

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 肝胆膵がんの治療抵抗性獲得機序の解明と治療開発
(英語) Analysis of acquisition of therapeutic resistance to develop novel treatments for hepato-biliary-pancreatic cancers
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・分子腫瘍医学分野・教授・田中真二
- 所属 役職 氏名： (英語) Shinji Tanaka, MD, PhD, FACS, Professor, Department of Molecular Oncology, Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 実施期間： 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 肝癌サブタイプに基づいた同一症例再発巣とのペア解析と治療抵抗性標的の同定
- 開発課題名： (英語) Analysis of the primary and recurrent tumors to identify the molecular targets for therapeutic resistance based on molecular subtypes of liver cancers
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・分子腫瘍医学分野・教授・田中真二
- 所属 役職 氏名： (英語) Shinji Tanaka, MD, PhD, FACS, Professor, Department of Molecular Oncology, Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 分担研究 (日本語) PTight レンチウイルスを用いた肝胆膵がんの難治性メカニズム解明
- 開発課題名： (英語) Analysis of therapeutic resistance mechanism of hepato-biliary-pancreatic cancers using PTight lentivirus
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・ウイルス制御学分野・教授・山岡昇司

所属 役職 氏名： (英 語) Shoji Yamaoka, MD, PhD, Professor, Department of Molecular Virology,
Graduate School of Medical and Dental Sciences

分担研究 (日本語) 可視化がん幹細胞における非対称性分裂のシングルセル解析と治療標的
同定

開発課題名： (英 語) Single-cell analysis of asymmetric division of visualized cancer
stem cells to identify the therapeutic targets

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 難治疾患研究所・分子細胞遺伝学分野・
教授・稲澤譲治

所属 役職 氏名： (英 語) Johji Inazawa, MD, PhD, Professor, Department of Molecular
Cytogenetics, Medical Research Institute

分担研究 (日本語) 肝胆膵癌の手術検体収集、臨床病理学的解析

開発課題名： (英 語) Clinicopathological analysis of hepato-biliary-pancreatic cancers
using surgical samples

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・肝胆膵外科学
分野・教授・田邊稔

所属 役職 氏名： (英 語) Minoru Tanabe, MD, PhD, Professor, Department of Hepato-biliary-
pancreatic Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

山岡昇司教授（医歯学総合研究科・ウイルス制御学分野）、稲澤譲治教授（難治疾患研究所・分子細胞遺伝学分野）、田邊稔教授（医歯学総合研究科・肝胆膵外科学分野）らのグループとともに、肝胆膵がんの治療抵抗性獲得機序の解明と治療開発を進めている。本研究課題は肝癌サブタイプに基づいた同一症例再発巣とのペア解析と治療抵抗性標的の同定、PTight レンチウイルスを用いた肝胆膵がんの難治性メカニズム解明、可視化がん幹細胞における非対称性分裂のシングルセル解析と治療標的の同定、肝胆膵癌の手術検体収集、臨床病理学的解析によって構成されている。

SWI/SNF 複合体のサブユニットの1つ ARID2 は肝細胞癌（肝癌）で特異的に変異が多く、ARID2 変異サブタイプは特に予後不良であることが報告されているが(Fujimoto et al. *Nat Genet* 2016)。その分子メカニズムについては明らかにされていない。本研究開発課題にて、我々は Crisp/Cas9 ゲノム編集システムを用いてヒト肝癌細胞の ARID2 ノックアウト株 (ARID2-KO 株) を作製した。その結果、ARID2 機能欠損によって高い造腫瘍性を獲得することを示した。さらに遺伝子発現解析で ARID2 機能欠損によって紫外線 (UV) 応答に関わる遺伝子が抑制的に調節されることを明らかにした。ARID2-KO 株では UV 照射や肝発癌物質のベンゾ[a]ピレン、鉄化合物の暴露による DNA 損傷部位でのヌクレオチド除去修復機構 (NER) の破綻を認めたが、これは NER の過程で重要な役割を担う XPG のリクルートが ARID2 機能欠損により阻害されたためであることを見出した。肝癌臨床検体のパブリックデータを用いた検証解析によって、ARID2 変異症例は ARID2-KO 株と同様の分子生物学的変化を認め、また肝癌を含む複数の癌腫で ARID2 正常症例と比べて体細胞変異数が有意に多くなっていることを明らかにした (hypermutation)。Hypermutator フェノタイプは免疫チェックポイント阻害剤の効果が高いことが報告されており、今回の発見によって NER 破綻や体細胞高頻度突然変異をターゲットとした ARID2 変異サブタイプ特異的な治療開発が期待され (Oba, Tanaka et al. *J Hepatol*, in press)、2017年2月27日 AMED よりプレスリリースした。

抗血管新生療法は、肝癌を含む固形腫瘍に対して初期は有効であっても、最終的には腫瘍が再発・進行し、かえって予後不良となることさえある。この問題を解決するため、我々はヒト肝癌細胞株を免疫不全マウスに皮下移植して VEGFR 阻害剤を投与し、残存した腫瘍片を次のマウスに皮下移植して阻害剤投与を行う操作を12回繰り返し、in vivo で薬剤耐性株を確立することに成功した。そして、親株と薬剤耐性株で遺伝子発現を網羅的に比較し、薬剤耐性株で高発現している遺伝子として組織修復因子 thymosin beta 4 (Tβ4) を同定した。両株間での Tβ4 のエピゲノム変化を解析すると、薬剤耐性株ではプロモーター領域の DNA 脱メチル化およびヒストン H3 の活性型修飾が認められ、結果として Tβ4 発現が誘導されていることが示唆された。ヒト肝癌細胞株における Tβ4 の過剰発現によって、in vitro スフェア形成能・遊走能・浸潤能が顕著に亢進した。また in vivo でも造腫瘍能が亢進し、VEGFR 阻害剤 sorafenib に対して耐性を獲得した。臨床的には、sorafenib 治療を受けた肝癌患者において、Tβ4 高発現群では無増悪生存率が有意に低いことを見出した。本研究において、エピゲノム変化により誘導された Tβ4 発現が、スフェア形成能や造腫瘍能などの癌幹細胞性の獲得と抗血管新生療法に対する耐性化に寄与していることが明らかになり、エピゲノム制御が薬剤耐性化を阻止する重要な標的となる可能性が示唆され (Ohata, Tanaka et al. *Mol Cancer Ther*, in press)、2017年3月1日 AMED よりプレスリリースした。

英文

“Analysis of acquisition of therapeutic resistance to develop novel treatments for hepato-biliary-pancreatic cancers” has been performed in collaboration with Prof. Shoji Yamaoka (Department of Molecular Virology, Graduate School of Medical and Dental Sciences), Prof. Johji Inazawa (Department of Molecular Cytogenetics, Medical Research Institute) and Prof. Minoru Tanabe (Department of Hepato-biliary-pancreatic Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences). This research project is composed of four subproject; “Analysis of the primary and recurrent tumors to identify the molecular targets for therapeutic resistance based on molecular subtypes of liver cancers”, “Analysis of therapeutic resistance mechanism of hepato-biliary-pancreatic cancers using PTight lentivirus”, “Single-cell analysis of asymmetric division of visualized cancer stem cells to identify the therapeutic targets” and “Clinicopathological analysis of hepato-biliary-pancreatic cancers using surgical samples”

Recent genomic studies have identified frequent mutations of ARID2 in hepatocellular carcinoma (HCC), but it is not still understood how ARID2 exhibits tumor suppressor activities. We established the ARID2 knockout HCC cell lines by using CRISPR/Cas9 system, and investigated the gene expression profiles and biological functions. Bioinformatic analysis indicated that UV-response genes were negatively regulated in the ARID2-KO cells, and they were certainly sensitized to UV irradiation. ARID2 depletion attenuated nucleotide excision repair (NER) of DNA damage sites introduced by exposure to UV as well as chemical compounds known as carcinogens for HCC, benzo[a]pyrene and acetaldehyde, since XPG could not be accumulated without ARID2. By using large-scale public data sets, we validated that ARID2 knockout could lead to similar molecular changes between in vitro and in vivo, and moreover observed a higher number of somatic mutations in the ARID2-mutated subtypes than that in the ARID2 wild-type across various types of cancers including HCC. We provided evidence that ARID2 knockout could contribute to disruption of NER process through inhibiting the recruitment of XPG, resulting in susceptibility to carcinogens and potential hypermutation. These findings have far-reaching implications for therapeutic targets in cancers harboring ARID2 mutations (Oba, Tanaka et al. *J Hepatol*, in press). The AMED press release was performed on February 27, 2017.

Anti-angiogenic therapy is initially effective for several solid tumors including HCC; however, they finally relapse and progress, resulting in poor prognosis. We here established in vivo drug-tolerant subclones of human HCC cells by long-term treatment with VEGFR inhibitor and serial transplantation in mice. Gene expression profiles elucidated a G-actin binding protein T84 as one of the genes enriched in the resistant cancer cells relative to the initially sensitive ones. T84 could be aberrantly expressed following demethylation of DNA and active modification of histone H3 at the promoter region. Ectopic expression of T84 in HCC cells could significantly enhance sphere-forming capacities in vitro, and promote growth of tumors refractory to the VEGFR inhibitor sorafenib in vivo. Clinically, sorafenib failed to improve the progression-free survival in patients with T84-high HCC, indicating T84 as a surrogate marker of susceptibility to this drug. This study suggests that T84 expression triggered by epigenetic alterations could contribute to the development of resistance to anti-angiogenic therapy by the acquisition of stemness, and that epigenetic control might be one of the key targets to regulate the resistance in HCC (Ohata, Tanaka et al. *Mol Cancer Ther*, in press). The AMED press release was performed on March 1, 2017.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Oba A, Shimada S, Akiyama Y, Nishikawaji T, Mogushi K, Ito H, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Asahara H, Kaida A, Miura M, Tanabe M, Tanaka S. ARID2 modulates DNA damage response in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Hepatology*, in press
2. Ohata Y, Akiyama Y, Shimada S, Mogushi K, Nakao K, Matsumura S, Aihara A, Mitsunori Y, Ban D, Ochiai T, Kudo A, Tanabe M, Tanaka S. Acquired resistance with epigenetic alterations under long-term anti-angiogenic therapy for hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 臨床検体のゲノム解析に基づいた遺伝子改変およびゲノム編集技術の臨床応用（シンポジウム）、口頭、田中真二、島田周、古山貴基、大庭篤志、茂櫛薫、秋山好光、水野裕貴、小川康介、深町博史、伊藤浩光、光法雄介、松村聡、藍原有弘、伴大輔、落合高德、工藤篤、川口義弥、田邊稔、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016/4/16、国内
2. 肝癌の幹細胞性解析とゲノム編集技術を用いた治療応用（シンポジウム）、口頭、田中真二、藍原有弘、田邊稔、第 102 回日本消化器病学会総会、2016/4/23、国内
3. 肝がん個別化分類に基づいた生体内バイオマーカーの同定による新規分子標的治療の開発と臨床展開（シンポジウム）、口頭、田中真二、佐藤公太、田邊稔、第 52 回日本肝臓学会総会、2016/5/19、国内
4. 基礎研究から臨床応用への展望（シンポジウム指定演者）、口頭、第 14 回日本肝がん分子標的治療研究会、2016/6/11、国内
5. がん分子サブタイプと臨床情報に基づく個別化治療戦略（パネルディスカッション基調講演）、口頭、田中真二、第 52 回日本肝癌研究会、2016/7/1、国内
6. 肝胆膵がん個別化分類に基づいた癌幹細胞の治療抵抗性機序の解明と治療展開（シンポジウム）、口頭、田中真二、伊藤浩光、古山貴基、藍原有弘、松村聡、光法雄介、伴大輔、落合高德、工藤篤、田邊稔、第 72 回日本消化器外科学会総会、2016 年 7/15、国内
7. 癌幹細胞のエピジェネティック変化と転移性および治療抵抗性獲得機序、口頭、田中真二、島田周、秋山好光、第 75 回日本癌学会総会、2016/10/6、国内
8. 肝癌分子標的薬の生体内感受性バイオマーカー探索と臨床展開（ワークショップ）、口頭、田中真二、大畠慶映、田邊稔、第 14 回日本消化器外科学会大会、2016/11/4、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 肝がん変異遺伝子 ARID2 による発がんメカニズムを解明—肝がんのプレシジョン・メディシンへ応用が期待—、AMED プレスリリース、2017/2/27、国内
2. がんが生体内で治療抵抗性を獲得するメカニズムを解明—薬剤耐性肝がんの新たな治療法開発への期待—、AMED プレスリリース、2017/3/1、国内

(4) 特許出願

該当なし