

76. Living サンプルを用いたがん微小環境のエピゲノム解析

立石 敬介

東京大学 医学部 消化器内科学講座

Key words: 膵がん, エピゲノム, PDX

緒 言

難治がんの代表である膵がんにおいては Big4 と呼ばれる 4 種類のゲノム変異 (KRAS、TP53、CDKN2A、SMAD4) がほぼ共通してみられるが、そのいずれも治療標的とはなり難い。一方でエピゲノムプロファイルは腫瘍内部のがん細胞ごとに多様であり、ゲノム変異と共に腫瘍全体としての組織学的・分子学的不均一性を裏打ちする。筆者らは、がんにおけるヒストン修飾・DNA 脱メチル化機構の重要性に焦点を当てて研究を行ってきた¹⁻⁶⁾。また腫瘍微小環境についても、その重要性の検討を行ってきた^{7,8)}。

微小環境を含めた腫瘍組織のエピゲノムの変化を経時的かつ包括的に追跡することはその生物学的動態を理解する上で重要であるとともに新たな治療標的発掘にもつながる可能性があると考えられる。

方 法

いわゆる「がん細胞ごとのエピゲノムの不均一性」は腫瘍内微小環境からもたらされる外的シグナルの不均一性をも反映する可能性がある。その解析を行う上では、用いられるヒト腫瘍サンプルが生体内のがん微小環境を可能な限り再現する、生きたままの状態で整備されることが肝要であろう。

よって本研究においては、消化器がんの手術検体 (図 1A) から腫瘍の一部 (図 1B) を免疫不全マウスに移植し (図 1C)、生体内で継代・維持する腫瘍培養系 Patient-derived Direct Xenograft (PDX) を樹立した。PDX は原発巣の組織学的・分子学的特性をよく維持しうることが報告されている。自験例でも、がん細胞株の移植腫瘍は anaplastic で無構造を呈し、必ずしもヒト膵がんの腫瘍組織 (図 1E) を模倣しないが (図 1D)、PDX は由来する原発巣とほぼ同様の組織学的所見を維持していた (図 1F)。筆者らは数症例の PDX を樹立し、それらを用いて種々のエピゲノム阻害剤の効果スクリーニングを行った。

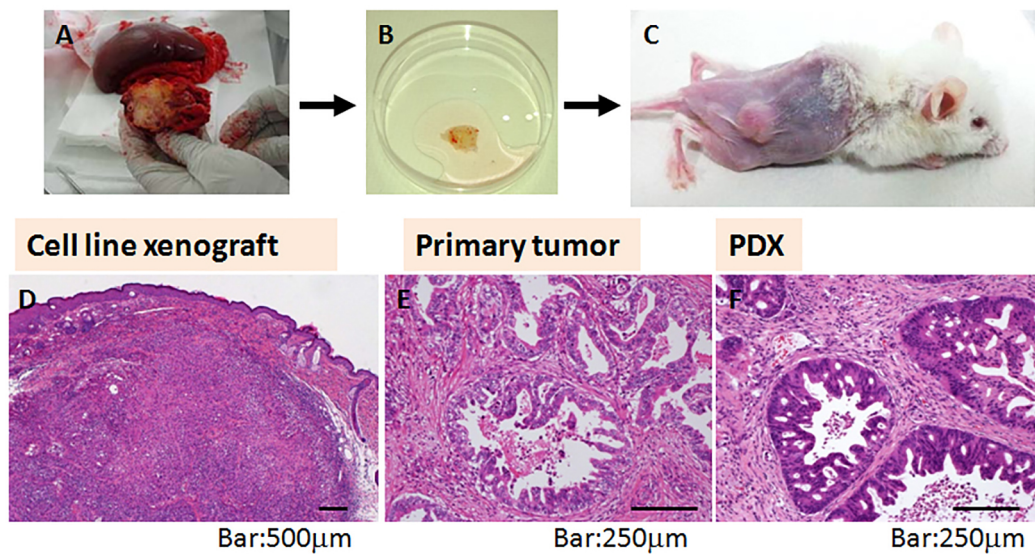


図 1. ヒト膵がん PDX の樹立

手術検体（図 1A）から腫瘍の一部（図 1B）を免疫不全マウスに移植し（図 1C）、PDX を樹立した。がん細胞株の移植腫瘍はヒト膵がんの腫瘍組織（図 1E）を模倣しないが（図 1D）、PDX は由来する原発巣とほぼ同様の組織学的所見を維持していた（図 1F）。

結 果

本研究ではクロマチン制御因子を標的とする低分子化合物 bromodomain and extraterminal (BET) タンパク阻害剤 (BETi) が膵がん PDX に対し腫瘍抑制効果を有することを見出し、報告した。[9\)](#)

1. BET インヒビター JQ1 の膵がんに対する抗腫瘍効果

マウス皮下で維持された二種類の PDX に対し、*in vivo* 条件にて JQ1 を投与したところ、JQ1 はいずれの PDX の腫瘍増殖も著明に抑制した（図 2A、B）。組織学的検討では膵がん細胞における増殖マーカー Ki67 の減少と共に間質組織、とくに腫瘍随伴性線維芽細胞 CAF と膠原線維沈着の減少が特徴的であった（図 2C）。ウエスタンブロットの結果でも増殖マーカーとしての PCNA や CyclinD の減少がみられた。次に PDX から膵がん細胞を単離培養し、*in vitro* にて JQ1 を投与したところ、*in vivo* における結果と対照的に PDX 由来の膵がん細胞に対する抗腫瘍効果はわずかであった。この知見から JQ1 による *in vivo* での抗腫瘍効果は膵がん細胞自身に対するものではない可能性が示唆された。

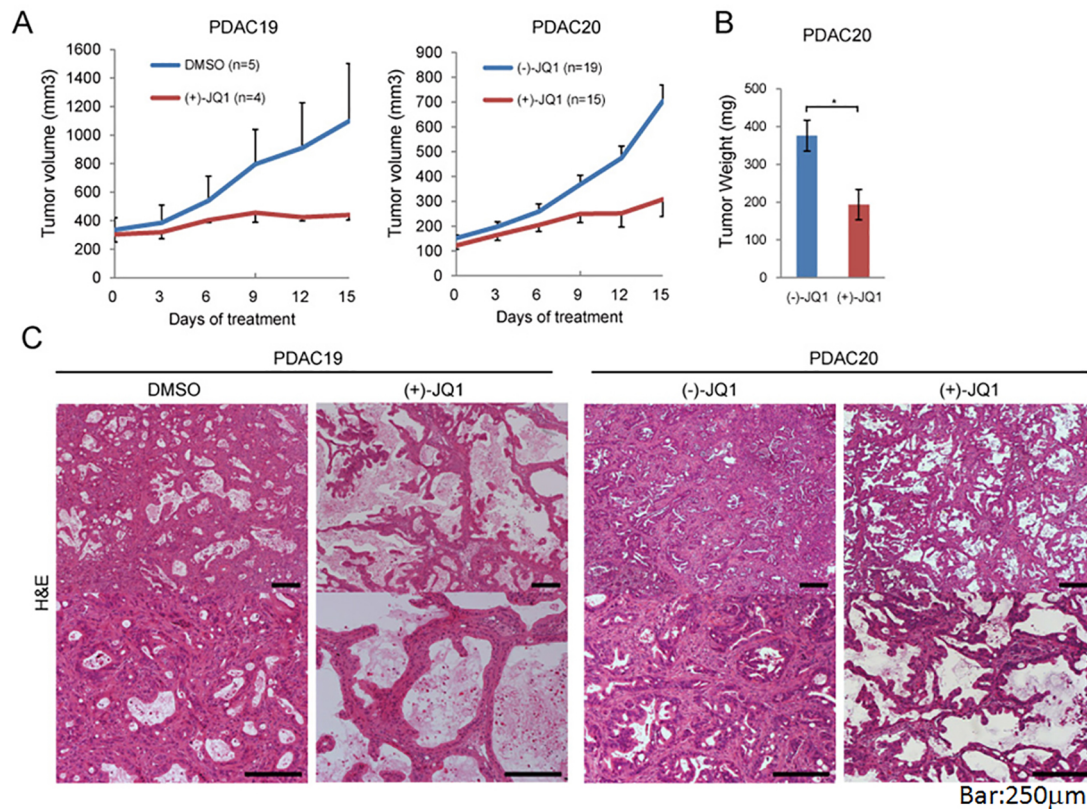


図 2. BETinhibitor のヒト膵がん PDX に対する抗腫瘍効果

JQ1 はマウス皮下で維持された PDX の腫瘍増殖を抑制した (図 2A、B)。組織学的検討では間質組織の減少が特徴的であった (図 2C)。The two-sided Student's *t*-test, $P < 0.05$. 文献 9 からの抜粋改変。

2. CAF に対する JQ1 の効果

次に JQ1 による *in vivo* での抗腫瘍効果の標的候補として CAF に着目し、*in vitro* で培養し JQ1 を投与したところ、JQ1 は CAF の増殖にも影響を与えなかった。しかしながら CAF の活性化マーカーである α -SMA の発現を著しく抑制した。この抑制は *in vivo* で JQ1 が投与された PDX においても同様にみられた (図 3A)。活性化された CAF は細胞外マトリックスや炎症性サイトカイン、増殖因子を産生して、膵がん組織におけるいわゆる Desmoplastic change を引き起こし、膵がん細胞の増殖や生存に寄与する微小環境を形成すると考えられている。JQ1 がこの CAF の活性化に与える影響を調べるために、定量的 PCR を用いて JQ1 投与が細胞外マトリックスや炎症性サイトカイン、増殖因子の遺伝子発現に影響するかどうかを検討した。その結果、COL1A1 のような基質マトリックス、IL6、CCL2 などのサイトカイン、FGFs、EGF、PDGF などの増殖因子をコードする遺伝子群の発現が JQ1 によって有意に抑制されることが明らかとなった。これらの発現低下は *in vivo* の PDX の組織においても再現された (図 3B)。

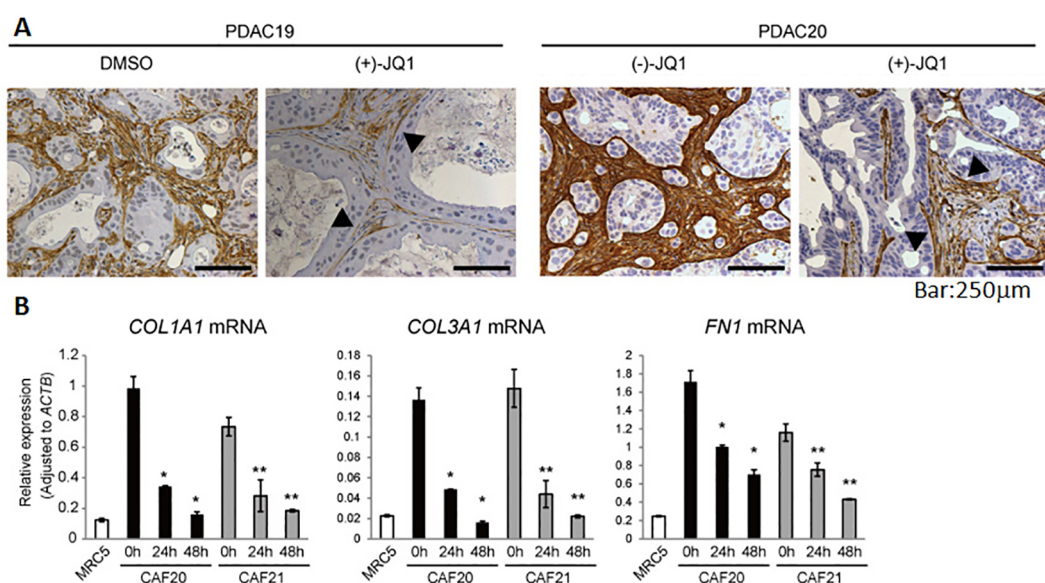


図 3. BETinhibitor による CAF の不活性化

JQ1 は CAF の活性化マーカーである α -SMA の発現を著しく抑制した (図 3A)。JQ1 は COL1A1 など基質マトリックスの遺伝子発現を有意に抑制した (図 3B)。The two-sided Student's *t*-test, $P < 0.05$. 文献 9 からの抜粋改変。

3. JQ1 による CAF 不活性化を介した膵がん細胞への影響

JQ1 による CAF 不活性化が膵がん腫瘍組織内で膵がん細胞に与える影響を調べる目的で、膵がん細胞と CAF の共培養系を用いた。JQ1 処理の有無でそれぞれ培養した CAF の培養上清を膵がん細胞に添加した。通常の培地で培養された CAF の培養上清は膵がん細胞において ERK、AKT、STAT3 の増殖シグナル活性化を誘導した。一方で JQ1 処理された CAF の培養上清では膵がん細胞でのそれらのシグナルの誘導は減弱し、同時に膵がん細胞自身の増殖も通常の CAF に比べて減少していた。これらのことは CAF の活性化が膵がん細胞の増殖にパラクリンに寄与することを示すと同時に、JQ1 による CAF の不活化がその作用を阻害しうることを示していた。

4. Hedgehog と TGF β pathways の阻害を介した JQ1 の CAF 不活性化

Hedgehog と TGF β /SMAD3 経路はいずれも CAF の活性化に重要なシグナル系として報告されている。JQ1 の CAF 不活性化がこれらのシグナルに与える影響についてクロマチン免疫沈降を用いて検討した。まず Hedgehog シグナルの標的遺伝子である GLI1 について JQ1 は発現を有意に抑制した。BRD4 が GLI1 の転写を制御することは報告されているが、JQ1 はその BRD4 の GLI1 プロモーターへの結合を阻害した。また TGF β は SMAD3 を介して COL1A1 や IL6 などの発現を制御するが、JQ1 はその発現誘導を阻害した。クロマチン免疫沈降においても JQ1 は TGF β シグナル活性化下において BRD4 の COL1A1 や IL6 遺伝子プロモーターへの結合を阻害した。さらに興味深いことに、SMAD3 自体の COL1A1 や IL6 プロモーターへの結合も阻害されることが明らかとなった。

考 察

本研究では、BET たんぱく質の阻害によるヒト膵がん PDX に対する *in vivo*での抗腫瘍効果について検討した。その抗腫瘍効果の分子機構として、このエピゲノム分子阻害薬は、膵がんの豊富な腫瘍間質増生に中心的働きを示す活性化線維芽細胞の TGF β および Hedgehog シグナル依存性の遺伝子発現を抑制し、その活性化を阻害することを見出した。BET たんぱく質の阻害薬は各種がんにおいて臨床試験が試みられており、今後膵がんについても応用可能となる可能性があるが、この研究成果はその proof of concept の一つとなりうると考えられる。

本研究を進めるにあたり、多大なご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

共同研究者

本研究の共同研究者は東京大学消化器内科の山本恵介である。

文 献

- 1) Tateishi K, Ohta M, Kanai F, Guleng B, Tanaka Y, Asaoka Y, Tada M, Seto M, Jazag A, Lianjie L, Okamoto M, Isayama H, Tada M, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Dysregulated expression of stem cell factor Bmi1 in precancerous lesions of the gastrointestinal tract. *Clin Cancer Res*. 2006 Dec 1;12(23):6960-6. PMID: 17145814.
- 2) Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, Fang J, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, Taylor-Papadimitriou J, Tempst P, Zhang Y. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell*. 2007 Mar 23;25(6):801-12. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.001.
- 3) Lin LJ, Asaoka Y, Tada M, Sanada M, Nannya Y, Tanaka Y, Tateishi K, Ohta M, Seto M, Sasahira N, Tada M, Kawabe T, Zheng CQ, Kanai F, Ogawa S, Omata M. Integrated analysis of copy number alterations and loss of heterozygosity in human pancreatic cancer using a high-resolution, single nucleotide polymorphism array. *Oncology*. 2008;75(1-2):102-12. doi: 10.1159/000155813.
- 4) Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci*. 2012 Apr;103(4):670-6. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02213.x.
- 5) Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Aburatani H, Omata M, Koike K. Histone demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013 Oct;34(10):2380-8. doi: 10.1093/carcin/bgt174.
- 6) Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Nakai Y, Isayama H, Ikenoue T, Kurokawa M, Fukayama M, Kokudo N, Omata M and Koike K. Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBP α . *Carcinogenesis*. 2014 Nov;35(11):2404-14. doi: 10.1093/carcin/bgu136.
- 7) Guleng B, Tateishi K, Ohta M, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Tanaka Y, Washida M, Morikane K, Fukushima Y, Yamori T, Tsuruo T, Kawabe T, Miyagishi M, Taira K, Sata M, Omata M. Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. *Cancer Res*. 2005 Jul 1;65(13):5864-71. PMID: 15994964.
- 8) Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Bieri B, Tada M, Mohri D, Miyabayashi K, Asaoka Y, Maeda S, Ikenoue T, Tateishi K, Wright CV, Koike K, Omata M, Moses HL. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):4106-17. doi: 10.1172/JCI42754.
- 9) Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Hoshikawa M, Tanaka M, Nakatsuka T, Fujiwara H, Miyabayashi K, Takahashi R, Tanaka Y, Ijichi H, Nakai Y, Isayama H, Morishita Y, Aoki T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N, Fukayama M, Koike K. Stromal remodeling by the BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses the progression of human pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016 Sep 20;7(38):61469-61484. doi:10.18632/oncotarget.11129. PubMed PMID: 27528027.