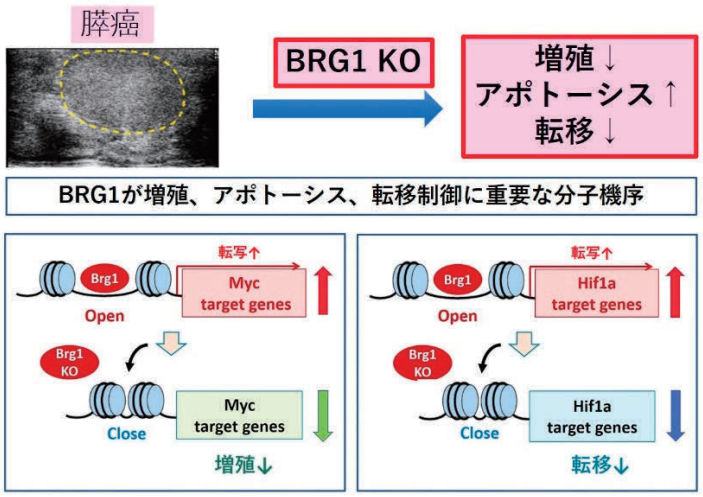
60　膵癌の進行・転移におけるクロマチン制御因子の役割	福田　晃久

【目的】膵癌は予後不良な最難治性癌で、新規治療法開発は喫緊の課題である。我々は、SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の中で必須ATPase ユニットとして働くクロマチンリモデリング因子 BRG1 に着目し、世界に先駆けて、膵癌における BRG1 の機能的役割をこれまで解明してきた（Nat Cell Biol 2014, J Clin Invest 2018）。我々は、①BRG1/SOX9 経路が、膵癌の形成促進に働き、BRG1 が SOX9 のプロモーターに直接結合して発現を促進することから、SOX9 が BRG1 の下流の鍵分子であること、②*BRG1* ノックアウト（KO）により、既に形成された膵前がん病変がアポトーシスをきたして退縮すること、③BRG1/SOX9 経路はヒト膵癌においても保存されていることを見出した（J Clin Invest. 2018）。本研究では、既に形成された膵癌の増殖と転移における Brg1 の機能的役割を解明することを目的とした。

【方法】Dual recombinase システムを用いて、膵特異的に Kras 変異と p53 欠失を導入し、かつ形成された膵癌においてタモキシフェン投与により任意の時期に *Brg1* を KO できる独自の膵癌モデルマウスを作製した。

【結果】*Brg1* KO により膵癌細胞の増殖が低下し、アポトーシスが増加し、自然発症の膵癌モデルマウスの個体レベルでも膵癌の増大が有意に抑制された。転移能に関しては、脾臓移植肝転移モデルおよび腹腔内移植モデルにおいて、*Brg1* KO により転移能が著しく抑制され、Brg1 が転移巣の形成に必須であることが明らかになった。さらに、Brg1 が膵癌細胞の幹細胞性、生存（アポトーシス回避）に重要であることが示された。網羅的遺伝子解析の結果、*Brg1* KO した膵癌細胞では hypoxic pathway の発現が著しく減少しており、Hif1a が標的遺伝子に結合して Hif1a の標的遺伝子を発現させるのに Brg1 が重要であることが示された。以上より、Brg1 は膵癌の幹細胞性、増大、転移巣形成に重要な働きをしていること、そのメカニズムとしては Brg1 による cMYC および Hif 経路の発現制御によるものであることが明らかになった。またヒト膵癌組織標本の免疫染色の結果、ヒト膵癌の約 8 割では BRG1 を発現していることが示された。以上の取り組みから、BRG1 が膵癌に対する有力な新規創薬・治療ターゲットになり得ることが明らかになった。さらに、既に形成されたヒト膵癌に対する BRG1 遮断効果を検討し、ヒト膵癌における治療標的としての妥当性をさらに検証した。その結果、BRG1 を発現しているヒト膵癌細胞、ヒト膵癌オルガノイドに対して、CRISPR/Cas9 による *BRG1* KO を行った結果、BRG1 阻害によりヒト膵癌細胞、ヒト膵癌オルガノイドの増殖が抑制された。

クロマチン制御因子 BRG は膵癌の進行、転移に重要な働きをする



60. 膵癌の進行・転移におけるクロマチン制御因子の役割

福田　晃久

京都大学 医学部附属病院 消化器内科

Key words：膵癌，転移，マウスモデル，オルガノイド

緒　言

我々は最近、①「BRG1/SOX9 経路」が、ヒト膵癌の大多数を占める、「膵腺房細胞を起源」とする「PanIN 由来の通常型膵癌」の形成には必須であり、BRG1 が SOX9 のプロモーターに直接結合して発現を促進することから、SOX9 が BRG1 の下流の KEY 分子であること（図 1）、②*BRG1* KO により、既に形成された膵前癌病変 PanIN がアポトーシスをきたして退縮すること、「BRG1/SOX9 経路」はヒト膵癌においても保存されていることを、世界で初めて見出した［1］。

しかしながら、臨床上一番問題になっている、「既に形成された浸潤性膵癌」において、「浸潤性膵癌の維持・進行」における BRG1 の機能的役割は未だに明らかでなく、「BRG1 阻害により、既に形成された浸潤性膵癌の増大抑制が得られるか？」および「その分子機構の解明」が本研究の核心をなす「問い」である。

従来、膵癌モデルマウスは、Cre-LoxP システムによる膵上皮の Kras 活性化、p53 等の不活化によるものであったため、膵癌形成後での、特定の分子機能は、マウスの個体レベルでは解明することが出来なかった。そこで、我々は、国際共同研究の下、「独自の dual recombinase system」により、「Flp-FRT システム」にて膵特異的に Kras 活性化、p53 の不活化を引き起こして膵癌を形成し、さらに膵癌の形成後にタモキシフェン誘導の「Cre-loxP システム」を用いて、「目的の遺伝子（*BRG1*）を任意の時期にノックアウトする新しい画期的なシステム」を用いることを考えた［2，3］。

以上の背景および一連の研究成果［1，3，4］を踏まえて、本研究では、我々が、世界に先駆けて独自に膵癌における BRG1 の役割を明らかにしてきた研究をさらに展開し、独自の「dual recombinase による新規膵癌モデルマウス」を用いて、「既に形成された浸潤性膵癌」の維持・進行における BRG1 の機能的役割およびその分子機構を解明する。これにより「BRG1 阻害により形成された浸潤性膵癌の増大抑制効果が得られるか」を明らかにし、BRG1 を標的とした新規膵癌治療法の開発にむけた基盤を確立する。

方法および結果

浸潤性膵癌における Brg1 の機能的役割を解明するため、dual recombinase システムを用いて、形成された膵癌においてタモキシフェン投与により任意の時期に *Brg1* を KO できる独自の膵癌モデルマウスを作製した。このマウスに形成された膵癌から細胞株を樹立し、*Brg1* を KO することにより、増殖・浸潤・転移への影響について検討した。

増殖能に関しては、*Brg1* KO マウス膵癌細胞では増殖が減少し、cleaved caspase3 の増加により、アポトーシスが著増することが判明した。さらに、*in vivo* における xenograft モデルにおいて、および dual recombinase システムを用いた自然発症の膵癌モデルマウスにおいてもマウスの個体レベルにおいて、*Brg1* KO により膵癌細胞の増殖、膵癌の増大が抑制されることを見出した。

浸潤能について検討した結果、*Brg1* を KO した膵癌細胞では浸潤能の低下をみとめた。

次に、転移能について、*Brg1* を KO した膵癌細胞とコントロールの膵癌細胞をマウスの脾臓に移植し肝転移巣の形成について比較解析した。その結果、形成された肝転移巣は *Brg1* KO 群で著明に少なく、*Brg1* KO により膵癌細胞の転移能は著しく抑制された。重要なことに、*Brg1* KO 群で稀に少数形成された肝転移巣は、全て *Brg1* 陽性の膵癌細胞

（即ち、*Brg1* KO を免れた escaper 細胞）のみで構成されており、Brg1 陰性の膵癌細胞はみとめられなかった。さらにバイオイメージグを用いた詳細な解析の結果、*Brg1* を KO した膵癌細胞は、脾臓移植後 1、2、4 日には肝臓に一旦生着するものの、徐々に肝転移巣は減少していき、8 日目にはほぼ消失することが判明した（図 1）。

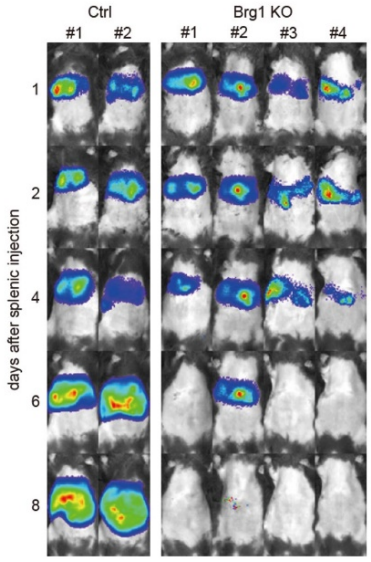


図 1. *Brg1* KO 膵癌細胞の肝転移の退縮
膵癌細胞で *Brg1* KO すると、肝臓に生着するが、徐々に肝転移巣は減少し、ほぼ消滅する

組織学的な解析の結果、*Brg1* KO 膵癌群の肝転移巣において cleaved caspase3 陽性細胞が有意に増加しており、アポトーシスが亢進していた。さらに、*Brg1* KO した膵癌細胞を腹腔内に移植したモデルで解析した結果においても、同様の結果が得られた。これらの結果より、マウス膵癌細胞の転移巣形成には Brg1 が必須であること、そのメカニズムとして、*Brg1* KO によりアポトーシスが生じ、*Brg1* KO 膵癌細胞は細胞自律的に淘汰されることが明らかになった。また、*Brg1* KO 膵癌細胞では幹細胞性が低下することが、sphere formation assay および dilution assay の結果で示された。これに合致して、*Brg1* KO 膵癌細胞では膵癌幹細胞マーカーの発現が低下していた。以上より、マウス膵癌細胞は Brg1 欠失により、増殖・浸潤・転移がいずれも著明に抑制され、幹細胞性の低下、アポトーシスが亢進することが示された（図 2）。

網羅的な遺伝子発現解析（RNA-seq）および CHIP-seq 解析の結果、*Brg1* KO した膵癌細胞では hypoxic pathway と cMYC の発現が著しく減少しており、Hif1a および cMYC が標的遺伝子に結合して Hif1a および cMYC の標的遺伝子を発現させるのに Brg1 が重要であることが示された。さらに Hif1a および cMYC の阻害実験の結果、Brg1 は膵癌の幹細胞性、増殖、転移巣形成、アポトーシス回避に重要な働きをしていること、そのメカニズムとしては Brg1 による Hif 経路および cMYC の発現制御によるものであることが明らかになった。またヒト膵癌組織標本の免疫染色の結果、ヒト膵癌の約 8 割では BRG1 を発現していることが示された（data not shown）。

以上の取り組みから、BRG1 が膵癌に対する有力な新規創薬・治療ターゲットになり得ることが示された。

これらの研究成果については、論文投稿中（Araki et al.）で、現在 in revision である。

次に、既に形成されたヒト膵癌に対する BRG1 遮断効果を検討し、ヒト膵癌における治療標的としての妥当性をさらに検証することとした。ヒト膵癌オルガノイドを京大病院の患者さんの臨床検体より樹立し、検証の結果、BRG1 を発現しているヒト膵癌細胞、ヒト膵癌オルガノイドに対して、CRISPR/Cas9 による *BRG1* KO を行った結果、BRG1 阻害により増殖が有意に抑制された（data not shown）。

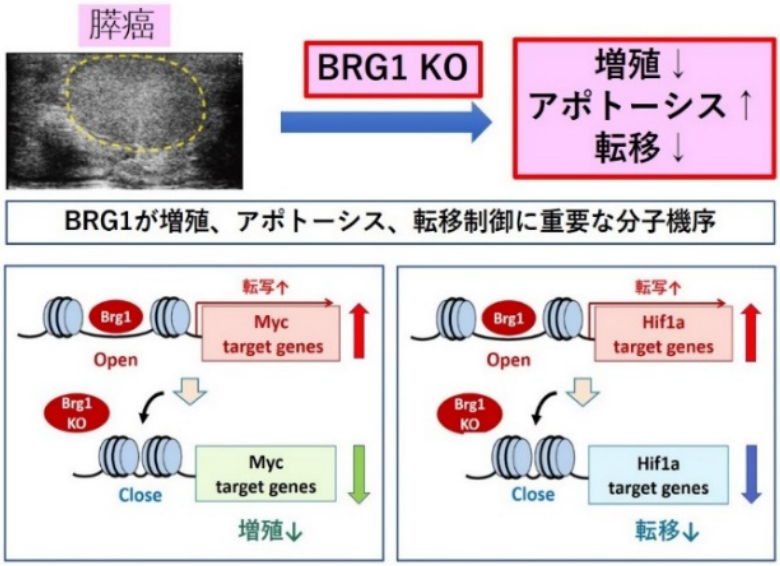


図 2. クロマチン制御因子 BRG は膵癌の進行、転移に重要な働きをする。
マウス膵がん細胞は Brg1 欠失により、増殖・浸潤・転移がいずれも著明に抑制され、幹細胞性の低下、アポトーシスが亢進する。その機序としては、BRG1 による cMyc と Hif 経路の発現制御による。

考　察

本研究の特色として、「dual recombinase system」を用いたマウスモデルを用いて、“従来には成し得なかった”「浸潤性膵癌が形成された後に*BRG1*をKOすることで、形成された膵癌が退縮するかをマウスの個体レベルで明らかにした」点は非常にユニークである。本研究による取り組みから、BRG1が膵癌に対する有力な新規創薬・治療ターゲットになり得ることが示された。今後、さらにヒト膵癌PDXモデルを用いて、BRG1を阻害することにより増殖が抑制されるかを検討し、研究のさらなる展開が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、ミュンヘン大学の Dieter Saur 博士である。

文　献

1） Tsuda M, Fukuda A, Roy N, Hiramatsu Y, Leonhardt L, Kakiuchi N, Hoyer K, Ogawa S, Goto N, Ikuta K, Kimura Y, Matsumoto Y, Takada Y, Yoshioka T, Maruno T, Yamaga Y, Kim G, Akiyama H, Ogawa S, Wright CV, Saur S, Takaori K, Uemoto S, Hebrok M, Chiba T, Seno H, The BRG1/SOX9 axis is critical for acinar cell-derived pancreatic tumorigenesis. J Clin Invest. 1:128:3475-3489:2018. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30010625 DOI: 10.1172/JCI94287.

2） Schönhuber N, Seidler B, Schuck K, Veltkamp C, Schachtler C, Zukowska M, Eser S, Feyerabend TB, Paul MC, Eser P, Klein S, Lowy AM, Banerjee R, Yang F, Lee CL, Moding EJ, Kirsch DG, Scheideler A, Alessi DR, Varela I, Bradley A, Kind A, Schnieke AE, Rodewald HR, Rad R, Schmid RM, Schneider G, Saur D. Nat Med. 2014 Nov;20(11):1340-1347. Epub 2014 Oct 19. PMID: 25326799. DOI: 10.1038/nm.3646.

3) Fukuda A*, von Figura G*, Roy N*, Liku ME, Morris Iv JP, Kim GE, Russ HA, Firpo MA, Mulvihill SJ, Dawson DW, Ferrer J, Mueller WF, Busch A, Hertel KJ, Hebrok M : The Chromatin Regulator Brg1 Suppresses Formation of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Nat Cell Biol. 16:255-67:2014. *Co-first authors. Epub 2014 Feb 23. PMID: 24561622 DOI: 10.1038/ncb2916.

4) Kimura Y, Fukuda A, Ogawa S, Maruno T, Takada Y, Tsuda M, Hiramatsu Y, Araki O, Nagao M, Yoshikawa T, Ikuta K, Yoshioka T, Wang Z, Akiyama H, Wright CV, Takaori K, Uemoto S, Chiba T, Seno H. ARID1A Maintains Differentiation of Pancreatic Ductal Cells and Inhibits Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. Gastroenterology 155:194-209:2018. Epub 2019 Jan 11. PMID: 29604291 DOI: 10.1053/j.gastro.2018.03.039.