91　膵発癌におけるクロマチン制御因子Arid1Aの役割	福田　晃久

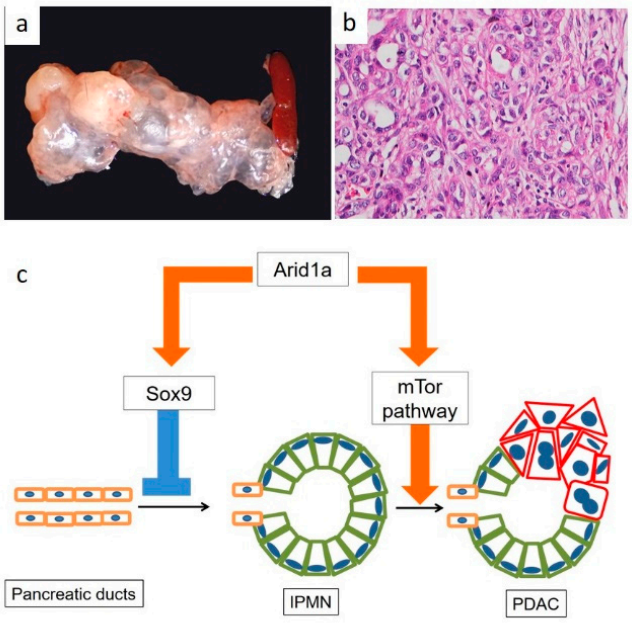
【目的】ヒト膵癌においては SWI/SNF 複合体の中で *ARID1A* に最も高頻度に不活化変異（約 7%）が認められることから、Arid1a が癌抑制的に働く可能性が示唆されていたが、膵発癌における Arid1a の詳細な機能的役割はこれまで不明であった。本研究は、SWI/SNF 複合体の DNA 結合能を持つサブユニットである Arid1A に焦点を当てて、膵発癌における Arid1A の機能的役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】膵特異的に $Kras^{G12D}$ を発現させ、*Arid1A* を K.O. したマウス（$Ptf1a^{Cre/+};Kras^{LSL\text{-}G12D};Arid1A^{flox/flox}$）を作製、解析した。ヒト膵癌、膵管内乳頭状粘液性腫瘍（IPMN）の病理組織標本を用いて免疫染色解析を行った。

【結果】Arid1a がマウス膵において膵管細胞の分化を維持し、IPMN ならびに IPMN 由来膵癌の発生を抑制していることが明らかになった。*Arid1a* の欠失によって、膵管細胞が脱分化して可塑性を獲得し、IPMN および IPMN 由来膵癌が生じることをマウスの個体レベルで初めて明らかにした。さらに、分子メカニズムとして、膵管細胞の脱分化には Sox9 の発現低下が、IPMN からの膵発癌には mTOR pathway が、それぞれ寄与していることを明らかにした。さらに、本研究により導き出された IPMN・IPMN 由来膵癌の新規マウスモデルを用いて、IPMN の起源細胞が膵管細胞であること、および IPMN からの膵がん発生のメカニズムを明らかにした。

本研究は、膵発癌におけるクロマチン制御因子 Arid1a の役割を明らかにしたのみならず、本研究の IPMN および IPMN 由来膵癌の新規遺伝子改変マウスモデルは、今後の IPMN および IPMN 由来膵癌の研究における有力なツールになり得ると考えられる。

Arid1a は膵管内乳頭状粘液性腫瘍（IPMN）および IPMN 由来膵癌の形成を抑制する



91. 膵発癌におけるクロマチン制御因子 Arid1a の役割

福田　晃久

京都大学 医学部附属病院 消化器内科

Key words：膵臓がん，IPMN，エピジェネティクス，クロマチンリモデリング，起源細胞

緒　言

膵癌は予後不良の難治性癌で、主に PanIN（pancreatic intraepitherial neoplasia）、嚢胞性病変の IPMN（intraductal papillary mucinous neoplasm）の 2 つの異なる前癌病変から発生する（図 1）。そのなかで、IPMN 由来膵癌は PanIN 由来膵癌に比して比較的予後が良いことが知られており、両者は生物学的に異なると考えられてきた。マウスにおいて PanIN は膵腺房細胞由来であることが示されているが、IPMN と IPMN 由来膵癌に関しては、その起源細胞と発生の分子機構は未だ十分に分かっていない。

一方、エピジェネティックスによる遺伝子発現制御が発がんに重要な役割をもつことが明らかになりつつある。特にクロマチンリモデリングに関与する複合体である SWI／SNF 複合体（図 2）は、近年の網羅的遺伝子解析の研究から、多くの癌種でその構成成分の不活化遺伝子変異が多数報告され、癌との関連が強く示唆される。ヒト膵癌においては、約 15%の頻度で SWI/SNF 複合体の遺伝子変異が報告された［1］。

我々は、SWI/SNF 複合体因子 Brg1 に着目し、Brg1 によるエピジェネティックな遺伝子発現制御が膵癌の発生に重要な働きをはたしているという仮説を立て、膵癌の発生における Brg1 の役割を明らかにするため、膵特異的に KrasG12D を発現させ、さらに Brg1 を K.O.したマウス（*Ptf1a*$^{Cre/+}$*; Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$*; Brg1*$^{f/f}$）を作製、解析した。その結果、IPMN 様の膵嚢胞性病変および膵癌が生じることを見出し、Brg1 が IPMN および IPMN 由来膵癌の発生を抑制していることを明らかにした［2］。

一方、ヒト膵癌では SWI/SNF の遺伝子変異は BRG1 以外のサブユニットにも多く存在し、特に DNA 結合ドメインを持つ *ARID1A* は、ヒト膵癌で最も高頻度（約 7%）に変異が認められる。そこで、我々は「Arid1A は膵発癌を抑制する」と考え、膵発癌における Arid1A の機能的役割を解明するべく、これまで研究を進めてきた。我々は、膵特異的に KrasG12D を発現させ、*Arid1A* を K.O.したマウス（*Ptf1a*$^{Cre/+}$*; Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$*; Arid1A*$^{flox/flox}$）を作製、解析した結果、*Ptf1a*$^{Cre/+}$*; Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$*; Arid1A*$^{flox/flox}$ マウスに IPMN 様の膵嚢胞性病変、さらに膵癌が生じることを見出しており（図 3）、Arid1A が IPMN および IPMN 由来膵癌の発生を抑制している可能性が示唆された。

さらに、Sox9 は膵管細胞に発現し、膵管細胞の分化に重要な転写因子であるが、我々は、*Ptf1a*$^{Cre/+}$*; Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$*; Arid1A*$^{f/f}$マウスに生じる IPMN 病変において、免疫染色の結果で Sox9 の発現が著明に低下していることを見出した。そこで、「Sox9 の発現低下が、*Arid1a* KO 膵管細胞からの IPMN 病変の形成に寄与する」と仮説し、Sox9 過剰発現マウスを用いた実験により、*Aird1A* 欠損により IPMN が発生する分子メカニズムについて検証した。

以上の背景より、本研究は、SWI/SNF 複合体の DNA 結合能を持つサブユニットである Arid1A に焦点を当てて、膵発癌における Arid1A の機能的役割を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. *Ptf1a*$^{Cre/+}$*; Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$*; Arid1A*$^{f/f}$マウスにおける膵嚢胞性病変とヒト IPMN との類似性の検討

1）膵管からの色素注入および組織像にて、IPMN に特徴的な膵嚢胞性病変と膵管と交通性を調べる。MCN に特異的な ovarian stroma の有無、エストロゲンレセプターα、プロゲストロンレセプターの染色を行い、MCN とは異なることを確認した。

2）IPMN の特徴について、各種ムチン（Muc1、Muc2、Muc5AC）、Cdx2 等の染色を行った。

2. *Ptf1a*$^{Cre/+}$;*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$マウスにおける膵嚢胞性病変が前癌病変であるかの検討

Ptf1a$^{Cre/+}$;*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$マウスを生後 9、18、45 週で解析し、IPMN の多段階的な low・high grade dysplasia の進行、膵癌の発症率・予後・癌の浸潤や転移の有無について解析した。

3. 膵外分泌細胞 or 膵管細胞特異的 CreER マウスを用いた IPMN の起源細胞の解明

成体マウスの膵臓において、*Hnf1β* は膵管細胞特異的に、*Ptf1a* は腺房細胞特異的に発現していることから、*Hnf1β*^{CreER};*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$マウスと *Ptf1a*^{CreER};*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$マウスとを作製する。タモキシフェンを投与し、数ヶ月後に各々のマウスで IPMN 様病変が形成されるかどうか検討し、IPMN の起源となる細胞を明らかにした。

4. IPMN 発生の分子メカニズムの検討（*Arid1A* K.O.細胞の網羅的な遺伝子発現解析）

1）上記の実験で膵管細胞が IPMN の起源細胞であった場合、*Ptf1a*$^{Cre/+}$;*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$マウスと wild type マウスの膵臓から MACS（magnetic-activated cell sorting）を用いて膵管細胞を選択的に単離し、膵管細胞の 3 次元培養を行い、嚢胞（IPMN）様の構造をとるか観察した。

2）単離した膵管細胞に対してマイクロアレイを用いた *Arid1A* K.O.細胞の網羅的な遺伝子発現解析を行う。発現量に大きな差異が認められた遺伝子について、培養膵管細胞において薬物、RNAi などによりその発現量を変化させ、その遺伝子の機能解析を行った。

5. Arid1A による膵管細胞転写因子 Sox9 の発現制御と IPMN 形成における Sox9 の役割の解析

1）上記の *Arid1A* K.O.細胞のマイクロアレイと RT-PCR で Sox9 発現が低下しているか検証した。

2）*Ptf1a*$^{Cre/+}$;*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$マウスに生じる IPMN 病変において、Sox9 免疫染色を行い Sox9 の発現が低下しているか検証した。

3）Sox9 の過剰発現マウス（*Sox9 OE*）と *Ptf1a*$^{Cre/+}$;*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$マウスとを掛け合わせ、*Ptf1a*$^{Cre/+}$;*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$;*Sox9 OE* マウスを作製する。*Ptf1a*$^{Cre/+}$;*Kras*$^{LSL\text{-}G12D}$;*Arid1A*$^{f/f}$;*Sox9 OE* マウスで IPMN 病変が形成されるか、レスキューされるか検証した。

6. ヒト IPMN と IPMN 由来膵癌における ARID1A 発現の検討

ヒト IPMN と IPMN 由来膵癌病変における ARID1A の発現について、京大病院肝胆膵移植外科で行われたヒト術後標本を用いて ARID1A 免疫染色にて解析した。

結　果

1. Arid1a は膵管細胞の分化を維持し、IPMN および IPMN 由来膵癌の発生を抑制する

初めに、膵特異的 *Arid1a*KO マウス（*Ptf1a-Cre; Arid1a*$^{f/f}$マウス）を作製、解析した結果、生後 18 週以降で膵管に嚢胞様の拡張が認められたが、嚢胞様に拡張した膵管上皮には異型細胞は認められず、*Arid1a* の KO のみでは膵腫瘍の形成には至らないことが示された。次に、膵特異的に Kras を活性化すると同時に Arid1a を KO させた *Ptf1a-Cre; Kras*^{G12D};*Arid1a*$^{f/f}$マウスを作製、解析した。その結果、生後 9 週までに膵臓に粘液産生性の多房性嚢胞性病変が多数形成された。これらの膵嚢胞性病変は組織学的に膵管との交通を有しており、免疫組織学的解析からヒトにおける分枝型 IPMN に類似した病変であることが示された（図 1a）[3]。

次に、これらマウス IPMN 様病変から膵癌が発生するかどうか検討した。生後 24 週では *Ptf1a-Cre; Kras*^{G12D};*Arid1a*$^{f/f}$マウスに IPMN からの膵癌の発生は認められなかったが、生後 48 週では 20%のマウスに IPMN 由来の膵癌の発生が認められた（図 1b）。一方、コントロールの *Ptf1a-Cre; Kras*^{G12D}マウス、*Ptf1a-Cre; Kras*^{G12D};*Arid1a*$^{f/+}$マウスには生後 44～48 週においても膵癌の発生は認められなかった。以上の結果から、活性化 Kras の存在下において、Arid1a が膵臓で Brg1 と同様に、IPMN および IPMN 由来膵癌の発生を抑制していることが明らかになった［3］。

次に、*Arid1a* KO によって生じる IPMN の起源細胞について検討を行った。膵腺房細胞に特異的な Cre を発現する *Ptf1a-CreERT* マウスに活性化 Kras を導入し *Arid1a* を KO させたマウスでは IPMN の発生は認められず、一方、膵管細胞に特異的な Cre を発現する *Hnf1b-CreERT* マウスに活性化 Kras を導入し *Arid1a* を KO させたマウスでは

IPMN が生じた。以上より、Arid1aKO により形成される IPMN モデルにおいて、膵管細胞がその起源であることが明らかになった。

さらに、*Arid1a*KO によるマウス IPMN の分子病理学的特徴について免疫染色を用いて検討した。その結果、正常膵管において高発現し、膵管上皮の分化に重要な転写因子である Sox9 の発現が著明に低下していることが明らかになった。そこで膵管からの IPMN 発生における Arid1a と Sox9 の機能的関係を明らかにするため、培養膵管細胞を用いた検討を行った。マウス膵から膵管細胞を単離・培養し、*Arid1a* を KO し、遺伝子発現の変化を解析した。その結果、*Arid1a* を KO した膵管細胞では、コントロール群と比較して Sox9 の発現が有意に低下するとともに、膵前駆細胞マーカーの発現が上昇し、膵管細胞が脱分化傾向にあることが示された。さらに、培養膵管細胞において *Arid1a* を KO すると同時に Sox9 を強制発現させた結果、*Arid1a*KO による遺伝子発現の変化はキャンセルされた。以上より、*Arid1a*KO は Sox9 の発現低下を介した膵管細胞の脱分化を引き起こし、腫瘍化に寄与することが示された。

2. Arid1a は mTOR pathway の活性化に重要である

一方、興味深いことに、*Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; Arid1a$^{f/f}$*マウスにおける膵癌発症の頻度は、SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の別の必須因子である *Brg1* を KO した *Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; Brg1$^{f/f}$*マウスよりも低かったため、IPMN からの膵発癌に関わる因子についてさらに検討を行った。両方のマウスの IPMN における遺伝子発現を網羅的に比較解析した結果、*Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; Arid1a$^{f/f}$*マウスにおいて mTOR pathway の活性が *Ptf1a-Cre; Kras^{G12D}; Brg1$^{f/f}$*マウスに比べて相対的に低いことが示された。

最後に、ヒト通常型膵管癌と IPMN における ARID1A と SOX9、mTOR pathway の下流因子である pS6 の発現について免疫染色を用いて相関関係の検討を行った。その結果、ARID1A の発現はそれぞれ 36%と 22%において消失しており、ARID1A の発現が見られなかった群では両者とも SOX9 と pS6 の発現が低下しており、ヒト通常型膵癌と IPMN において、ARID1A と SOX9、pS6 の発現に正の相関性が認められた。以上より、Arid1a がマウス膵において膵管細胞の分化を維持し、IPMN ならびに IPMN 由来膵癌の発生を抑制していることが明らかになり、膵管細胞の脱分化には Sox9 の発現低下が、IPMN からの膵発癌には mTOR pathway が、それぞれ関与していることが示された（図 1c）。

考　察

ヒト膵癌においてはSWI/SNF複合体の中でARID1Aに最も高頻度に不活化変異（約7%）が認められることから、Arid1aが癌抑制的に働く可能性が示唆されるが、膵発癌におけるArid1aの詳細な機能的役割はこれまで不明であった。本研究では、Arid1aの膵発癌における機能的役割を、マウスを用いた研究により、初めて解明した。即ち、Arid1aがマウス膵において膵管細胞の分化を維持し、IPMNならびに IPMN由来膵癌の発生を抑制していることが明らかにした。*Arid1a*の欠失によって、膵管細胞が脱分化して可塑性を獲得し、IPMNおよびIPMN由来膵癌が生じることをマウスの個体レベルで初めて明らかにした（図1c）[3]。さらに、分子メカニズムとして、膵管細胞の脱分化にはSox9の発現低下が、IPMNからの膵発癌にはmTOR pathwayが、それぞれ寄与していることを明らかにした。さらに、本研究により導き出されたIPMN・IPMN由来膵癌の新規マウスモデルを用いて、IPMNの起源細胞、およびIPMNからの膵がん発生のメカニズムを明らかにした。

本研究のIPMNおよびIPMN由来膵癌の新規遺伝子改変マウスモデルは、今後のIPMNおよびIPMN由来膵癌の研究における有力なツールになり得ると考えられる。

本研究は、膵発癌におけるクロマチン制御因子Arid1aの役割を明らかにしたのみならず、今後、SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体やArid1aを標的とした膵癌・IPMNの新規治療法につながる可能性、またArid1aが膵臓の嚢胞性病変の新規マーカーとして開発につながる可能性があり、今後のさらなる研究が期待される。

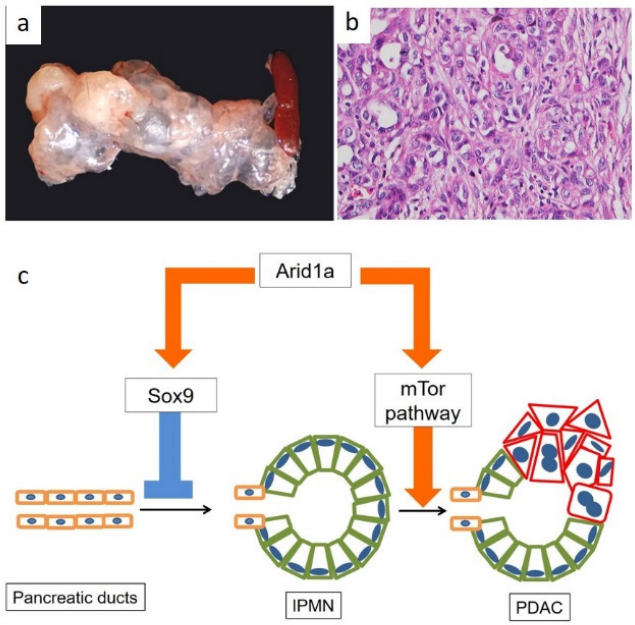


図 1. Arid1a は膵管内乳頭状粘液性腫瘍（IPMN）および IPMN 由来膵癌の形成を抑制する

a) 膵特異的に $Kras^{G12D}$ を活性化し、*Arid1a*KO を加えたマウスに生じたヒト IPMN 様の膵嚢胞性病変。

b) 同マウスに生じた IPMN 由来膵癌。

c) まとめのモデル図。

共同研究者・謝辞

本研究論文の筆頭著者は、京都大学大学院医学研究科消化器内科の木村佳人、および共同研究者は、京都大学大学院医学研究科消化器内科の妹尾浩教授、千葉勉（前教授）、小川智、丸野貴久、津田喬之、生田耕三、高田裕、平松由紀子、荒木理、長尾宗政、吉川貴章、吉岡拓人、京都大学大学院医学研究科肝胆膵移植外科の上本伸二教授、高折恭一 准教授、岐阜大学医学部整形外科の秋山治彦教授、Department of Cardiac Surgery、Cardiovascular Research Center、University of Michigan の Zong Wang 教授、Program in Developmental Biology and Department of Cell and Developmental Biology、Vanderbilt University School of Medicine の Christopher V. Wright 教授である。

文　献

1) Bailey P, Chang DK, Nones K, Johns AL, Patch AM, Gingras MC, et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. Nature. 2016;531(7592):47-52. doi: 10.1038/nature16965. PubMed PMID: 26909576.

2) von Figura G, Fukuda A, Roy N, Liku ME, Morris Iv JP, Kim GE, et al. The chromatin regulator Brg1 suppresses formation of intraductal papillary mucinous neoplasm and pancreatic ductal adenocarcinoma. Nat Cell Biol. 2014;16(3):255-67. Epub 2014/02/25. doi: 10.1038/ncb2916. PubMed PMID: 24561622.

3) Kimura Y, Fukuda A, Ogawa S, Maruno T, Takada Y, Tsuda M, et al. ARID1A Maintains Differentiation of Pancreatic Ductal Cells and Inhibits Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. Gastroenterology. 2018;155(1):194-209 e2. Epub 2018/04/01. doi: 10.1053/j.gastro.2018.03.039. PubMed PMID: 29604291.