードの改変が行われる (Matsuzaka et al, J. Pathol, 2017)。また、一部の胃がん分子サブタイプの発症について、これらウイルス感染と ARID1A の LOF 変異が互いに密接な関係にあることが報告されていた (Wang et al, Nat Genet, 2011)。これらのことから、GES1 細胞は ARID1A LOF と胃がん発生の関係を解析するのに有力なモデルになると考えられた。

正常胃上皮 GES1 細胞における SWI/SNF 複合体のゲノム作用点を明らかにする目的で、ARID 因子や ATP 加水分解酵素、普遍的構成因子など SWI/SNF 構成因子の ChIP-Seq 解析を行った。これら SWI/SNF 構成因子について評価した結果、それぞれ 52,265 箇所 (ARID1A)、63,523 箇所 (ARID1B)、21,575 箇所 (ARID2)、49,932 箇所 (BRG1)、42,056 箇所 (BRM)、51,673 箇所 (SNF5) の標的領域が同定された。これら決定された領域をプロモーターないしエンハンサー領域に特徴的なエピゲノム修飾マーカ― (それぞれ H3K4me3 及び H3K4me1) で注釈付けした結果、ARID1A、ARID1B を含む SWI/SNF 複合体、いわゆる BAF 複合体は主にエンハンサーに、ARID2 を含む SWI/SNF 複合体、いわゆる PBAF 複合体は主にプロモーター領域周辺に集積していることが分かった (図 2A)。また、いずれの因子も活性化マーカ―である H3K27ac とオーバーラップが高く、BAF 複合体 (ARID1A/1B) はエンハンサー領域の、PBAF 複合体 (ARID2) はプロモーター領域の活性化維持に寄与している可能性が示唆された。加えて、転写開始点に集積する 38,722 箇所の Pol2 結合サイト、エンハンサー領域に集積する 9,429 箇所の p300 結合サイト、インスレーター領域に集積する 56,130 箇所の CTCF 結合サイトと比較した結果、BAF 複合体は p300 因子と共同在してエンハンサー領域の制御に、PBAF 複合体は pol2 因子と共同在してプロモーター領域の制御に関与していることが示された (図 2B)。特に、p300 はいわゆる普遍的転写共役因子であり、ゲノム領域の認識には DNA 結合性転写因子の存在が必須である。そこで、BAF 複合体と共同在している p300 結合サイトをモチーフ解析に供した結果、その近縁には AP-1 や TEAD などの転写因子の結合モチーフが有意に濃縮されていることが分かった (図 2C)。

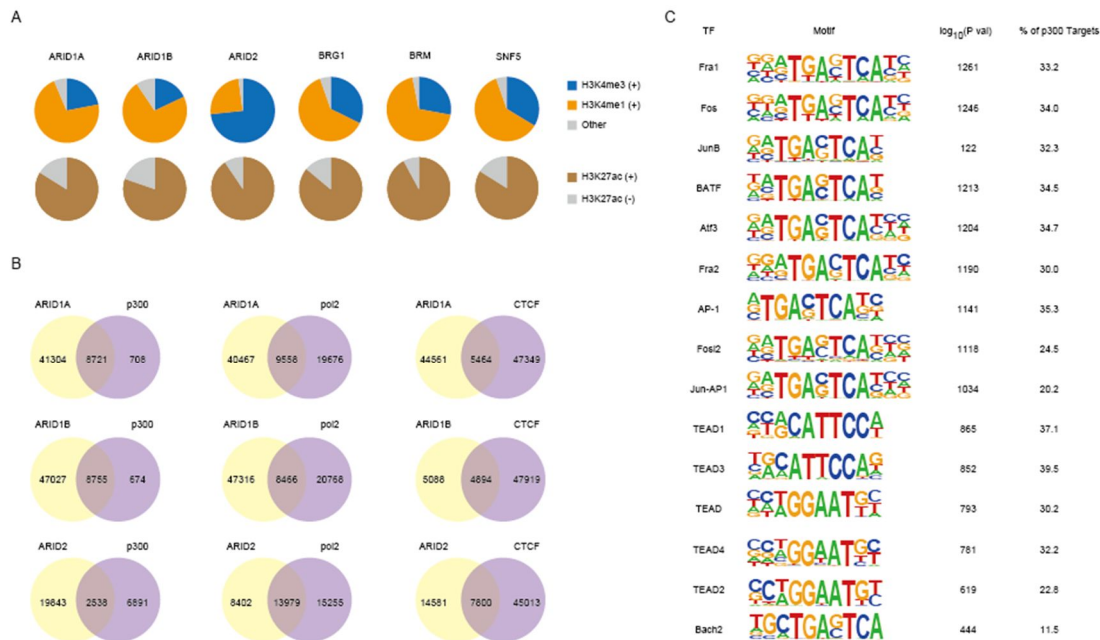


図 2: ARID1A は活性化エンハンサー領域に結合する。(A) エピゲノム修飾マーカ―による SWI/SNF 複合体結合領域の注釈付け。各 SWI/SNF 複合体構成因子の ChIP ピークとプロモーターマーカ― (H3K4me3 修飾) 並びにエンハンサーマーカ― (H3K4me1 修飾) のオーバーラップを算出した (A 上部/パネル)。同様に、活性化マーカ―修飾 (H3K27ac) との共同在を算出した (A 下部/パネル)。(B) ARID1A は p300 と共同在する。図に示した因子の ChIP ピークについて、それぞれオーバーラップを算出した。pol2 は RNA ポリメラーゼを標す。(C) ARID1A と p300 共同在領域に関するモチーフ解析。

これらモチーフ周辺における ARID1A の重要性を確認する目的で、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を利用して ARID1A など SWI/SNF 複合体構成遺伝子の KO GES1 細胞シリーズを樹立した (図 3A)。ARID1A KO 細胞の横断的エピゲノム解析から、AP-1 モチーフの近傍では ARID1A の LOF に伴って、活性化エピゲノム修飾マーカ―の減少とクロマチン構造の閉塞が観察された (図 3B)。同様に、これらの異常は BRG1 KO 細胞でも観察され、一方、ARID1B KO 細胞、ARID2 KO 細胞、BRM KO 細胞では見られなかった。以上の結果から、AP-1 モチーフの近傍のクロマチン構造は ARID1A 及び BRG1 を含む BAF 複合体によって制御されていることが示された。

さらに、ARID1A 機能が必要な下流遺伝子群を明らかにする目的で、ARID1A KO 細胞の RNA-Seq を行った。得られた転写プロファイル遺伝子セットエンリッチメント解析に供した結果、IFN α/γ 応答や上皮間葉系転換など、発がんに関わる遺伝子セットの転写異常が観察された (図 3C および D)。エピゲノム解析の結果と同様、こうした発現異常は BRG1 の LOF によって追試

され、ARID1B ないし ARID1B、BRM の欠損細胞では見られなかった。特に、これら発がんに関係する遺伝子の多くは AP-1 転写因子によって制御されることが知られている。また、胃癌症例では *ARID1A* と *BRG1* の AP-1 制御に重要と示唆された 2 つの遺伝子が高頻度に変異しており、*ARID1B*、*ARID2*、*BRM* では認められない。以上のことから、*ARID1A* は SWI/SNF 複合体と共に正常胃上皮細胞における AP-1 結合領域周辺のクロマチン構造の制御に不可欠であり、*ARID1A* LOF 変異と下流にあるがん抑制遺伝子の制御破綻の結果、細胞のがん化に寄与しているものと推察された。

TCGA データベースには 443 症例の胃癌組織の遺伝子型や遺伝子発現データが収録されている (TCGA research network, Nature, 2014)。これら生体データを使い、*ARID1A* LOF と AP-1 転写制御異常、さらにこれら異常と胃癌分子病態の関係性についてさらなる検証を試みた。まず、全エクソームシーケンシング (WXS) データに基づき、全症例の分子サブタイプと遺伝子型を決定した (図 4A)。すなわち、33 症例 (全体の 7.45%) から Epstein-Barr ウイルス由来 DNA が検出され、これらを EBV サブタイプに分類した。このうち 17 症例 (EBV サブタイプ症例の 51.5%) が *ARID1A* LOF 変異の保因者であった。同様に、マイクロサテライト領域 (MS) のリピート配列で不安定性が確認された 84 症例 (全体の 19.0%) を MSI サブタイプとし、そのうち 55 症例 (MSI サブタイプ症例の 65.5%) から *ARID1A* LOF 変異が検出された。概ね過去のとおり (Wang et al, Nat Genet, 2011)、EBV 及び MSI サブタイプ症例に占める *ARID1A* LOF 変異の割合は、それ他サブタイプ症例の値 (326 症例のうち 22 症例 (6.7%)) と比べて十分大きいことが分かった。

続いて、AP-1 標的の一つと考察された上皮間葉系転換関係遺伝子の発現について、実際の胃癌症例における *ARID1A* の機能喪失の影響を検証した。まず、*ARID1A* LOF 変異のアリル頻度 (VAF) と腫瘍含有率の関係を調べたところ、両者の値に正の相関は認められるものの、値として必ずしも一致していないことが分かった (図 4B)。このことは、*ARID1A* LOF 変異が発がんのごく初期に生じた症例と、サブクローンの一部に生じた症例があるものと考察している。そこで、*ARID1A* LOF の VAF と腫瘍含有率が近接していた症例と *ARID1A* 変異を持たない症例について、上皮間葉系転換関係遺伝子を対象に GSEA 解析と発現比較を行った。図に示した通り、*ARID1A* LOF 変異を持つ症例では持たない症例に比べて発現量が低下する傾向を持つことが分かった (図 4C)。同様に、*ARID1A* LOF 症例における AP-1 サイト周辺の ATAC-Seq シグナルは、持たない症例のものに比べて有意に低いことが分かった (図 4D)。

以上、*ARID1A* LOF と発がんについて、最も単純なシナリオとして次のモデルが考えられた。正常の胃上皮細胞では、*ARID1A* を含む SWI/SNF 複合体は AP-1 を足場にクロマチン構造を開くことにより、周辺遺伝子の発現調節を正に調節する。一方、発がんのごく初期に *ARID1A* LOF が生じると、周辺のクロマチン環境の閉塞を招き、がん抑制遺伝子の発現低下などの病的な状態を引き起こす。現在、*ARID1A* LOF を持つがん症例については、ATR 阻害薬などの適用が試されているものの、効果的な治療はまだ見つかっていない。本研究で得られた知見は AP-1 上で SWI/SNF 複合体と拮抗している因子の解明に繋がるなど、新たな治療法の開発に役立つ可能性がある。

投稿準備中のため図 3、4 は後日再提出の予定である

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 0件）

1. 著者名 Yamada Harumi, Takeshima Hideyuki, Fujiki Ryoji, Yamashita Satoshi, Sekine Shigeki, Ando Takayuki, Hattori Naoko, Okabe Atsushi, Yoshikawa Takaki, Obama Kazutaka, Katai Hitoshi, Kaneda Atsushi, Ushijima Toshikazu	4. 巻 532
2. 論文標題 ARID1A loss-of-function induces CpG island methylator phenotype	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 215587 ~ 215587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2022.215587	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤木亮次
2. 発表標題 ARID1Aドライバー変異によるDNAメチル化の異常蓄積ががん分子サブタイプの病態に与える影響
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤木亮次
2. 発表標題 ARID1Aドライバー変異によるDNAメチル化の異常蓄積ががん分子サブタイプの病態に与える影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------