

博士論文

新規大腸がん治療標的分子としての BMP-4 の機能解析

横山 雄一郎

新規大腸がん治療標的分子としての **BMP-4** の機能解析

東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 腫瘍外科学分野

指導教員 野澤 宏彰 准教授

横山 雄一郎

目次

1. 要旨.....	4
2. 序論.....	5
2-1 大腸がん	
2-2 BMP シグナル伝達系	
2-3 がんにおける BMP シグナル	
3. 実験方法.....	9
3-1 細胞培養・試薬	
3-2 細胞増殖試験	
3-3 RNA 抽出、quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR)	
3-4 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) qRT-PCR	
3-5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	
3-6 Western blot	
3-7 TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL) assay	
3-8 Lentivirus による強制発現、short hairpin RNAs (shRNAs)による knockdown	
3-9 Small interfering RNAs (siRNAs)による knockdown	
3-10 RNA sequencing (RNA-seq)	

3-11 Colony formation assay	
3-12 がん細胞移植実験	
3-13 薬剤投与実験、 <i>ex vivo</i> bioassay	
3-14 免疫組織化学染色	
3-15 統計解析	
4. 結果.....	21
4-1 大腸がんにおける BMP 発現	
4-2 Wnt/ β -catenin シグナルによる <i>BMP4</i> の発現制御	
4-3 大腸がん細胞の腫瘍形成に対する <i>BMP4</i> knockdown の効果	
4-4 大腸がん細胞の apoptosis に対する <i>BMP4</i> knockdown の効果	
4-5 BMP 阻害剤の大腸がん細胞の apoptosis に対する効果	
4-6 大腸がん細胞での BMP シグナルによる <i>DUSP5</i> の発現を介した MAPK の制御	
4-7 大腸がん細胞における <i>DUSP5</i> の pro-apoptotic な作用	
4-8 LDN-193189 の大腸がんの腫瘍形成に対する効果	
5. 考察.....	68
5-1 大腸がん細胞での内因性 BMP シグナルの活性化	
5-2 大腸がん細胞での BMP-4 を介した内因性 BMP シグナルの anti-	

apoptotic な作用

5-3 大腸がん細胞での DUSP5 を介した Erk MAPK の制御

5-4 大腸がん細胞での BMP 阻害剤による抗腫瘍効果

6. 結語.....	77
7. 謝辞.....	78
8. 参考文献.....	79

1. 要旨

大腸がんでは、Wnt/ β -catnin シグナルの活性化により、bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)の発現が亢進し、内因性の BMP シグナルが活性化している。BMP 阻害剤にてこの内因性のシグナルを阻害すると、dual specificity phosphatase 5 (DUSP5)の発現上昇を介して extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2)が脱リン酸化され、大腸がん細胞に apoptosis が誘導された。以上の結果より、大腸がんが自己分泌する BMP-4 は新たな治療標的になり得ると考えられた。

2. 序論

2-1 大腸がん

大腸がんは、世界で年間 120 万人が新規罹患し、それに伴う死亡者数が 60 万人にも達する、罹患率世界第 3 位、死亡率世界第 4 位のがんである (1)。早期の大腸がんは、外科的切除により完治を望めるが、進行がんでは、外科治療と化学療法との併用が必要となる。近年、大腸がんにおける化学療法には、5-fluorouracil (5-FU)、oxaliplatin、irinotecan などの既存の抗がん剤に加え、vascular endothelial growth factor (VEGF) や epidermal growth factor receptor (EGFR) を標的とした分子標的薬が使用されるようになった。それに伴い、領域リンパ節に転移を有する大腸がんであっても、その 5 年生存率は 69.2% と改善された (1、2)。一方、遠隔転移を有する大腸がんの 5 年生存率は、11.7% と未だ不良であり、新規の分子標的薬の開発が望まれている。

2-2 BMP シグナル伝達系

Bone morphogenetic protein (BMP) は、transforming growth factor- β (TGF- β) ファミリーに属し、細胞の増殖や分化など様々な生物学的活性を示すサイトカインである (3、4、5)。BMP リガンドには、BMP-2/4 グループ、BMP-5/6/7/8 グループ、BMP-

9/10 グループ、growth and differentiation factor (GDF)-5/6/7 とよばれる 4 つのサブグループが存在する。BMP シグナル伝達メカニズムを図 1 に示す。

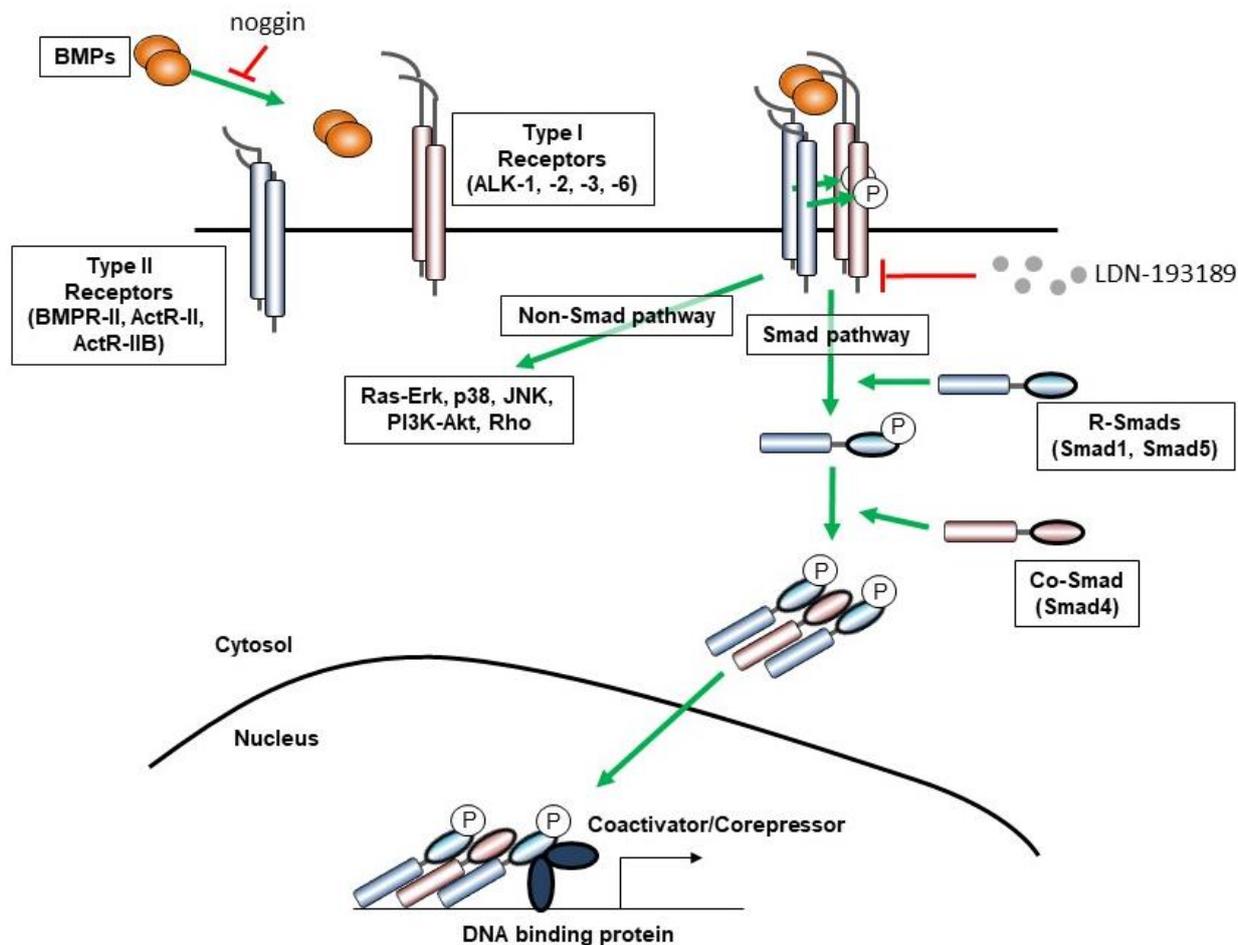


図 1 BMP シグナル伝達の概略

BMP は膜貫通型受容体である I 型受容体と II 型受容体に結合して、細胞内にシグナルを伝達する。ALK-1、-2、-3、-6 は I 型受容体、ActR-II、-IIB、BMPR-II は II 型受容体として機能する。これら受容体に BMP が結合すると、2 分子の I 型受容体と 2 分子の II 型受容体が heterotetramer を形成し、Smad1/5 をリン酸化する。リン酸化された Smad1 や Smad5 は、Smad4 とともに heteromeric Smad complex を形成し、核内移行する。核内移行した Smad complex は、転写活性共役因子や転写抑制共役因子と協調することで、様々な標的遺伝子の転写を制御する (Smad pathway)。さらに、MAPK など、BMP によって Smad 非依存的に活性化されるシグナル伝達経路も存在する (Non-Smad pathway)。

BMP は、I 型受容体、II 型受容体とよばれる kinase 活性を有する 2 つの異なった受容体に結合することで、細胞内にシグナルを伝達する。I 型受容体には activin receptor-like kinase (ALK)-1、-2、-3、-6 とよばれる 4 つの受容体が、II 型受容体には BMP type II receptor (BMPRII)、activin type II receptor (ActRII)、activin type IIB receptor (ActRIIB) とよばれる 3 つの受容体が存在する。BMP が結合した I 型受容体と II 型受容体は、heterotetramer を形成する。これにより、恒常的に活性化している II 型受容体の serine/threonine kinase が、I 型受容体の serine/threonine kinase を活性化する。この結果、receptor-regulated Smads (R-Smads) である、Smad1 と Smad5 がリン酸化され、common-partner Smad (Co-Smad) である Smad4 と trimer complex を形成することで、核内に移行し、様々な遺伝子の発現を制御している。また、このような Smad を介する Smad pathway の他に Smad を介さずに mitogen-activated pathway (MAPK) などを活性化する、non-Smad pathway の存在も知られている (6)。

2-3 がんにおける BMP シグナル

BMP は、がんの進展において、腫瘍抑制的な作用と腫瘍促進的な作用という二面性を持ち合わせている (4、5、7)。BMP は胃がんや乳がん、前立腺がんのがん細胞の増殖を抑制することや、神経膠腫細胞の分化を誘導し、その腫瘍形成を阻

害することが示されている (8)。これらは、**BMP** の腫瘍抑制的な側面を表している。一方で、**BMP** は、同じ種類のがんであっても状況依存的に相反する作用を示すことが知られており、乳がんや前立腺がん、悪性黒色腫などのがん細胞の運動能や浸潤能を亢進させることが知られている (4)。大腸がんにおいては、**BMP** シグナルが腫瘍促進的に作用するのか、腫瘍抑制的に作用するのか、現段階で一定の見解を得ていない (4)。

本研究では、大腸がんが自己分泌する **BMP** を同定し、詳細な機能解析を行った。そして、大腸がんの新規分子標的薬としての **BMP** 阻害剤の有用性について検討した。

3. 実験方法

3-1 細胞培養・試薬

ヒト大腸がん細胞 (HT29、DLD-1)は、Japanese Cancer Research Bank (Osaka, Japan)から購入した。ヒト大腸がん細胞 (SW480)、ヒト非小細胞肺がん細胞 (A549)、ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa)、ヒト膵臓がん細胞 (SUIT-2、BxPC-3)は、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)から購入した。ヒト乳がん細胞は、MDA-MB-231 細胞 (ATCC)より得られた高骨転移株 MDA-231-D 細胞を使用した。HEK293FT 細胞は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)から購入した。HT29 細胞、DLD-1 細胞、BxPC-3 細胞は RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific)に 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Chicago, IL, USA)と 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin (Thermo Fisher Scientific)を加えた培地で培養した。SW480 細胞、A549 細胞、HeLa 細胞、MDA-231-D 細胞、SUIT-2 細胞は DMEM (Thermo Fisher Scientific)に 10% FBS と 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を加えた培地で培養した。HEK293FT 細胞は DMEM に 10% FBS、1 mM sodium pyruvate、1× MEM Non-Essential Amino Acids Solution (Thermo Fisher Scientific)を加えた培地で培養した。Wnt-3a、noggin (ともに R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)は 0.1% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)溶液

で溶解した。U0126 (Promega, Madison, WI, USA)と Cycloheximide (CHX, Sigma-Aldrich)、LDN-193189 (Wako, Tokyo, Japan または理化学研究所)は dimethyl sulfoxide (DMSO, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)で溶解した。XAV939 と Z-VAD-FMK は各々Sigma-Aldrich、Promega より購入した。

3-2 細胞増殖試験

HT29 細胞 (1.7×10^5 個)、DLD-1 細胞 (1×10^5 個)、SW480 細胞 (3×10^5 個)を 6 well plates に播種した後、16 時間後に血清を除去し、LDN-193189 (0.2-0.3 μ M) もしくは noggin (50 ng/ml)を添加し、3 日間培養した。細胞数は血球計算版を用いて計測した。

3-3 RNA 抽出、quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

RNA の抽出は Isogen (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて行い、1 st strand complementary DNA (cDNA)の合成は、PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Kusatsu, Japan)を用いて行った。qRT-PCR による解析には、StepOne Plus Real time-PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いた。全ての sample は duplicate にて測定した。用いた primer sequence を表 1 に示す。

表 1 qRT-PCR に用いた primer

Gene	Orientation	Sequence (5' to 3')
<i>GAPDH</i>	Forward	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
	Reverse	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>HPRT1</i>	Forward	TTTGCTTTCCTTGGTCAGGC
	Reverse	GCTTGCGACCTTGACCATCT
<i>BMP2</i>	Forward	GGGCATCCTCTCCACAAAAG
	Reverse	TTACAGCTGGACTTAAGGCGTTT
<i>BMP4</i>	Forward	CGTAGCCCTAAGCATCACTCACA
	Reverse	GCGCCGGCAGTTCTTATTCT
<i>BMP5</i>	Forward	GATGGCAGGACTGGATTATAGCACC
	Reverse	TTGGTACGTGGTCAGGAAACATCAG
<i>BMP6</i>	Forward	GTGAACCTGGTGGAGTACGACAA
	Reverse	AGGTCAGAGTCTCTGTGCTGATG
<i>BMP7</i>	Forward	CTACAAGGCCGTCTTCAGTACCCAG
	Reverse	ATTCCTTGTCATGTTCCACGAGGTT
<i>BMP9</i>	Forward	AGGTTCCAGAAACCTGCCCTT
	Reverse	CGCTCTCTTGTTTCATGGCTGAT
<i>BMP10</i>	Forward	AGAATGAAGATCTGTTTTCCAGCCG
	Reverse	ATCCCTTTGCACCAGTGTGTATAGC
<i>CTNNB1</i>	Forward	GAAGGTCTGAGGAGCAGCTTCAGT
	Reverse	CTTCAAATACCCTCAGGGGAACAGG
<i>AXIN2</i>	Forward	CCAAGACCAAGGAGGAGATCGAGG
	Reverse	CTCTGCTGCCGCCAAACTGCTC
<i>ID1</i>	Forward	AGCACGTCATCGACTACATCAGG
	Reverse	GGATTCCGAGTTCAGCTCCAA
<i>DUSP5</i>	Forward	TGTCGTCCTCACCTCGCTA
	Reverse	GGGCTCTCTCACTCTCAATCTTC

3-4 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) qRT-PCR

10 cm dishes に播種した細胞を、1% ホルムアルデヒド (Wako)を用いて室温で 10

分間固定した後、回収したタンパク質-DNA 複合体を得た。これに sonication buffer

(50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM EDTA (pH 8.0)、1% SDS、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Basel, Switzerland))を添加し、溶解させた後、Bioruptor (Cosmobio, Tokyo, Japan)による超音波処理にてクロマチンをせん断し、ChIP IP buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM EDTA (pH 8.0)、1% Triton-X100、150 mM NaCl、Complete Protease Inhibitor Cocktail)に溶解させた。これに Dynabeads Protein G for immunoprecipitation (Thermo Fisher Scientific)と抗体を 4°C で 2 時間反応させ、beads-抗体複合体を形成させたものを添加し、4°C で 4 時間反応させた。ChIP wash buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、500 mM LiCl、1 mM EDTA、0.7% sodium deoxycholate、1% Nonidet P-40)、TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0))にて beads を洗浄したのち、sonication buffer を添加し、65°C overnight にて脱クロスリンクを行った。DNA の溶出は、PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて行った。qRT-PCR による解析には、StepOne Plus Real time-PCR System を用いた。全ての sample は duplicate にて測定した。用いた primer sequence、抗体を各々、表 2、3 に示す。

表 2 ChIP qRT-PCR に用いた primer

Gene	Orientation	Sequence (5' to 3')
<i>SOBP</i>	Forward	TCCCTTCCCTGAAGGAGCATGCA
	Reverse	GGGCAAGACCTGAGGGCCCA
<i>BMP4</i>	Forward	CAACCTATAAACTCACAATCTGCCA
	Reverse	GTTGACCTCTGGCGTGCTTA

表 3 ChIP qRT-PCR に用いた抗体

抗体
抗 Transcription factor 4 (TCF4)抗体 (sc-8631) (Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)

3-5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

細胞を 6 well plates に 5×10^5 個播種し、48 時間後もしくは 72 時間後に培養上清を回収した。上清中の BMP-4 のタンパク濃度を Human BMP-4 Quantikine ELISA Kit (R & D Systems)を用いて duplicate で測定した。

3-6 Western blot

6 well plates に播種した細胞に、NP40 lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40)に Complete Protease Inhibitor Cocktail と EDTA-free phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)を加えた溶液 100 μ l を加え、タンパクを溶解した。タンパクの定量は、BCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて行い、等量のタンパクをポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。FluoroTrans W 0.2 μ m membrane (Pall, Washington, NY, USA)に転写した後、5% スキムミルクを用いて 1 時間ブロッキングを行った。1 次抗体反応は、Can get signal immunoreaction enhancer solution 1 (TOYOBO, Tokyo, Japan)に 1 次抗体を溶解し 4°C で 16 時間以上行った。2 次抗体反応を常温で 30 分間行った後、検出

は ImageQuant LAS4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)を用いて行った。用いた抗体と希釈倍率を表 4 に示す。

表 4 Western blot に用いた抗体

1 次抗体	2 次抗体
抗 Phospho-Smad1/5 抗体 (Ser463/465) (41D10) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 Smad1 抗体 #9743 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 Phospho-p44/42 MAPK 抗体 (Thr202/Tyr204) #9101 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 Phospho-p38 抗体 (Thr180/Tyr182) #9211 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 PARP 抗体 #9542 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 Phospho-SAPK/JNK 抗体 (Thr183/Tyr185) #9251 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 β -actin 抗体 (AC-15) (Sigma Aldrich, 1:1000)	抗 mouse IgG, HRP-linked 抗体 #7076 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 α -tubulin 抗体 (DM1A) (Sigma Aldrich, 1:1000)	抗 mouse IgG, HRP-linked 抗体 #7076 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 β -catenin 抗体 #610153 (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, 1:1000)	抗 mouse IgG, HRP-linked 抗体 #7076 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 p44/42 抗体 (MK12) (Millipore, Burlington, MA, USA 1:1000)	抗 mouse IgG, HRP-linked 抗体 #7076 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 DUSP5 抗体 (EPR19684) (Abcam, Cambridge, UK, 1:1000)	抗 rabbit IgG, HRP-linked 抗体 #7074 (Cell Signaling, 1:10000)

3-7 TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL) assay

HT29 細胞 (4×10^4 個)、DLD-1 細胞 (3×10^4 個)、SW480 細胞 (6×10^4 個)を 24

well plates に播種し、翌日血清を除去した後、LDN-193189 (0.2-0.3 μ M)、もしくは noggin (50 ng/ml)を添加し、3 日間培養した。その後、3.7% ホルムアルデヒドで固定した後、0.1% Triton X (Nacalai Tesque)で permeabilization し、In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche)を用いて DNA の断片化を染色した。核は SYTOX Green (Molecular probes, Eugene, OR, USA)にて染色した。Dako fluorescent mounting medium (Dako, Santa Clara, CA, USA)で封入し、DMI6000 B with adaptive focus control (Leica, Wetzlar, Germany)を用いて蛍光観察した。

3-8 Lentivirus による強制発現、short hairpin RNAs (shRNAs)による knockdown 強制発現系、shRNAs による knockdown 系は三好浩之博士（慶應義塾大学）より 供与頂いた lentivirus vector system を用いて行った。強制発現では、N 末端に Flag epitope tag を付加したヒト *DUSP5* coding region、もしくは control として green fluorescent protein (*GFP*) coding region を、entry vector である pENTR201 に挿入した。そして、LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて destination vector である CSII-EF-RfA に挿入した。また knockdown 系では、表 5 に示す target sequence を持つ shRNA を entry vector である pENTR4-H1 に挿入した後、destination vector である CS-RfA-CG に強制発現系と同様に LR recombination にて挿入した。HEK293FT 細胞に先の destination vector と pCAG-HIVgp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev

を Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて co-transfection し、lentivirus を作成した。lentivirus は Lenti-X Concentrator (Clontech, Mountain View, CA, USA)を用いて 1000 倍に濃縮して用いた。

表 5 shRNA 作成に用いた oligonucleotide

shRNA	Orientation	Sequence (5' to 3')
shNTC	Sense	GATCCCCATGGTTTACATGTTGTGTGAACGTGTGCTGTCCGT TCACACAACATGTAAACCAT TTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAAATGGTTTACATGTTGTGTGAACGGACA GCACACGTTACACAACATGTAAACCATGGG
shBMP4	Sense	GATCCCCGCATGTCAGGATTAGCCGATCGTTAACGTGTGCTG TCCGTTAACGATCGGCTAATCCTGACATGCTTTTTGGAAAT
	Anti-sense	CTAGATTTCCAAAAGCATGTCAGGATTAGCCGATCGTTAAC GGACAGCACACGTTAACGATCGGCTAATCCTGACATGCGGG

3-9 Small interfering RNAs (siRNAs)による knockdown

Stealth RNAi Pre-Designed siRNAs を Thermo Fisher Scientific で購入した。

Transfection は Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用い Reverse transfection protocol に従って行った。6 well plates で 500 μ l の Opti-MEM I Reduced Serum Media (Thermo Fisher Scientific) に 3 μ l の Lipofectamine RNAiMAX を溶解させ、siRNA の最終濃度は 30 nM になるように調整した。

3-10 RNA sequencing (RNA-seq)

RNA-seq では RNA の抽出を RNeasy Mini Kit (Qiagen)で行った後、Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて mRNA を精製した。その後、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Thermo Fisher Scientific)で Library を作成し、濃度を Ion Library Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific)で定量した。Ion PI Template OT2 200 Kit v3 (Thermo Fisher Scientific)を用いて Ion OneTouch 2 System (Thermo Fisher Scientific)にて emulsion PCR を行い、Ion OneTouch ES で精製した。その後、Ion PI Sequencing 200 kit v3 (Thermo Fisher Scientific)を用い、Ion Proton Sequencer (Thermo Fisher Scientific)で sequencing を行った。Gene Ontology 解析は CLC Genomics Workbench (Qiagen Bioinformatics)を用いて行った。

3-11 Colony formation assay

12 well plates に下層に 600 μ l の 0.5% agar 溶液 (Nacalai Tesque)を、上層に 600 μ l の細胞懸濁液を含む 0.3% agar 溶液を加え、軟寒天培地を作成した。各細胞の細胞数は、1 well あたり HT29 細胞 (3×10^3 個)、DLD-1 細胞 (1.5×10^3 個)、SW480 細胞 (1×10^4 個)とした。その上に 600 μ l の培地を加え、LDN-193189 (0.3 μ M)投与下に 14 日間培養した。LDN-193189 を含む培地は 3 日毎に交換した。実験は duplicate で行い、コロニー面積は、Cellsens Standard (Olympus, Tokyo, Japan)で測定した。

3-12 がん細胞移植実験

全ての動物実験は東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会の指針に沿って行った。5 × 10⁶ 個の HT29、SW480 細胞を 100 μl の培地に懸濁し、その懸濁液を 4-5 週齢、メスの BALB/c *nu/nu* マウス (Sankyo Labo Service Corporation, Tokyo, Japan) の皮下に移植した。皮下腫瘍体積は、(腫瘍体積) = (腫瘍長径) × (腫瘍短径)² / 2 にて算出した。

3-13 薬剤投与実験、*ex vivo* bioassay

LDN-193189 は、蒸留水にて 2.5% に希釈した DMSO に最終濃度 0.5 mg/ml になるように溶解させた。大腸がん細胞を BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に移植する 2 日前より、1 日 2 回 LDN-193189 を 6 mg/kg、21 日間連日腹腔内投与した。Control 群には等量の 2.5% DMSO を腹腔内投与した。LDN-193189 の体循環液中に到達した量は、以下のように評価した。DMSO もしくは LDN-193189 を投与された BALB/c *nu/nu* マウスの心臓より採取した血液を blood collection tube (Microtainer; Becton Dickinson) で 8000 rpm、10 分間遠心することで血清を分離した。これを 10% FBS を含んだ培地で 2 倍希釈し、12 well plates に播種した DLD-1 細胞に投与した。2 時間後に RNA を抽出し、inhibitor of DNA binding 1 (*IDI*) の発現を調べた。

3-14 免疫組織化学染色

大腸がん組織の formalin 固定による paraffin 包埋標本は東京大学医学部附属病院大腸肛門外科において informed consent のもと得られ、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得て行われた (承認番号: 10475)。免疫組織化学染色は、VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いた avidin/biotinylated peroxidase complex (ABC)法にて行った。10 mM pH 6.0 クエン酸バッファーにて 121°C、10 分間オートクレーブし抗原賦活化処理を行った後、Blocking One (Nacalai Tesque)にて希釈した 1 次抗体を常温で 1 時間反応させた。用いた抗体と希釈倍率を表 6 に示す。2 次抗体を常温で 1 時間、ABC 溶液を常温で 20 分間反応させた後、DAB substrate kit (Vector Laboratories)を用いて発色させた。

表 6 免疫組織化学染色に用いた抗体

1 次抗体	2 次抗体
抗 BMP-4 抗体 #5674R (Biovision, Milpitas, CA, USA 1:50)	抗 rabbit IgG, biotinated 抗体
抗 Phospho-Smad1/5 抗体 #700047 (Thermo Fisher Scientific, 1:800)	抗 rabbit IgG, biotinated 抗体
抗 Phospho-p44/42 MAPK 抗体 (Thr202/Thr204) (D13.14.4E) (Cell Signaling, 1:50)	抗 rabbit IgG, biotinated 抗体

3-15 統計解析

2つのサンプル間の比較は Student's *t* test にて行った。*in vivo* における2群間の腫瘍体積の比較は analysis of variance (ANOVA)を用いて行った。生存曲線は Kaplan Meier 法により算出し、その比較には log-rank test を用いた。多変量解析では、単変量解析にて $P < 0.05$ であった変数について、Cox 比例ハザードモデルを用いて解析した。検定では $P < 0.05$ の場合、統計学的に有意な差があると判定した。

4. 結果

4-1 大腸がんにおける BMP の発現

まず、大腸がんにおける BMP の各アイソフォームの発現を調べた。NCI-60 の cell line panel を解析すると、全ての大腸がん細胞において *BMP4* の発現が亢進していることが分かった (図 2)。

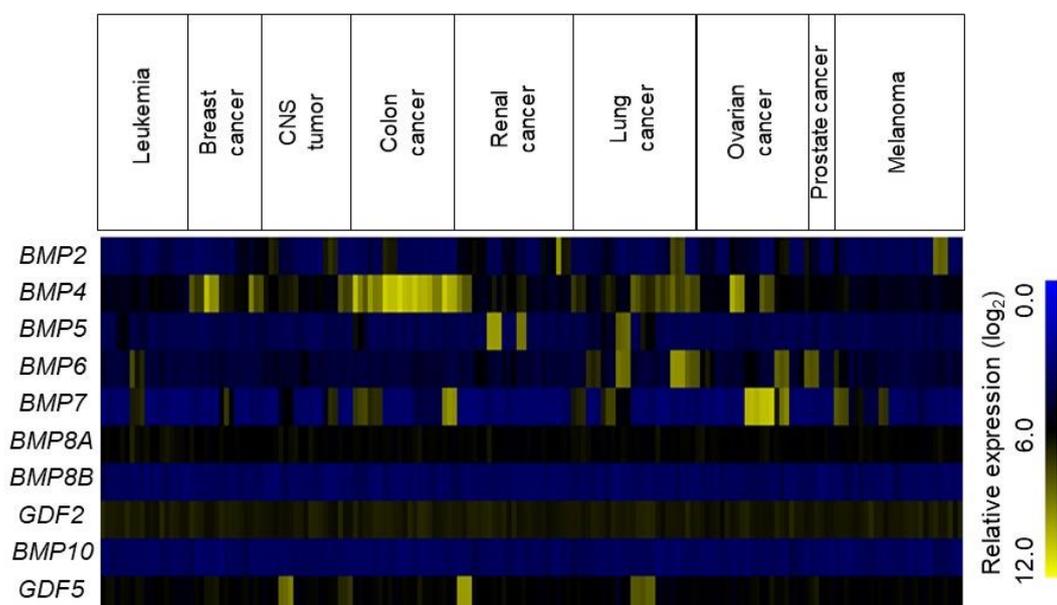


図 2 様々ながん細胞における BMP の各アイソフォームの発現

NCI-60 cell line panels の網羅的遺伝子発現解析の結果を元に、血液腫瘍細胞 (n = 6)、乳がん細胞 (n = 5)、脳腫瘍 (n = 6)、大腸がん細胞 (n = 7)、腎臓がん細胞 (n = 8)、肺がん細胞 (n = 9)、卵巣がん細胞 (n = 7)、前立腺がん細胞 (n = 2)、悪性黒色腫細胞 (n = 9)での BMP の発現を再解析した。

次に、NCBI の GEO datasets (GSE14258)を再解析し、大腸がん組織と正常大腸粘膜組織での BMP の発現を調べた。この結果、大腸がん組織では正常大腸粘膜組

織と比較して *BMP4* の発現が上昇している一方で、がん組織において発現が亢進している他の *BMP* リガンドは認めなかった (図 3)。

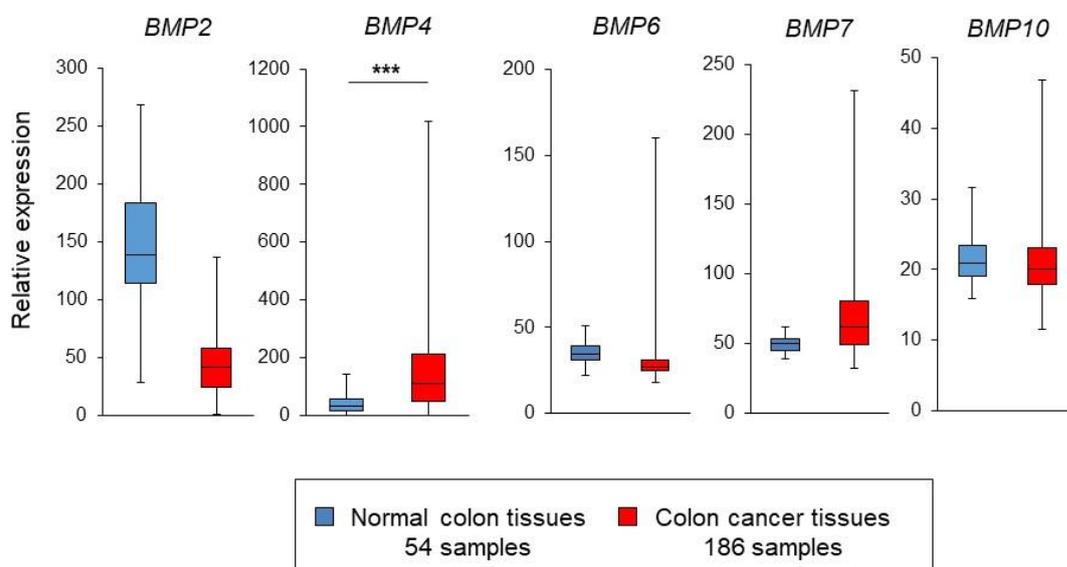


図 3 大腸がん組織と正常大腸粘膜組織における *BMP* の各アイソフォームの発現

正常大腸粘膜組織 (n = 54)と大腸がん組織 (n = 186)での *BMP* の発現を NCBI GEO database (GSE14258)での網羅的遺伝子発現解析の結果を元に解析した。(***, $P < 0.001$)

この大腸がんにて発現している *BMP4* が大腸がん患者の予後と相関しているかどうか調べるために NCBI の GEO datasets (GSE14333)を再解析した。Stage II の大腸がん患者に対する多変量解析の結果、*BMP4* の発現は予後不良因子であり、かつ独立した予後規定因子であった (図 4、表 7)。

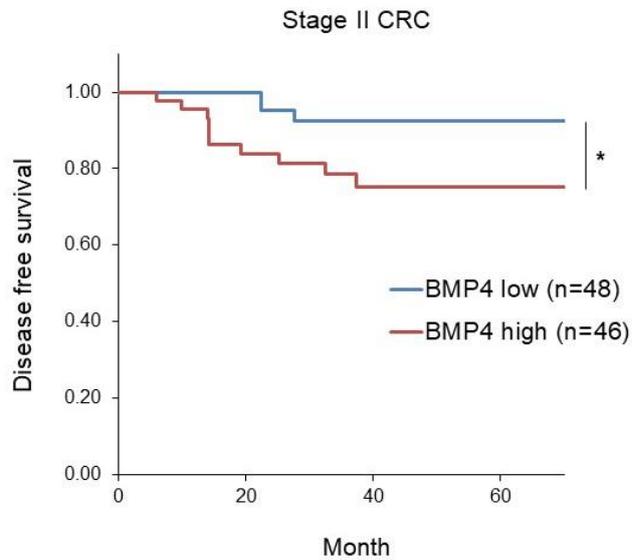


図 4 StageII の大腸がん患者において *BMP4* の発現は予後不良因子である
 NCBI GEO database (GSE14333)の結果を元に、Stage II の大腸がん患者 (n = 94)で
 の *BMP4* の発現と予後との相関を Kaplan Meier plot により示した。*BMP4* の発現
 は中央値により高発現群と低発現群とに分離した。(*, $P < 0.05$)

表 7 Stage II の大腸がん患者の無再発生存率に關与する因子の単変量・多変量解析

Characteristic	Hazard ratio (HR)	95 % Confidence interval (CI)	P-value
Univariate analysis			
Gender			
Female	1	–	–
Male	0.84	0.28–2.50	0.755
Age			
≤60	1	–	–
>60	0.42	0.14–1.24	0.117
Tumor location			
Right-sided colon	1	–	–
Left-sided colon/rectum	2.118	0.65–6.88	0.212
Adjuvant radiotherapy			
Negative	1	–	–
Positive	10.3	3.40–31.3	<0.0001
Adjuvant chemotherapy			
Negative	1	–	–
Positive	3.73	1.25–11.1	0.018
<i>BMP4</i> expression			
Low	1	–	–
High	3.79	1.04–13.8	0.043
Multivariate analysis			
Adjuvant radiotherapy			
Negative	1	–	–
Positive	21.9	2.45–196	0.006
Adjuvant chemotherapy			
Negative	1	–	–
Positive	0.62	0.07–5.17	0.658
<i>BMP4</i> expression			
Low	1	–	–
High	5.55	1.47–21.0	0.012

手術検体を用いた免疫組織化学染色でも、大腸がん組織では、付随する正常粘膜組織と比較して **BMP-4** の発現が亢進しており、また **BMP** シグナル伝達の指標となる **Smad1/5** のリン酸化も亢進していることが分かった (図 5)。

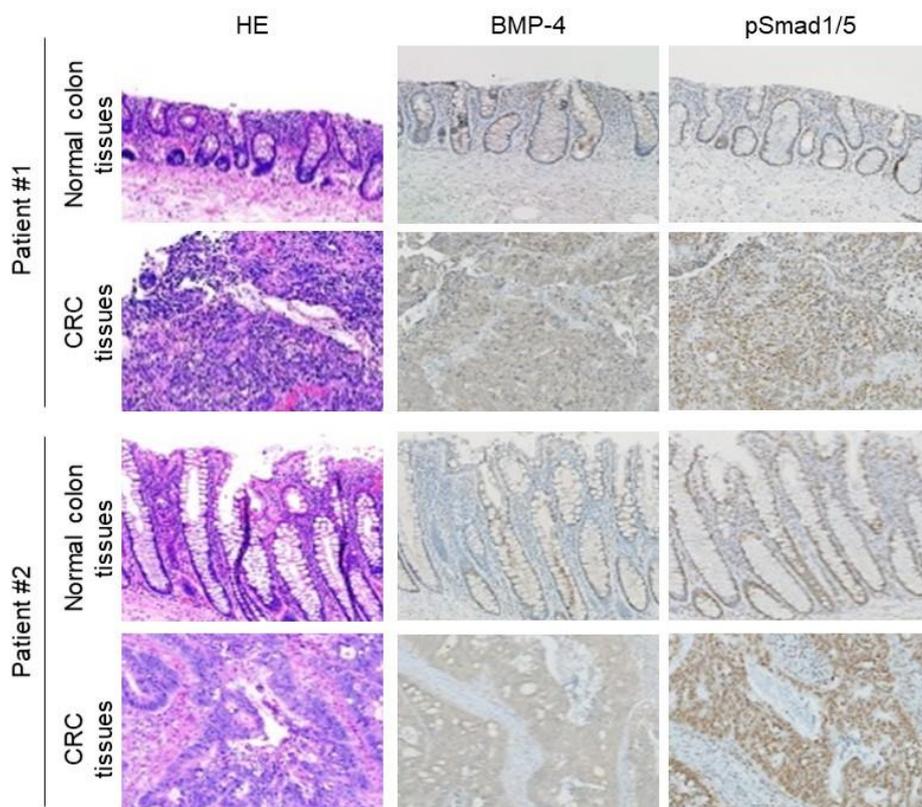


図 5 手術検体を用いた **BMP-4** とリン酸化 **Smad1/5** の免疫組織化学染色
2 人の大腸がん患者における大腸がん組織とそれに付随する正常粘膜組織での **BMP-4** の発現と **Smad1/5** のリン酸化を免疫組織学的に検討した。

次に大腸がん細胞株 (HT29、DLD-1、SW480)を用いた *in vitro* の解析を行った。

qRT-PCR では、これらの大腸がん細胞株でも *BMP4* の発現が亢進していることが分かった (図 6A)。加えて、ELISA を用いた解析でも、膵臓がん細胞 (SUIT-2) を除いた、肺がん細胞 (A549)、子宮頸がん細胞 (HeLa)、乳がん細胞 (MDA-231-D)では、*BMP-4* を分泌していないのに対し、解析した全ての大腸がん細胞は *BMP-4* を自己分泌していた (図 6B)。以上の結果より、大腸がん細胞は *BMP-4* を自己分泌しており、それに伴い内因性の *BMP* シグナルが活性化していること、更には、その *BMP-4* が大腸がんの進展に重要である可能性が示唆された。

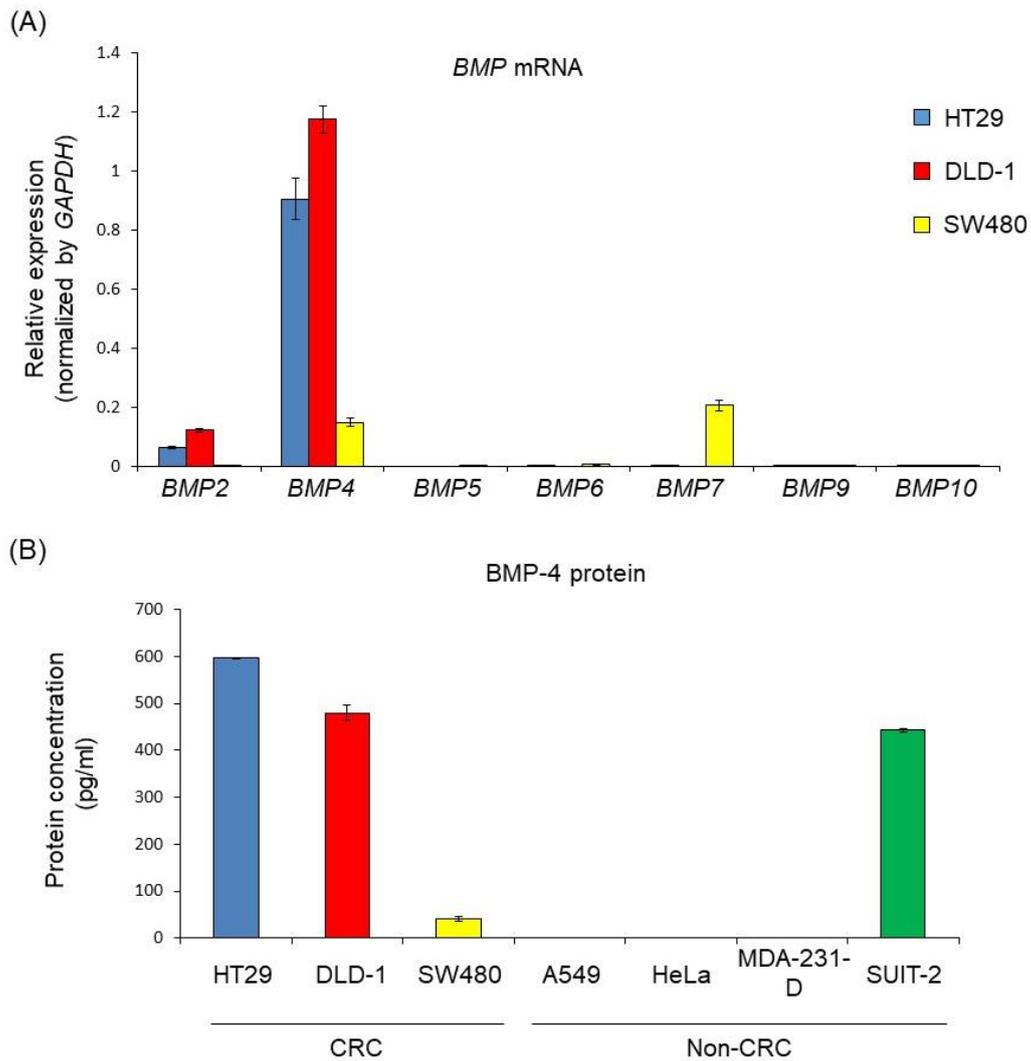


図 6 大腸がん細胞は BMP-4 を自己分泌する

(A) 大腸がん細胞での BMP の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。

(B) 大腸がん細胞 (CRC)と大腸がん以外のがん細胞 (Non-CRC)を 6 well plates に播種後 48 時間での培養上清中の BMP-4 タンパクの濃度を ELISA にて測定した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。

4-2 Wnt/ β -catenin シグナルによる *BMP4* の発現制御

次に、大腸がんにおいて *BMP4* の発現が亢進している機序について調べた。大腸における発がんの過程では、多段階の遺伝子変異が積み重なり、正常粘膜から腺腫を経てがんに至る adenoma-carcinoma sequence が知られている。この発がん過程の早期では、*APC* 遺伝子に変異が起き、 β -catenin のタンパクの安定性が亢進し、Wnt/ β -catenin シグナルが活性化することが知られている (9)。既報にて、大腸がん細胞の *BMP4* の enhancer region に、Wnt/ β -catenin シグナルの代表的な転写因子である TCF4 が結合し、*BMP4* 遺伝子の転写を制御しているとの報告があることから (10)、Wnt/ β -catenin シグナルと *BMP4* との発現の関係について追試した。まず、 β -catenin タンパクの発現を調べたところ、大腸がん細胞 (HT29、DLD-1、SW480) では、膵臓がん細胞 (SUIT-2) や乳がん細胞 (MDA-231-D) と比較して、 β -catenin の発現が高いことが分かった (図 7)。

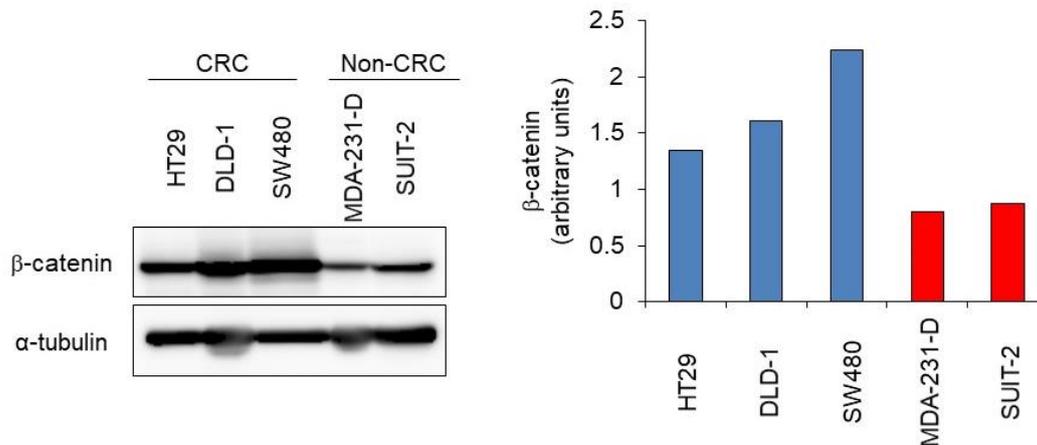


図7 大腸がん細胞ではβ-catenin タンパクの発現が亢進している

大腸がん細胞 (CRC)と大腸がん以外のがん細胞 (Non-CRC)でのβ-catenin タンパクの発現を Western blot により調べた (左)。β-catenin の発現をα-tubulin の発現によって補正し定量化した値を示す (右)。

大腸がん細胞において siRNA を用いて catenin beta 1 (*CTNNB1*、β-catenin)を knockdown すると、Wnt/β-catenin シグナルの標的遺伝子である axis inhibition protein 2 (*AXIN2*)の発現が低下すると共に、*BMP4* の発現も低下した (図 8A)。また、*BMP-4* タンパクの発現も遺伝子発現と呼応して低下した (図 8B)。この結果は、大腸がん細胞に Wnt/β-catenin シグナルの阻害剤である XAV939 を投与することでも再現されたことから (図 9A、9B)、Wnt/β-catenin シグナルが *BMP4* の発現を制御していると考えられた。

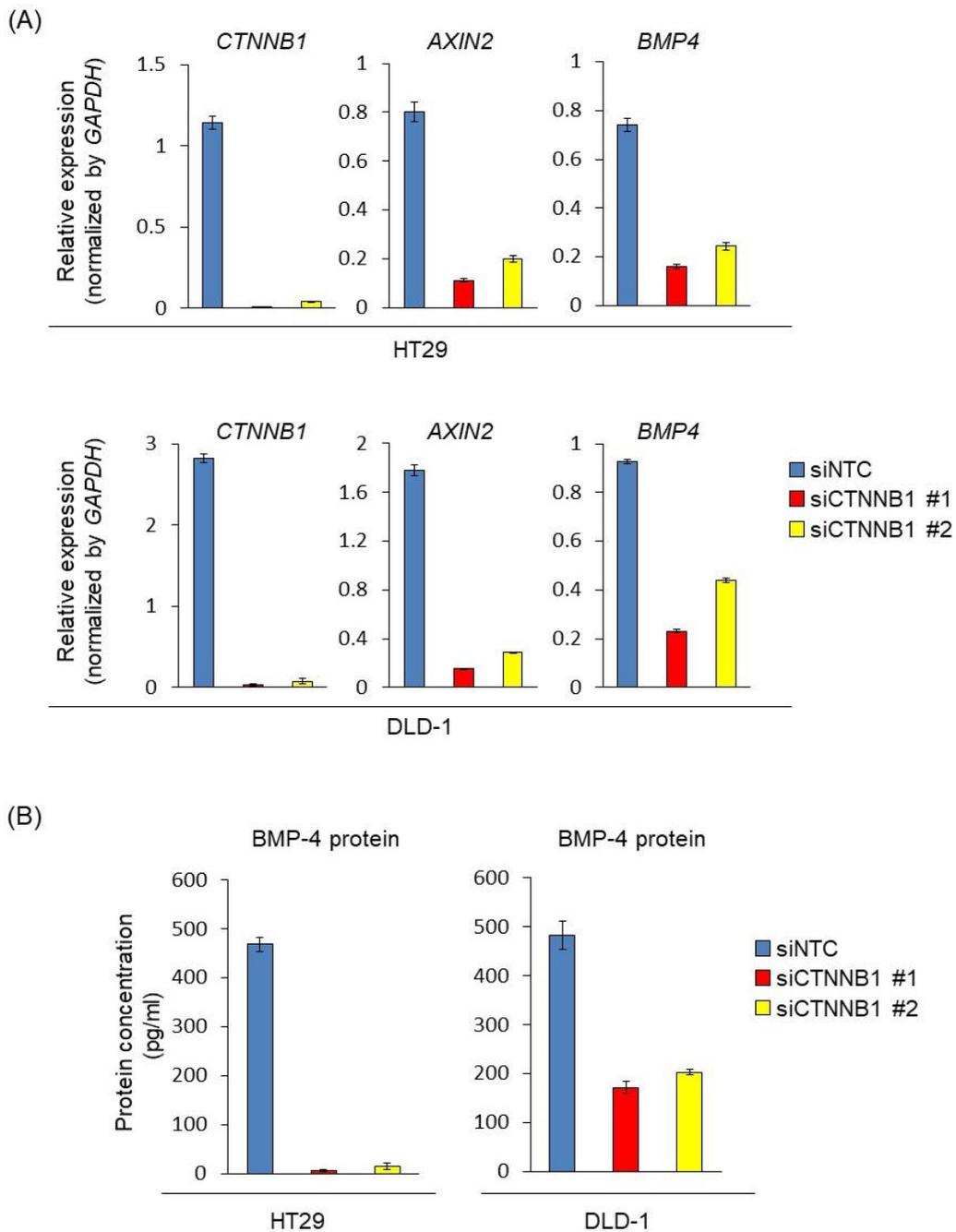


図 8 大腸がん細胞で β -catenin の knockdown は、*BMP4* の発現を低下させる
(A) HT29 細胞、DLD-1 細胞に control siRNA (siNTC) もしくは siCTNNB1 を transfection 後 72 時間での *CTNNB1*、*AXIN2*、*BMP4* の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。
(B) (A)における細胞での、48 時間での培養上清中の *BMP-4* タンパクの濃度を ELISA にて評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

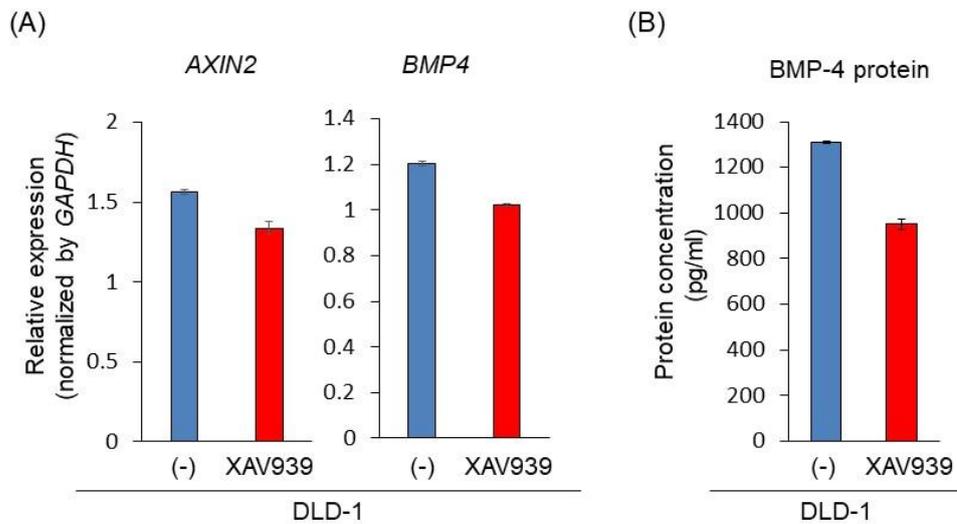


図9 大腸がん細胞で XAV939 は、*BMP4* の発現を低下させる

(A) DLD-1 細胞に XAV939 (1 μ M) を添加した後の *AXIN2*、*BMP4* の発現を qRT-PCR で評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

(B) (A) における細胞での、72 時間での培養上清中の *BMP-4* タンパクの濃度を ELISA にて評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

なお、大腸がん細胞と同様に、膵臓がん細胞である **SUIT-2** においても、**CTNNB1** を knockdown すると、**BMP4** の発現が低下することが分かった (図 10)。逆に、膵臓がん細胞である **SUIT-2**、**BxPC-3** に **Wnt-3a** を添加すると **AXIN2** と共に **BMP4** の発現も上昇しており (図 11)、**Wnt/β-catenin** シグナルによる **BMP4** の発現制御は大腸がん細胞特異的な制御機構ではないことが示唆された。

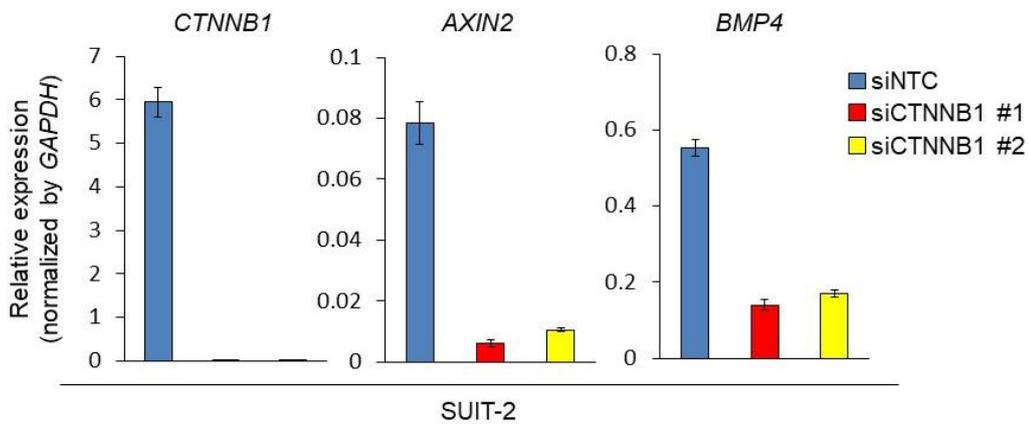


図 10 膵臓がん細胞で β -catenin の knockdown は、*BMP4* の発現を低下させる
SUIT-2 細胞に control siRNA (siNTC) もしくは siCTNNB1 を transfection 後 72 時間での *CTNNB1*、*AXIN2*、*BMP4* の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

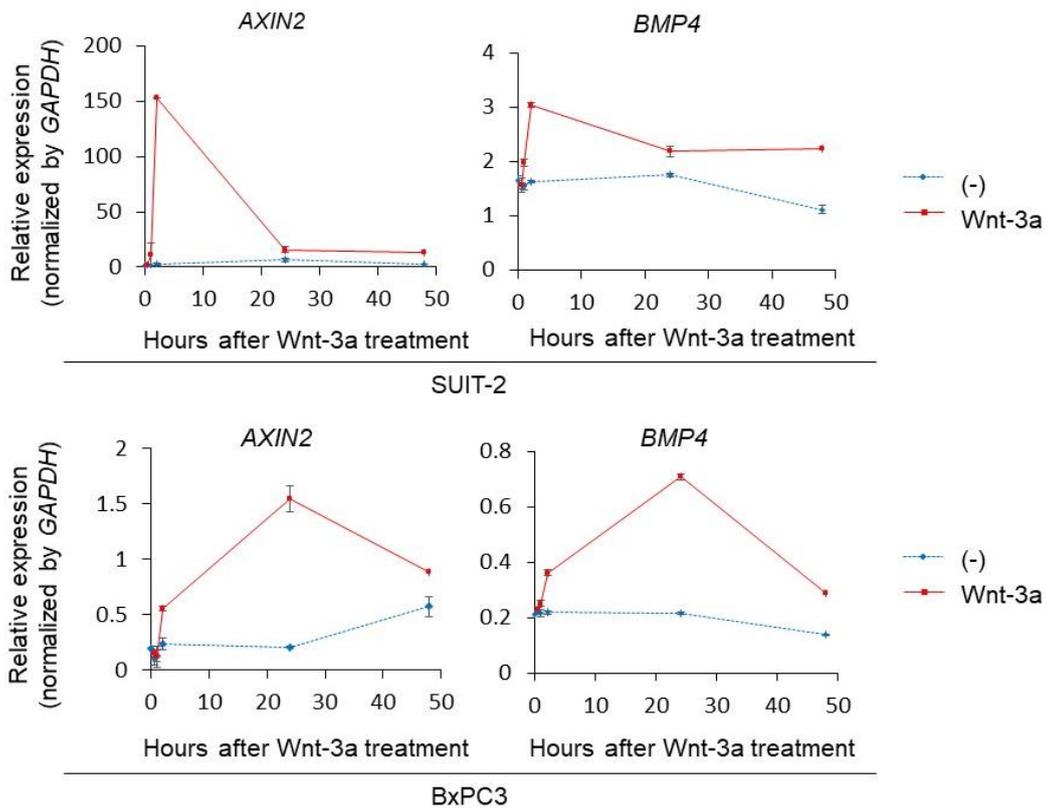


図 11 膵臓がん細胞で Wnt-3a は、*BMP4* の発現を上昇させる
SUIT-2 細胞、BxPC-3 細胞に Wnt-3a (200 ng/ml) 刺激を加えた後の *AXIN2*、*BMP4* の発現を qRT-PCR で経時的に評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

次に、*BMP4* が直接的に Wnt/ β -catenin シグナルにより制御されているかどうかを確認するため、新規タンパク合成阻害剤である CHX が Wnt-3a による *BMP4* の発現上昇に与える影響を qRT-PCR により調べた (図 12A)。その結果、CHX の添加は Wnt-3a による *BMP4* の発現変動に影響を与えなかった。更には、TCF4 による *BMP4* 遺伝子の転写制御についても確認した。既報にて *BMP4* の enhancer region と同定されている locus への TCF4 の結合を ChIP qRT-PCR にて評価した結果、SUIT-2 細胞において Wnt-3a の添加により、TCF4 の結合が増強し、HT29 細胞において *CTNNB1* を knockdown することで TCF4 の結合が減弱した (図 12B)。以上より、大腸がん細胞では Wnt/ β -catenin シグナルが亢進しており、この Wnt/ β -catenin シグナルにより *BMP-4* の発現が直接的に制御されていることが示唆された。

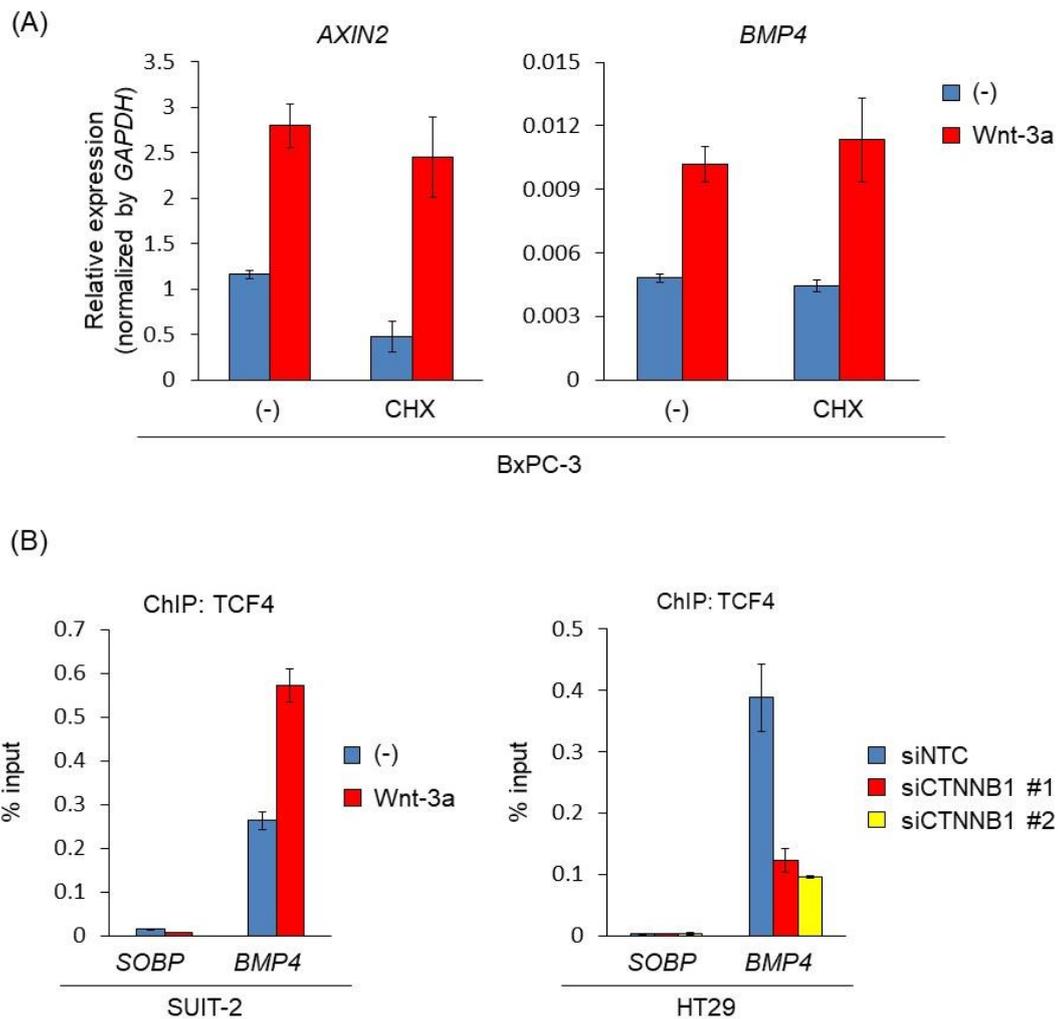


図 12 *BMP4* の発現は、Wnt/ β -catenin シグナルにより直接的に制御されている

(A) BxPC-3 細胞に CHX (1 ng/ml) を投与後 2 時間で Wnt-3a (200 ng/ml) 刺激を行い、24 時間後に *AXIN2*、*BMP4* の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

(B) SUIT-2 細胞に Wnt-3a (200 ng/ml) を添加 1.5 時間後、もしくは HT29 細胞に control siRNA (siNTC) もしくは siCTNNB1 を transfection 後 72 時間の細胞を用い、TCF4 が結合している DNA 断片における *BMP4* enhancer 領域の発現を ChIP qRT-PCR を用いて評価した。Negative control には、sine oculis-binding protein homolog (SOBP) を用いた。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

4-3 大腸がん細胞の腫瘍増殖に対する *BMP4* knockdown の効果

BMP-4 が大腸がんの腫瘍増殖に与える影響を調べるために、lentivirus を用いて negative control (NTC) と *BMP4* を標的とした shRNA を HT29 細胞、SW480 細胞に導入し (HT29-shNTC 細胞、HT29-sh*BMP4* 細胞、SW480-shNTC 細胞、SW480-sh*BMP4* 細胞)、*BMP4* の knockdown 株を作成した。qRT-PCR にて *BMP-4* の直接的な標的遺伝子である *ID1* の発現が低下していた(図 13A)。また、ELISA にて *BMP-4* タンパクの発現が消失していたことから (図 13B)、HT29-sh*BMP4* 細胞および SW480-sh*BMP4* 細胞では内因性の *BMP* シグナルが減弱していることが分かった。

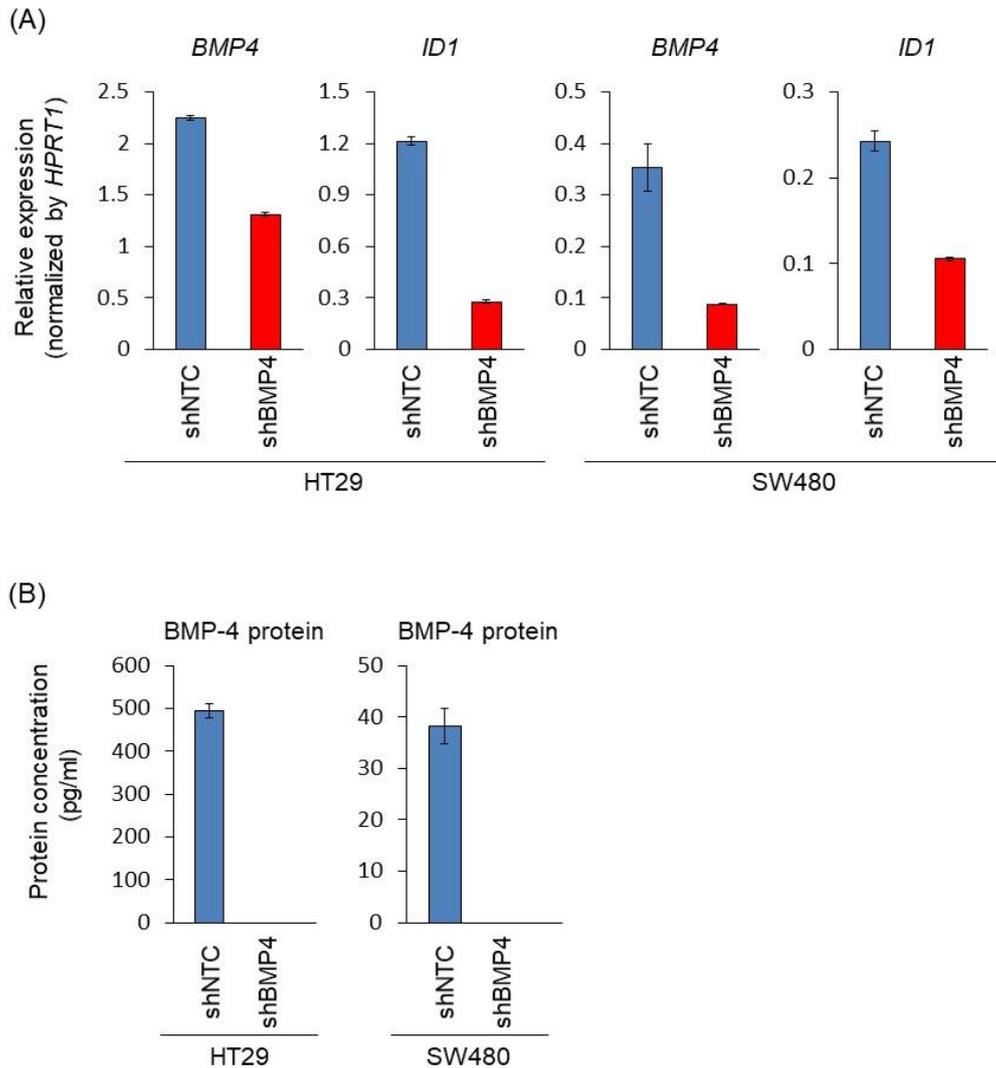


図 13 大腸がん細胞での *BMP4* の knockdown

(A) 大腸がん細胞に lentivirus vector を用いて control shRNA (HT29-shNTC、SW480-shNTC) と shBMP4 (HT29-shBMP4、SW480-shBMP4) を導入した。*ID1* と *BMP4* の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。

(B) (A)における細胞での播種後 48 時間での培養上清中の *BMP-4* タンパクの濃度を ELISA により評価した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。

BALB/c *nu/nu* マウスの皮下にこれらの細胞を移植したところ、BMP-4 を knockdown した大腸がん細胞では、腫瘍増殖能が低下することが分かった (図 14)。以上より、大腸がん細胞が自己分泌する BMP-4 は、腫瘍増殖に重要であることが分かった。

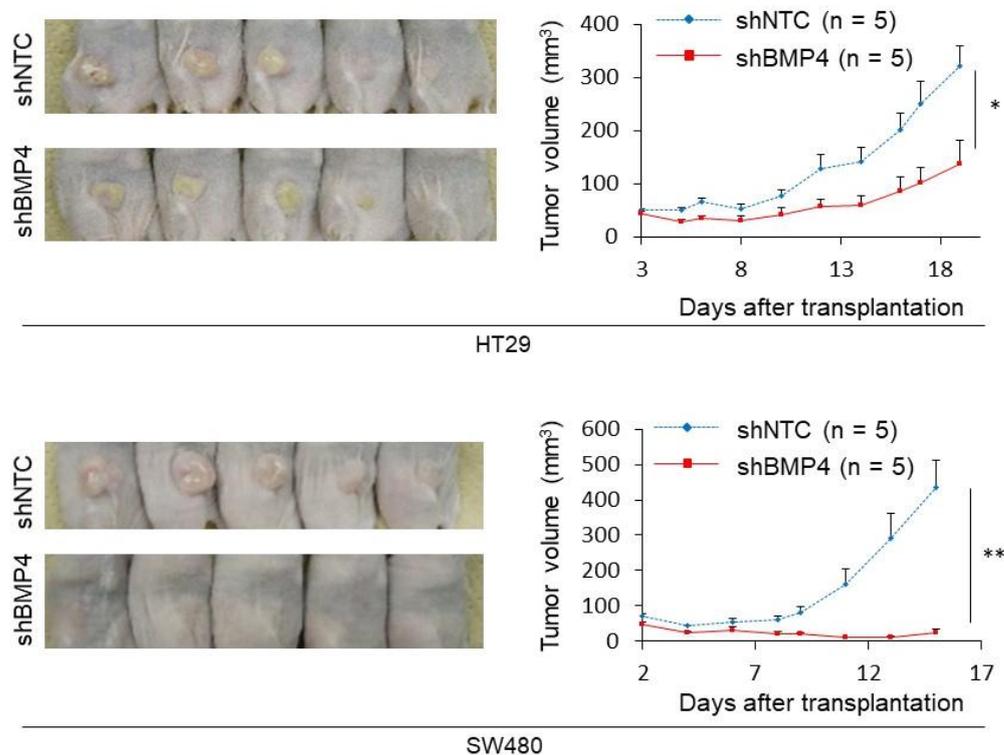


図 14 *BMP4* の knockdown は大腸がん細胞の腫瘍増殖能を低下させる
BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に HT29-shNTC 細胞 (n = 5)、HT29-shBMP4 細胞 (n = 5) もしくは、SW480-shNTC 細胞 (n = 5)、SW480-shBMP4 細胞 (n = 5) を移植し、腫瘍体積を経時的に評価した。結果は平均値 ± 標準誤差を表す。(*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

4-4 大腸がん細胞の apoptosis に対する BMP4 knockdown の効果

大腸がん細胞が自己分泌する BMP-4 が、大腸がん細胞の増殖に影響を与えていると考え、*in vitro* の実験を行った。siRNA を用いて BMP4 を knockdown し、無血清下での細胞増殖を調べたところ、BMP4 の knockdown は細胞増殖速度を減弱させることが分かった (図 15)。

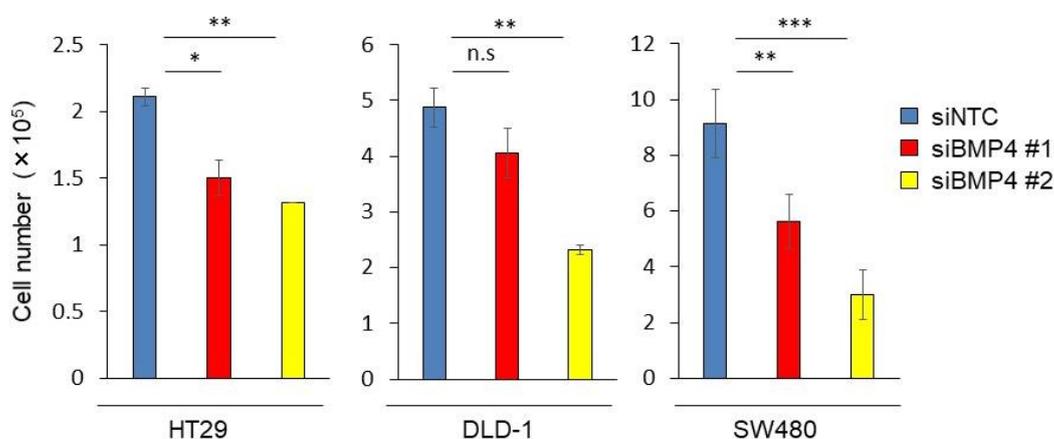


図 15 BMP4 の knockdown は大腸がん細胞の細胞増殖速度を減弱させる
大腸がん細胞に siNTC もしくは siBMP4 を transfection した後、16 時間後に血清を除去し、3 日後に細胞数を測定した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。

この作用が apoptosis に起因するものかどうかを TUNEL assay、Western blot により解析した。TUNEL assay では、BMP4 の knockdown により TUNEL 陽性細胞が増加することが分かった (図 16A)。また、Western blot では、BMP4 の knockdown により poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の cleavage が亢進した (図 16B)。以上より大腸がん細胞が自己分泌する BMP-4 は、apoptosis の回避など、大腸がん細胞の生存に重要であることが示唆された。

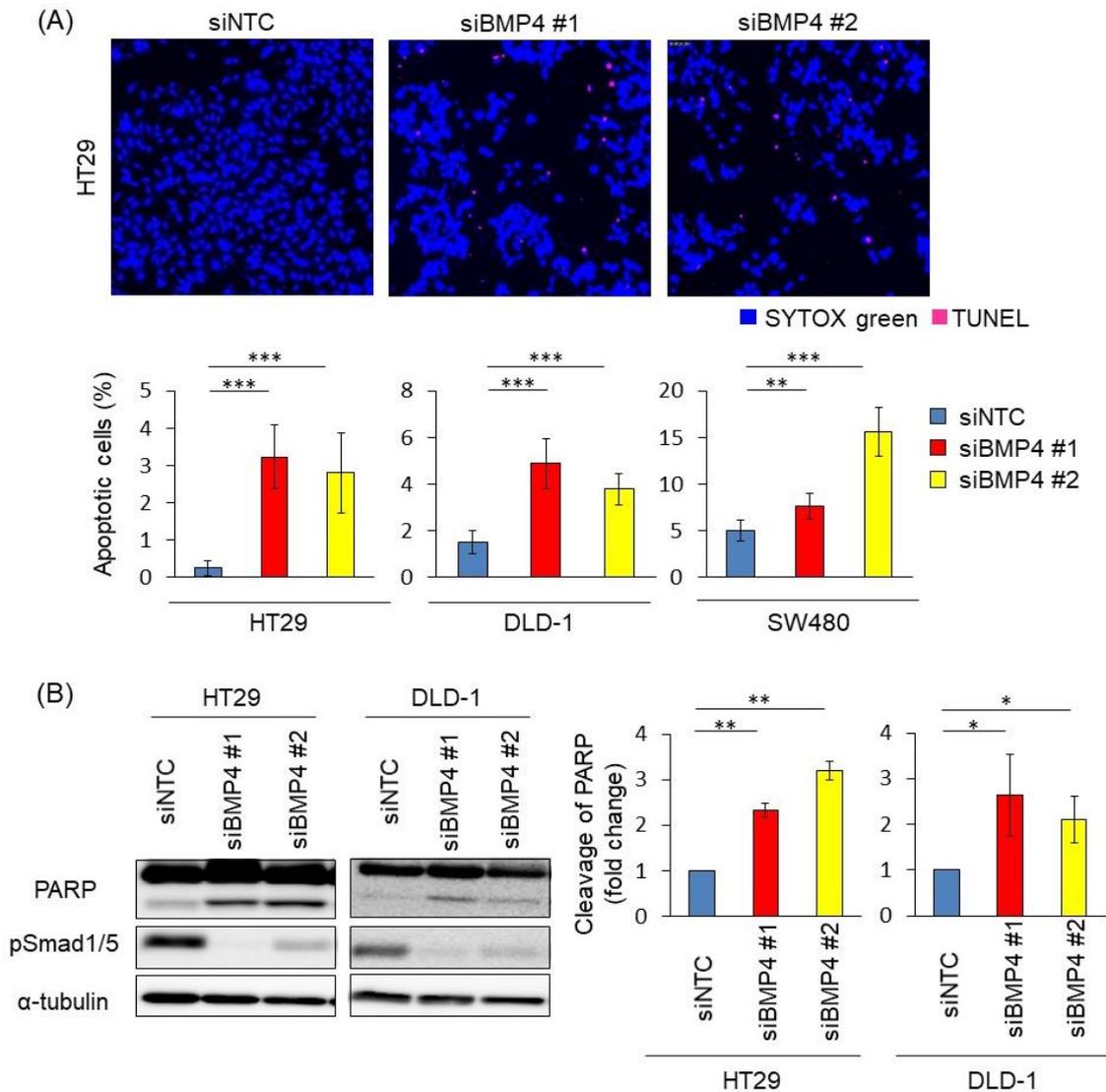


図 16 *BMP4* の knockdown は大腸がん細胞に apoptosis を誘導する

(A) 図 15 における細胞で TUNEL assay を行った。写真は赤い染色が TUNEL を、青い染色が SYTOX green を表す (上)。核染色された細胞中の TUNEL 陽性細胞の割合を異なる 6 視野で計測し、その平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (下)。(**, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$)

(B) (A)における細胞でのタンパクの発現を、図中に示す抗体を用いて Western blot により評価した (左)。PARP の cleavage を α -tubulin の発現で補正した後、定量化した値を negative control を基準とした fold change で表す。2 つの独立した実験の平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (右)。(*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

4-5 BMP 阻害剤の大腸がん細胞の apoptosis に対する効果

これまでの結果から、BMP の I 型受容体の阻害剤である LDN-193189 の大腸がん細胞の apoptosis に対する作用を調べた。まず、LDN-193189 が大腸がん細胞の内因性の BMP シグナルを抑制し得るかどうか検討した。BMP の antagonist である noggin と同様に、LDN-193189 を大腸がん細胞に添加すると Smad1/5 のリン酸化が減弱し、*ID1* の発現も低下することから、LDN-193189 は大腸がん細胞の内因性 BMP シグナルを効果的に阻害する活性があることが確認された (図 17A、17B)。

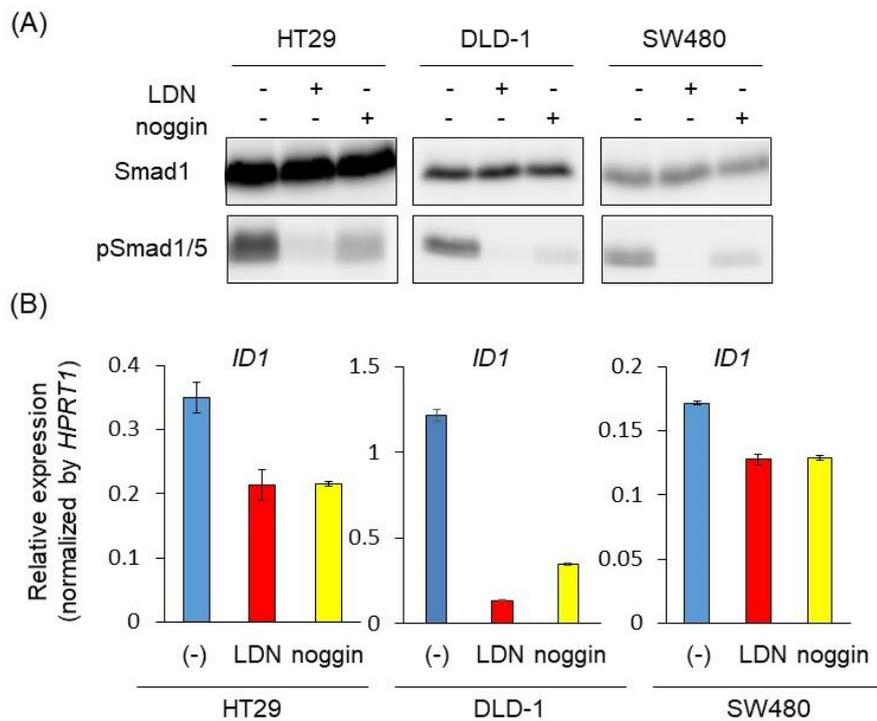


図 17 LDN-193189、noggin は大腸がん細胞の内因性の BMP シグナルを抑制する

(A) 大腸がん細胞に LDN-193189 (LDN, 0.2-0.3 μ M)もしくは noggin (50 ng/ml)投与し、2時間後のタンパクの発現を図中の抗体を用いて Western blot で評価した。

(B) (A)における細胞での *ID1* の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

無血清下で大腸がん細胞に LDN-193189 を添加すると、細胞増殖が有意に抑制された (図 18)。また、TUNEL 陽性細胞が増加し、PARP の cleavage も亢進することが分かった (図 19A、19B)。そして、この PARP の cleavage の増加は、caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK の投与により減弱した(図 20)。

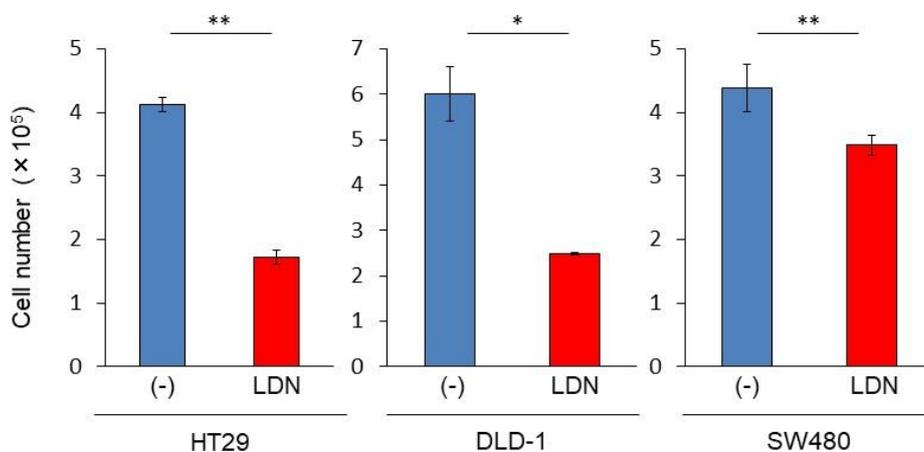


図 18 LDN-193189 は大腸がん細胞の細胞増殖速度を抑制する

大腸がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に DMSO もしくは LDN-193189 (LDN, 0.2-0.3 μM) 投与下で 3 日間培養し、細胞数を評価した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。(*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)

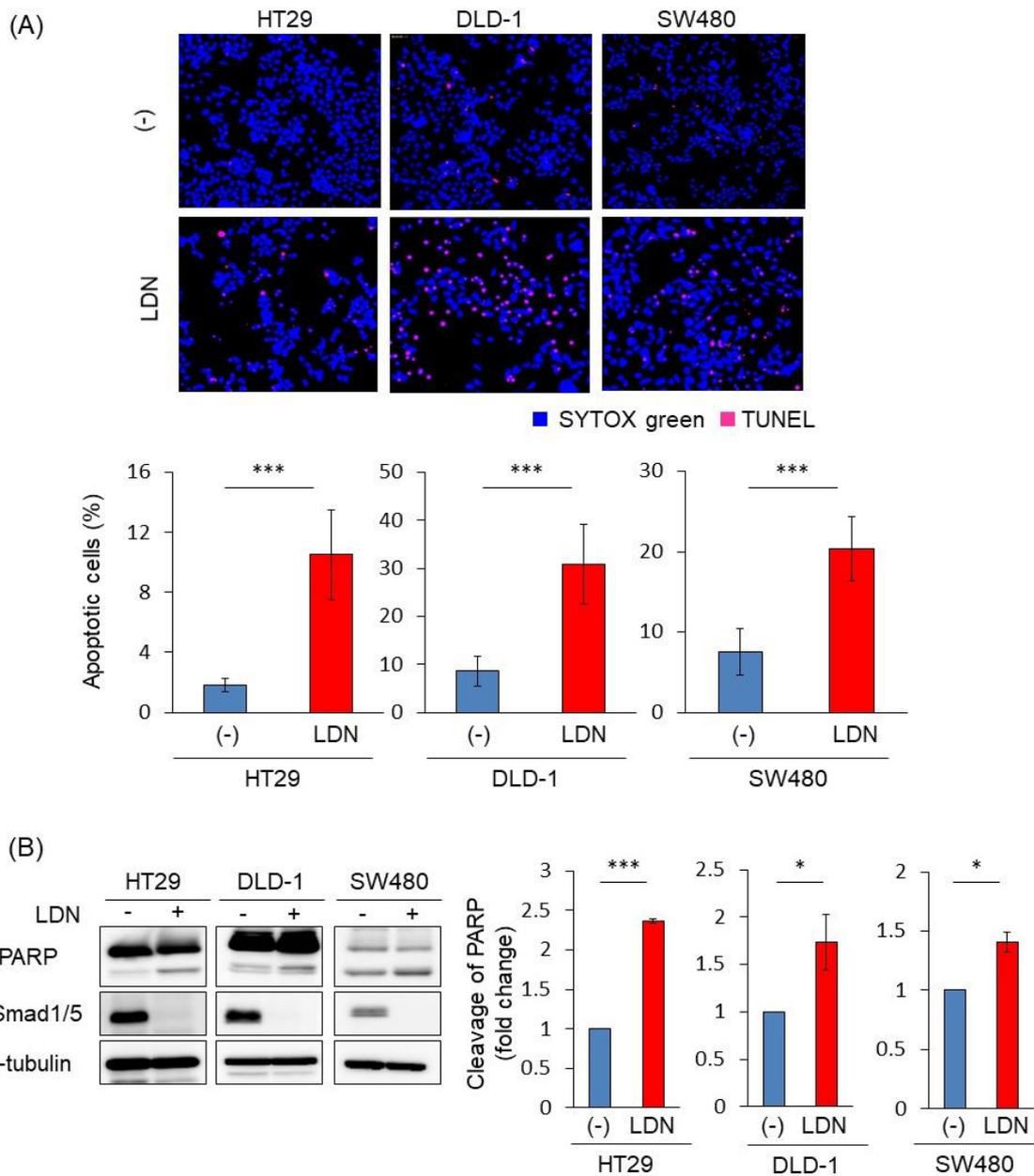


図 19 LDN-193189 は大腸がん細胞の apoptosis を誘導する

(A) 図 18 における細胞で TUNEL assay を行った。写真は赤い染色が TUNEL を、青い染色が SYTOX green を表す (上)。核染色された細胞中の TUNEL 陽性細胞の割合を異なる 6 視野で計測し、その平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (下)。(***, $P < 0.001$)

(B) 図 18 における細胞でのタンパクの発現を、図中に示す抗体を用いた Western blot により評価した (左)。PARP の cleavage を α -tubulin の発現で補正した後、定量化した値を基準とした fold change で表す。2 つの独立した実験の平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (右)。(*, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$)

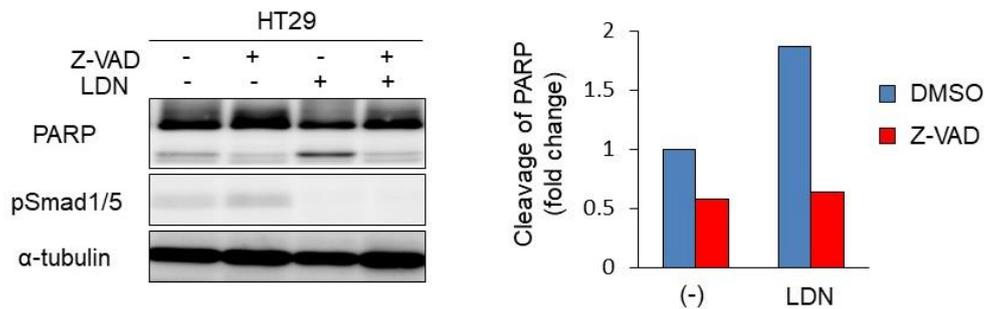


図 20 Z-VAD-FMK は LDN-193189 が誘導する大腸がん細胞の apoptosis を抑制する

大腸がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に Z-VAD-FMK (Z-VAD, 20 μ M) と LDN-193189 (LDN, 0.2-0.3 μ M) 投与下で 3 日間培養した。タンパクの発現を、図中に示す抗体を用いて Western blot により評価した (左)。PARP の cleavage を α -tubulin の発現で補正した後、定量化した値を基準とした fold change で表す (右)。

LDN-193189 は、BMP シグナルだけでなく、AMP-activated protein kinase (AMPK)、platelet-derived growth factor (PDGF) や VEGF などの tyrosine kinase の活性に影響を与えることが知られている (11-14)。このため、LDN-193189 による apoptosis 誘導が、内因性の BMP シグナルの抑制に起因するものかどうかを検討するため、BMP シグナルを特異的に阻害する noggin の投与によりこの結果が再現できるかどうかを検証した。無血清下で noggin を添加すると、LDN-193189 と同様に TUNEL 陽性細胞が増加し (図 21A)、PARP の cleavage が亢進した (図 21B)。以上の結果より、LDN-193189 などの BMP 阻害剤は、大腸がん細胞に apoptosis を誘導する活性があることが示された。

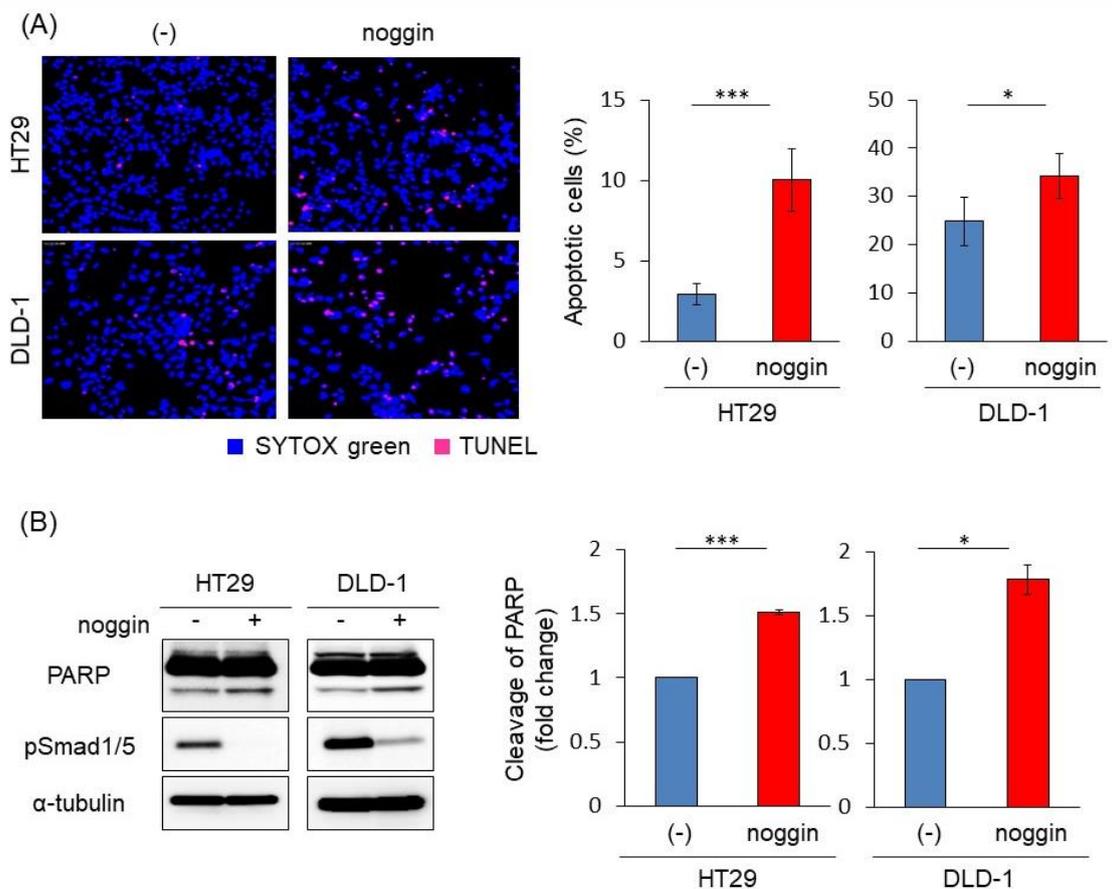


図 21 **noggin** は大腸がん細胞の **apoptosis** を誘導する

(A) 大腸がん細胞を 24 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に **noggin** (50 ng/ml) 投与下で 3 日間培養し、TUNEL assay を行った。写真は赤い染色が TUNEL を、青い染色が SYTOX green を表す (左)。核染色された細胞中の TUNEL 陽性細胞の割合を異なる 6 視野で計測し、その平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (右)。(*, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$)

(B) (A)における細胞でのタンパクの発現を、図中に示す抗体を用いて Western blot により評価した (左)。PARP の cleavage を α -tubulin の発現で補正した後、定量化した値を基準とした fold change で表す。2つの独立した実験の平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (右)。(*, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$)

4-6 大腸がん細胞での BMP シグナルによる *DUSP5* の発現を介した MAPK の制御

大腸がん細胞において LDN-193189 が apoptosis を誘導する分子メカニズムを解明するため、HT29 細胞、DLD-1 細胞各々における、LDN-193189 投与群と control 群での mRNA の発現を RNA-seq にて網羅的に解析した。その結果、HT29 細胞、DLD-1 細胞で LDN-193189 を投与した際に、共に発現が上昇する遺伝子が 62 遺伝子、共に発現が低下する遺伝子が 24 遺伝子、抽出された (図 22)。

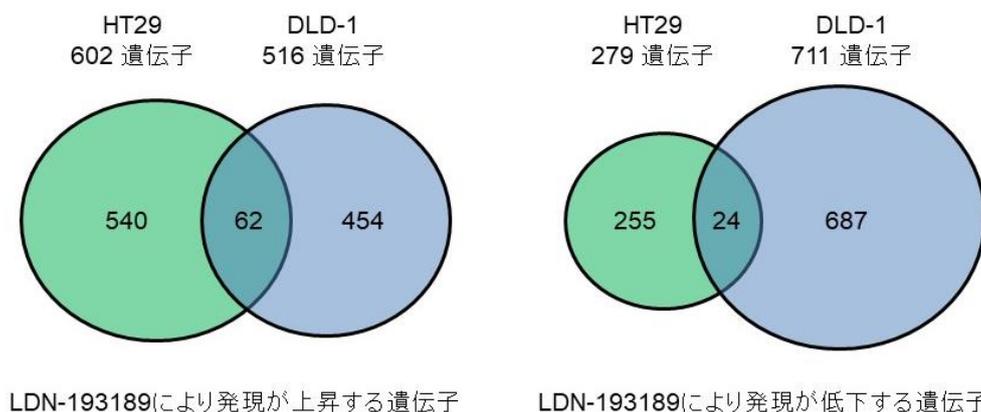


図 22 大腸がん細胞に LDN-193189 を加えた際に発現が変動する遺伝子の数
大腸がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に DMSO もしくは LDN-193189 (LDN, 0.2-0.3 μ M)投与下で 3 日間培養し、RNA-seq を行った。RPKM > 3 の遺伝子を抽出し解析した。LDN 投与により Fold change が 1.5 より大きくなるもの (左) と -1.5 より小さくなるもの (右) の遺伝子数をベン図により示す。

さらに抽出された遺伝子群の Gene Ontology (GO) 解析を行った結果、LDN-193189 によって HT29 細胞、DLD-1 細胞で共通して変動する ontology の上位に “inactivation of MAPK activity” が含まれていることが判明した (図 23A)。さらにその ontology に含まれている遺伝子の多くが DUSP family 遺伝子であった (図 23B)。特に RNA-seq の解析により、DUSP family 遺伝子の中で、*DUSP5* が最も発現が高く、かつ LDN-193189 による発現上昇が最も顕著であったため (図 24)、以降の解析では *DUSP5* に焦点をあてた。

(A)

HT29

Gene ontology	P-value
ion transport	1.24E-11
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1.52E-10
amino acid transport	2.35E-08
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	5.59E-08
negative regulation of transcription, DNA-dependent	9.37E-07
chromatin silencing	3.38E-06
amino acid transmembrane transport	4.4E-06
response to cAMP	4.61E-06
inflammatory response	2.92E-05
transcription, DNA-dependent	5.15E-05
skeletal muscle cell differentiation	6.27E-05
positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	0.000164
cellular response to hormone stimulus	0.000196
negative regulation of fat cell differentiation	0.000258
mammary gland branching involved in thelarche	0.000303
cellular response to insulin stimulus	0.000363
inactivation of MAPK activity	0.000405
response to progesterone stimulus	0.000405
liver development	0.000457
placenta blood vessel development	0.000542

DLD-1

Gene ontology	P-value
digestion	9.44E-05
endoderm formation	0.000132
carbohydrate metabolic process	0.000156
transmembrane transport	0.000167
heterotypic cell-cell adhesion	0.000373
Notch signaling involved in heart development	0.000373
skeletal muscle cell differentiation	0.000498
negative regulation of cell proliferation	0.000915
inactivation of MAPK activity	0.001274
positive regulation of leukocyte chemotaxis	0.001462
proteasomal protein catabolic process	0.001462
negative regulation of protein autophosphorylation	0.001462
G-protein coupled receptor signaling pathway	0.001979
gluconeogenesis	0.002047
response to calcium ion	0.002047
positive regulation of cell migration	0.002959
glycosaminoglycan metabolic process	0.00328
lung-associated mesenchyme development	0.003457
cellular response to zinc ion	0.003457
glycerol metabolic process	0.003457

(B)

Inactivation of MAPK activity

DLD-1	HT29
DUSP1	DUSP1
DUSP4	DUSP2
DUSP5	DUSP3
DUSP8	DUSP5
SPRED1 (Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 1)	DUSP8
SPRED2 (Sprouty-related, EVH1 domain-containing protein 2)	DUSP16
	GPS2 (G protein pathway suppressor 2)

図 23 大腸がん細胞に LDN-193189 を加えた際に発現が上昇する遺伝子の Gene Ontology 解析

(A) 図 22 の解析において発現が LDN-193189 により上昇する遺伝子に対して Gene Ontology 解析を行った。有意に変動する上位 20 番目までの Gene Ontology を表で示す。

(B) (A)の Gene Ontology 解析において実際に “inactivation of MAPK activity” の gene ontology に含まれる遺伝子を列挙した。DUSP family に属する遺伝子は赤文字で表した

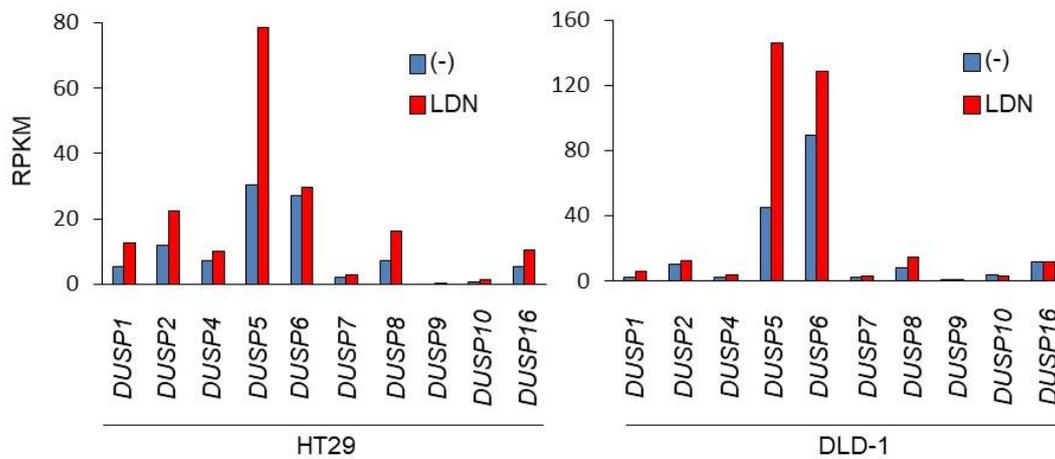


図 24 大腸がん細胞に LDN-193189 を加えた際の DUSP family 遺伝子の発現変動

RNA seq のデータより DUSP family に属する遺伝子の発現を抽出した。

あらためて大腸がん細胞に LDN-193189 を投与し、*DUSP5* の発現変動を qRT-PCR にて評価した結果、全ての大腸がん細胞において LDN-193189 による発現上昇が認められた (図 25A)。またこの結果は *noggin* でも再現された (図 25B)。加えて、乳がん細胞 (MDA-231-D)、肺がん細胞 (A549) に BMP-4 を添加すると、*DUSP5* の発現が低下したことから、*DUSP5* は BMP-4 により抑制される標的遺伝子であることが示された (図 25C)。

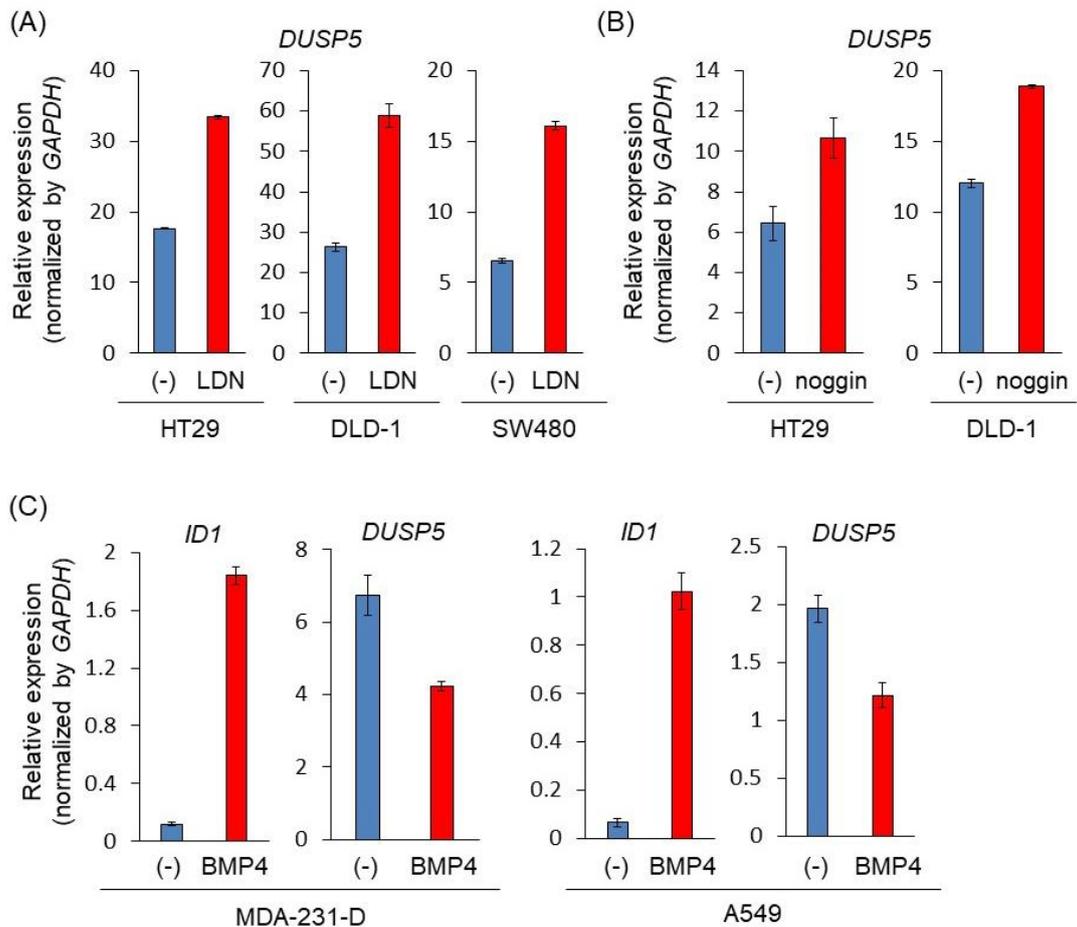


図 25 BMP-4 は *DUSP5* の発現を抑制する

(A) 大腸がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に LDN-193189 (LDN, 0.2-0.3 μ M) 投与下で 3 日間培養し、qRT-PCR により *DUSP5* の発現を評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

(B) 大腸がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に noggin (50 ng/ml) 投与下で 3 日間培養し、qRT-PCR により *DUSP5* の発現を評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

(C) 乳がん細胞もしくは肺がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に BMP-4 (30 ng/ml) 投与下で各々 3 日間もしくは 24 時間培養し、qRT-PCR により *DUSP5* の発現を評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

DUSP5は核内のMAPKのphosphataseであり、Erk MAPK特異的なphosphataseであることから、大腸がん細胞においてLDN-193189、nogginがMAPKに与える影響をWestern blotにて評価した。この結果、LDN-193189によりp38 MAPKのリン酸化、c-Jun N-terminal kinase (JNK) MAPKのリン酸化に関しては変動する可能性があるものの、細胞間で一致した傾向は認めなかった(図26A)。一方で、解析した全ての大腸がん細胞では、LDN-193189もしくはnogginの投与にてErk MAPKのリン酸化が減弱した(図26A、26B)。以上の結果より、大腸がん細胞では、DUSP5の発現を介して、BMPシグナルによりErk MAPKが制御されていることが示唆された。

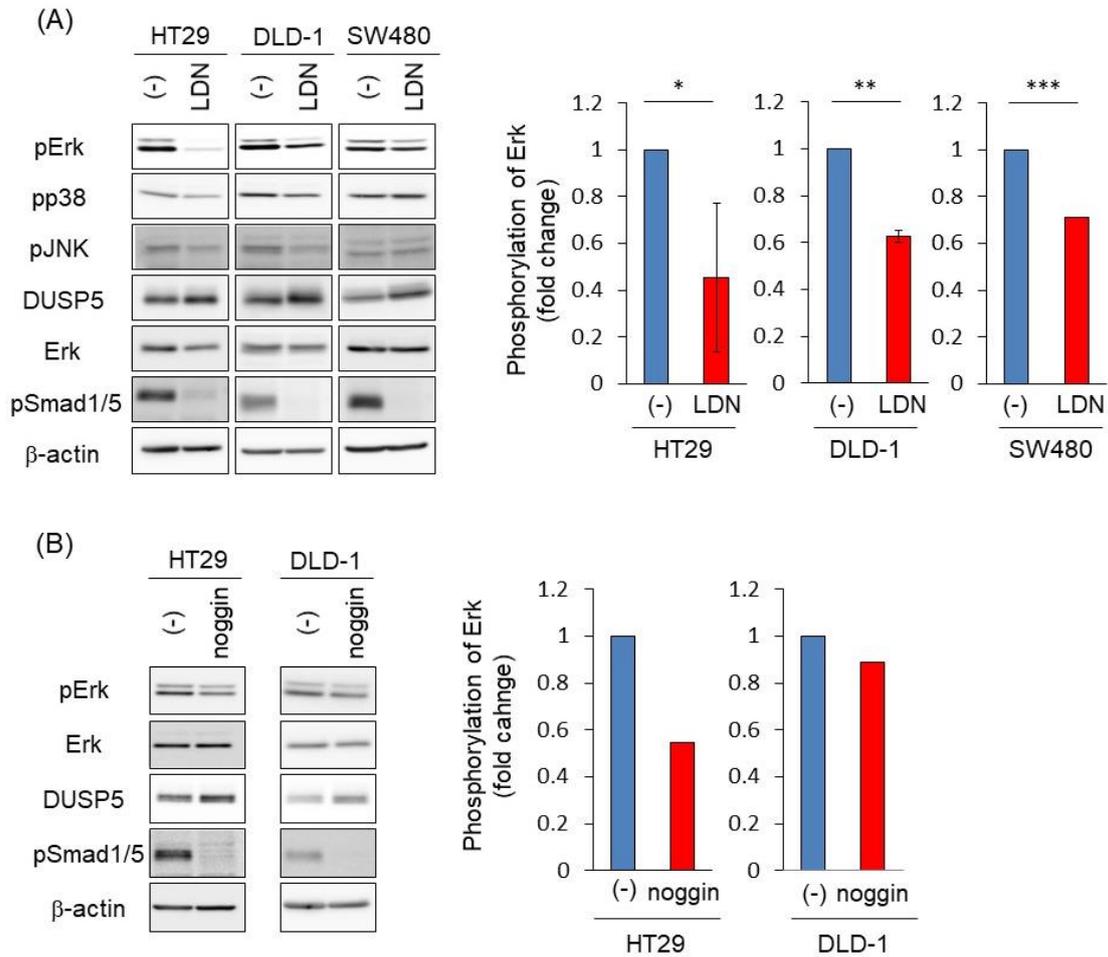


図 26 BMP シグナルは DUSP5 の発現を抑制し、Erk MAPK を活性化する

(A) 大腸がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に LDN-193189 (LDN, 0.2-0.3 μ M) 投与下で 3 日間培養し、タンパクの発現を図中に示す抗体を用いて Western blot により評価した (左)。Erk のリン酸化を β -actin の発現で補正した後、定量化した値を基準とした fold change で表す。2 つの独立した実験の平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (右)。(*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$)

(B) 大腸がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に noggin (50 ng/ml) 投与下で 3 日間培養し、タンパクの発現を図中に示す抗体を用いて Western blot により評価した (左)。Erk のリン酸化を β -actin の発現で補正した後、定量化した値を基準とした fold change で表す (右)。

4-7 大腸がん細胞における *DUSP5* の pro-apoptotic な作用

DUSP5 が BMP シグナルの下流で、大腸がん細胞の生存に重要な遺伝子である

ことを確認するため、siRNA を用いて *DUSP5* を knockdown した (図 27)。

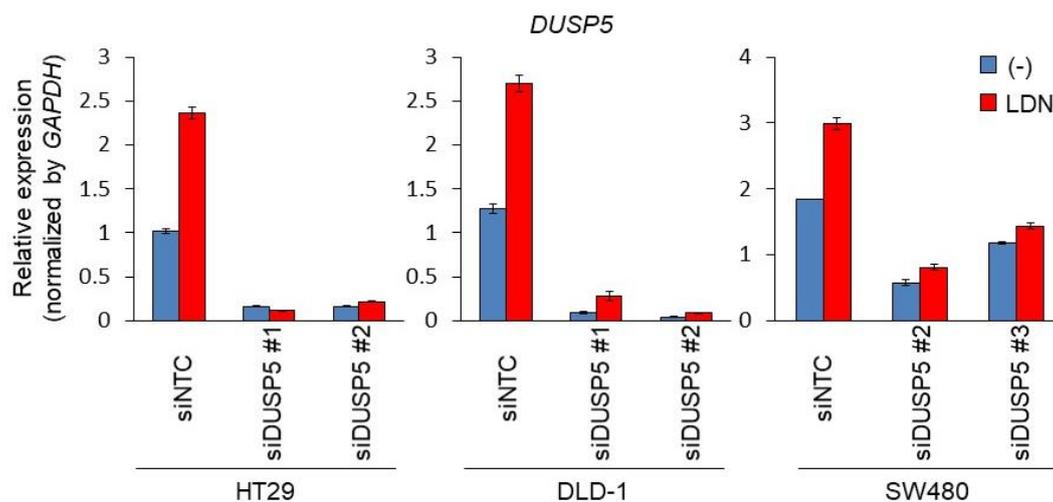


図 27 大腸がん細胞での *DUSP5* の knockdown

大腸がん細胞に siNTC もしくは siDUSP5 を transfection した後、16 時間後に血清を除去し、DMSO もしくは LDN-193189 (LDN, 0.2-0.3 μ M) 投与下で 3 日間培養した。*DUSP5* の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差を表す。

DUSP5 を knockdown すると、無血清下において LDN-193189 による細胞増殖に対する抑制作用が減弱した (図 28)。また、TUNEL assay では、LDN-193189 による TUNEL 陽性細胞の増加が減弱し (図 29A)、Western blot では PARP の cleavage が減弱した (図 29B)。加えて、Erk のリン酸化の減弱も消失した (図 29B)。

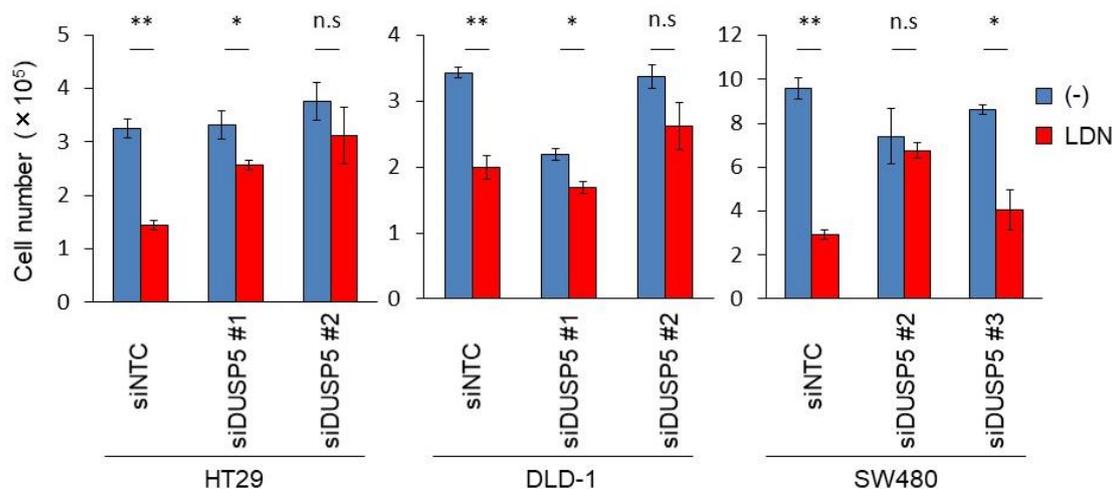


図 28 大腸がん細胞での *DUSP5* の knockdown は、LDN-193189 による細胞増殖抑制作用を減弱させる

図 27 の細胞における細胞数を表す。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; n.s., non-significant)

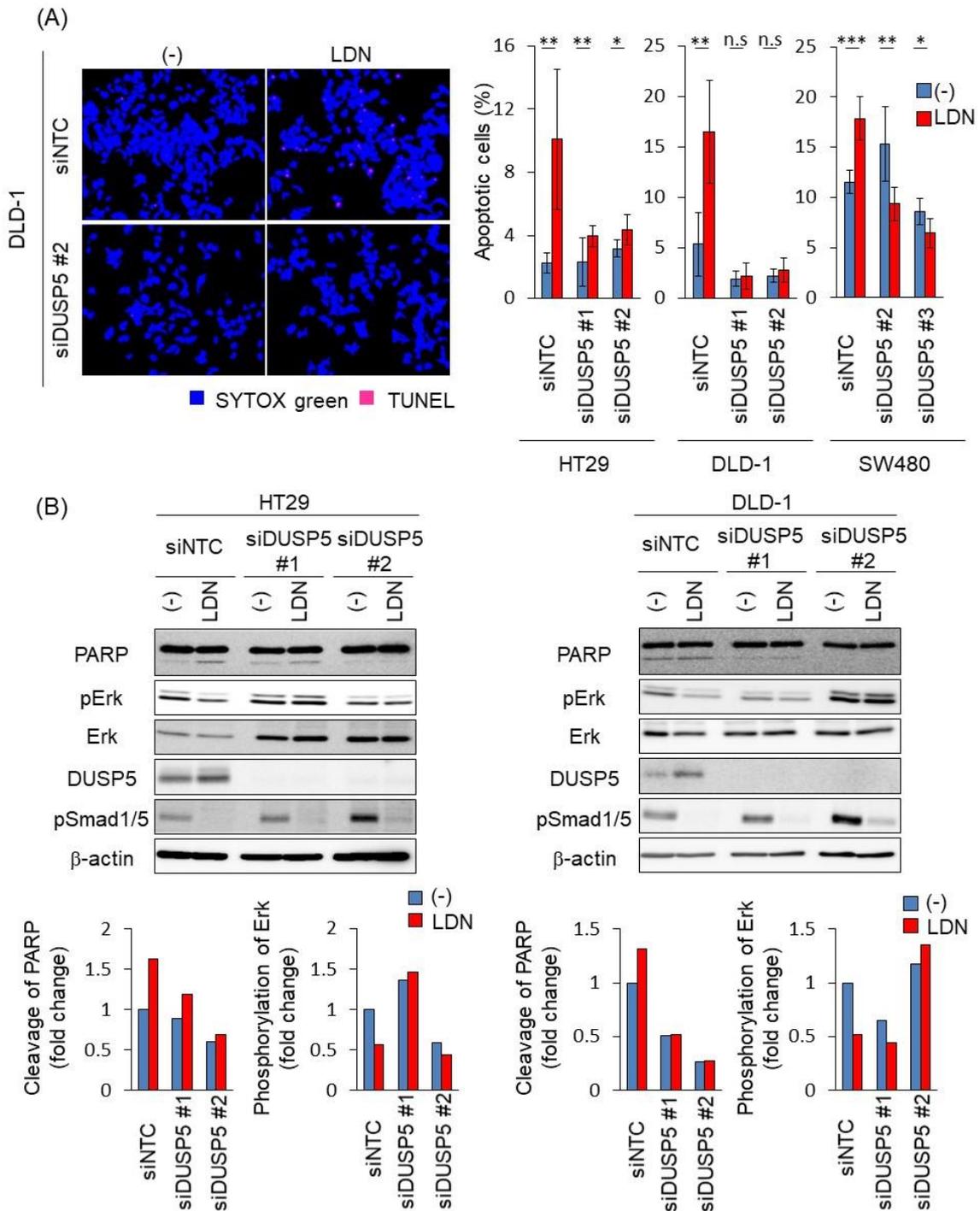


図 29 大腸がん細胞での *DUSP5* の knockdown は、LDN-193189 による apoptosis 誘導を減弱させる

(A) 図 27 における細胞で TUNEL assay を行った。写真は赤い染色が TUNEL を、青い染色が SYTOX green を表す (左)。核染色された細胞中の TUNEL 陽性細胞の割合を異なる 6 視野で計測し、その平均値 ± 標準偏差をグラフで示す (右)。
 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; n.s., non-significant)

(B) 図 27 の細胞におけるタンパクの発現を図中に示す抗体を用いて Western blot により評価した (上)。PARP の cleavage と Erk のリン酸化を β -actin の発現で補正した後、定量化した値を negative control を基準とした fold change で表す (下)。

更に、*DUSP5* の pro-apoptotic な作用を確認するため、lentivirus vector を用いて *DUSP5* を大腸がん細胞に強制発現させた (図 30)。 *DUSP5* の強制発現により、無血清下にて、細胞増殖は抑制された (図 31)。

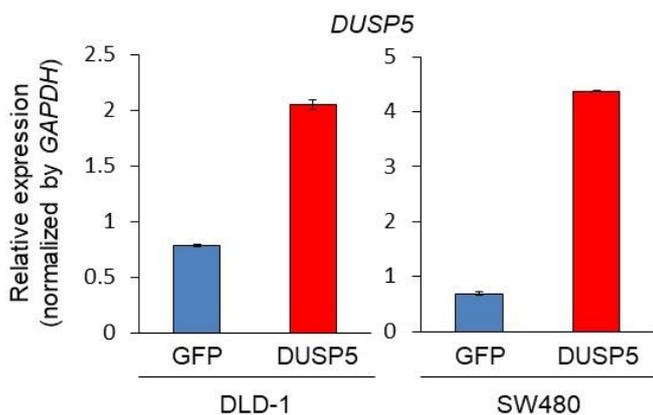


図 30 大腸がん細胞での *DUSP5* の強制発現

DLD-1、SW480 細胞に lentivirus vector を用いて GFP (DLD-1-GFP 細胞、SW480-GFP 細胞) もしくは *DUSP5* (DLD-1-*DUSP5* 細胞、SW480-*DUSP5* 細胞) を強制発現させた。 *DUSP5* の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。

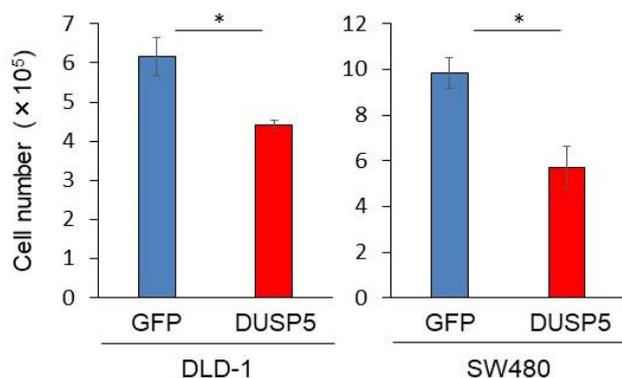


図 31 大腸がん細胞での *DUSP5* の強制発現は細胞増殖を抑制する

図 30 の細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に 3 日間培養し、細胞数を評価した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。 (*, $P < 0.05$)

TUNEL assay では、TUNEL 陽性細胞が増加した (図 32A)。また Western blot では、PARP の cleavage が亢進し、Erk のリン酸化も減弱した (図 32B)。

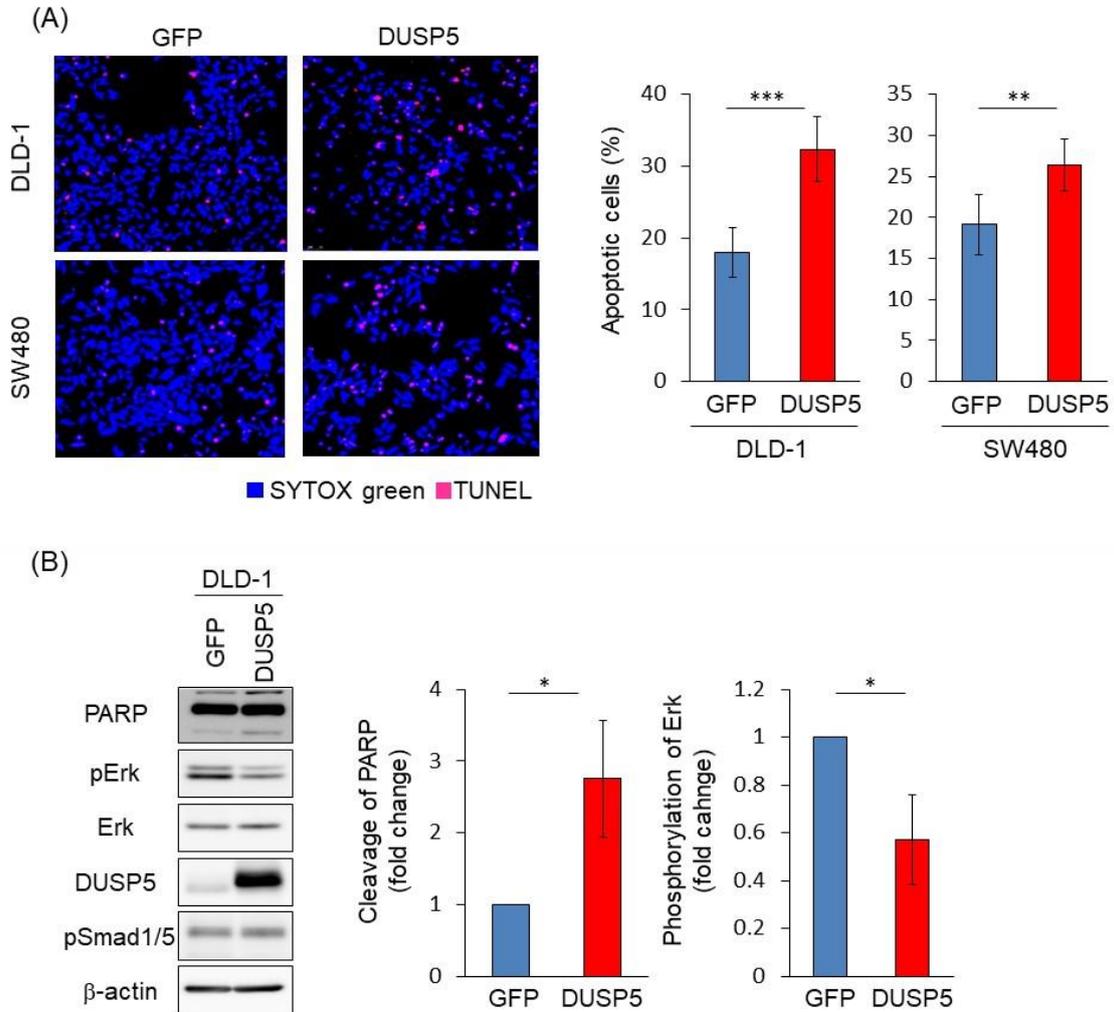


図 32 大腸がん細胞での *DUSP5* の強制発現は apoptosis を誘導する

(A) 図 31 における細胞で TUNEL assay を行った。写真は赤い染色が TUNEL を、青い染色が SYTOX green を表す (左)。核染色された細胞中の TUNEL 陽性細胞の割合を異なる 6 視野で計測し、その平均値 ± 標準偏差をグラフで示す (右)。(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

(B) 図 31 の細胞におけるタンパクの発現を図中に示す抗体を用いて Western blot により評価した (左)。Erk のリン酸化を β -actin の発現で補正した後、定量化した値を基準とした fold change で表す。2 つの独立した実験の平均値 ± 標準偏差をグラフで示す (右)。(*, $P < 0.05$)

最後に、Erk MAPK が大腸がん細胞の生存に重要であることを確認するため、無血清下で大腸がん細胞に MAPK/ERK kinase (MEK)阻害剤である U0126 を添加すると apoptosis が誘導された (図 33A、33B)。以上の結果から、大腸がん細胞で LDN-193189 により誘導される apoptosis は、DUSP5 を介した Erk MAPK の脱リン酸化によってもたらされていることが示唆された。

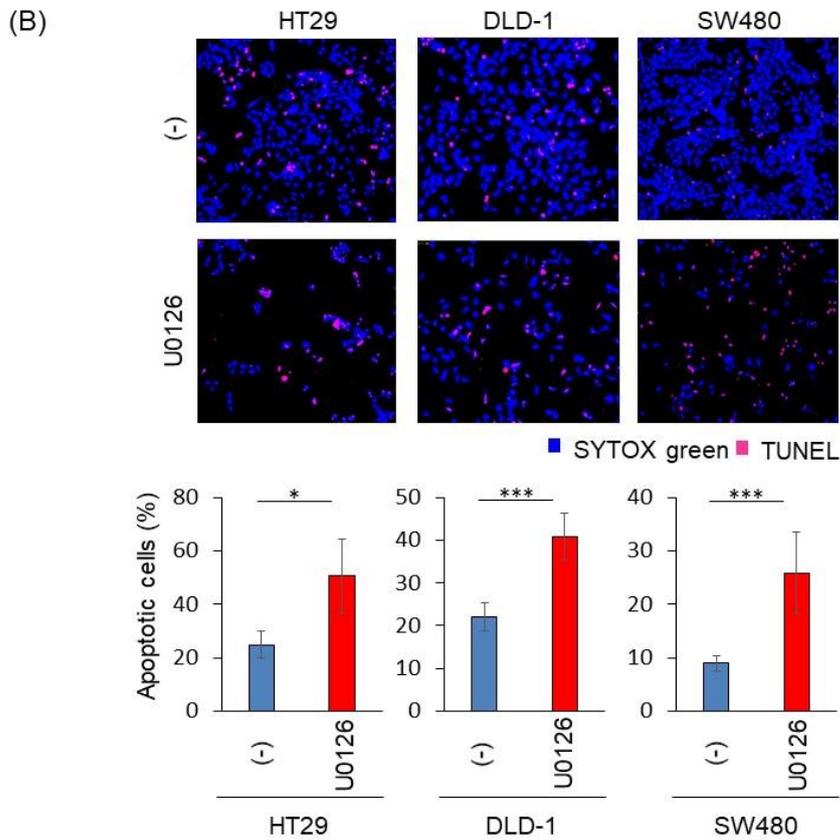
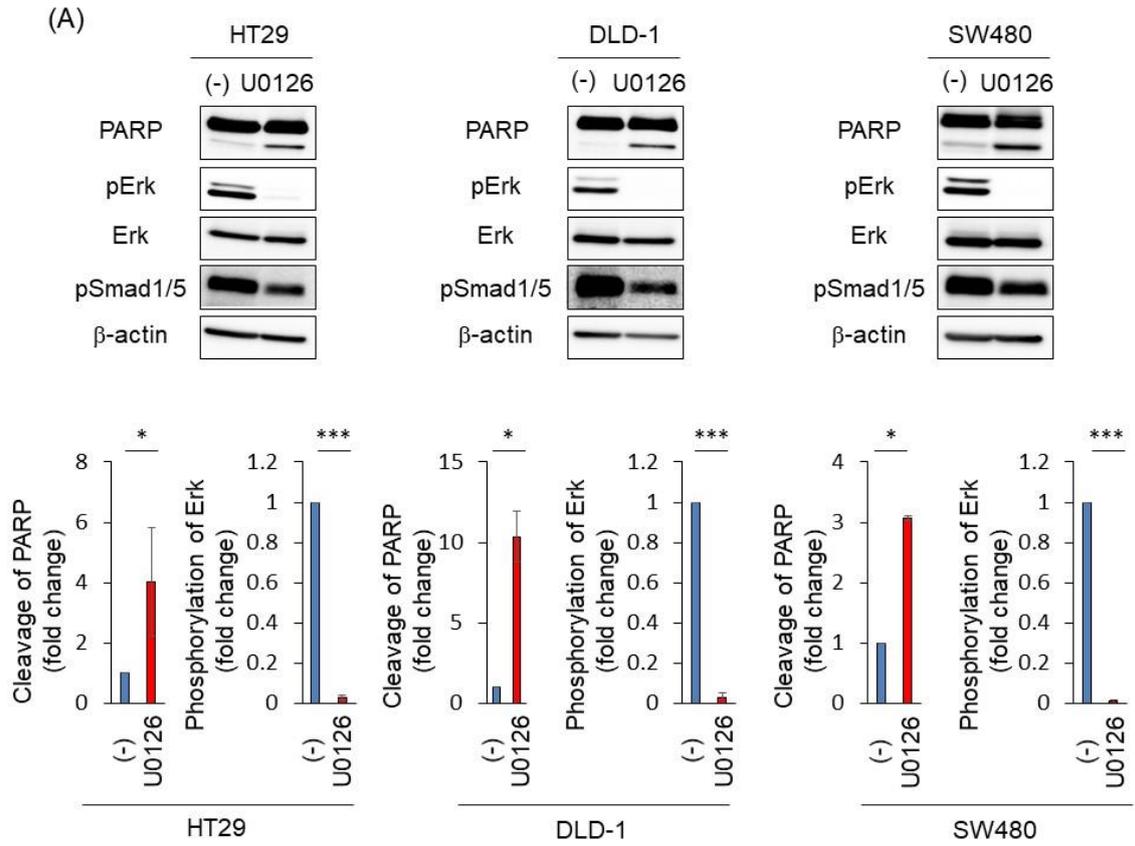


図 33 U0126 は大腸がん細胞に apoptosis を誘導する

(A) 大腸がん細胞を 6 well plates に播種し、16 時間後に血清を除去した後に、U0126 (15 μ M) 投与下で 36 時間培養し、タンパクの発現を図中に示す抗体を用いて Western blot により評価した (上)。PARP の cleavage と Erk のリン酸化を β -actin の発現で補正した後、定量化した値を negative control を基準とした fold change で表す。2 つの独立した実験の平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (下)。(*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$)

(B) (A)における細胞で TUNEL assay を行った。写真は赤い染色が TUNEL を、青い染色が SYTOX green を表す (上)。核染色された細胞中の TUNEL 陽性細胞の割合を異なる 6 視野で計測し、その平均値 \pm 標準偏差をグラフで示す (下)。(*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$)

4-8 LDN-193189 の大腸がんの腫瘍増殖に対する効果

以上の結果を踏まえ、LDN-193189 が大腸がんに対する新規分子標的薬になり得るかどうかを検討した。*In vitro* での colony formation assay により、LDN-193189 は大腸がん細胞の colony 形成能を阻害することが分かった (図 34)。

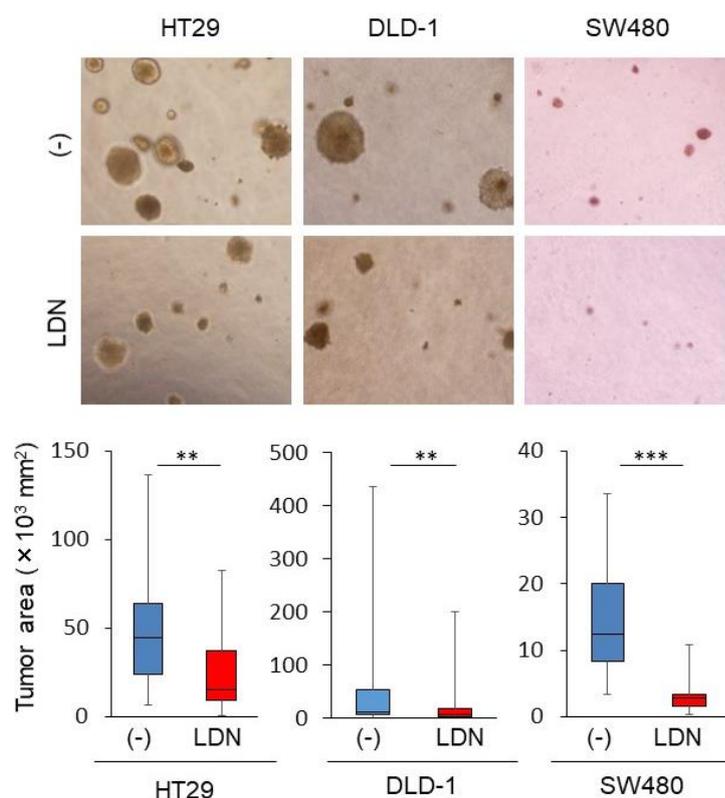


図 34 LDN-193189 は大腸がん細胞のコロニー形成能を阻害する

大腸がん細胞を DMSO もしくは LDN-193189 (LDN, 0.3 μ M) 投与下で 14 日間培養し、コロニー形成能を評価した。代表的な視野の写真を示す (上)。箱ひげ図は異なる 8 視野での腫瘍面積を表す (下)。(**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

次に、*in vivo* での LDN-193189 の作用を検証した。腹腔内投与された LDN-193189 が血液中に活性を有する状態で存在しているかを *ex vivo* bioassay にて評価した。LDN-193189 を投与された BALB/c *nu/nu* マウスから採取した血清を添加された DLD-1 細胞では、BMP シグナルの標的遺伝子である *ID1* の発現が低下した (図 35A)。この際、LDN-193189 を腹腔内投与された BALB/c *nu/nu* マウスでは体重減少は認めなかった (図 35B)。以上より、BALB/c *nu/nu* マウスに投与された LDN-193189 は、少なくともこの投与期間ではマウスに致死的な副作用をもたらすことなく、BMP 阻害剤としての活性を維持していることが分かった。

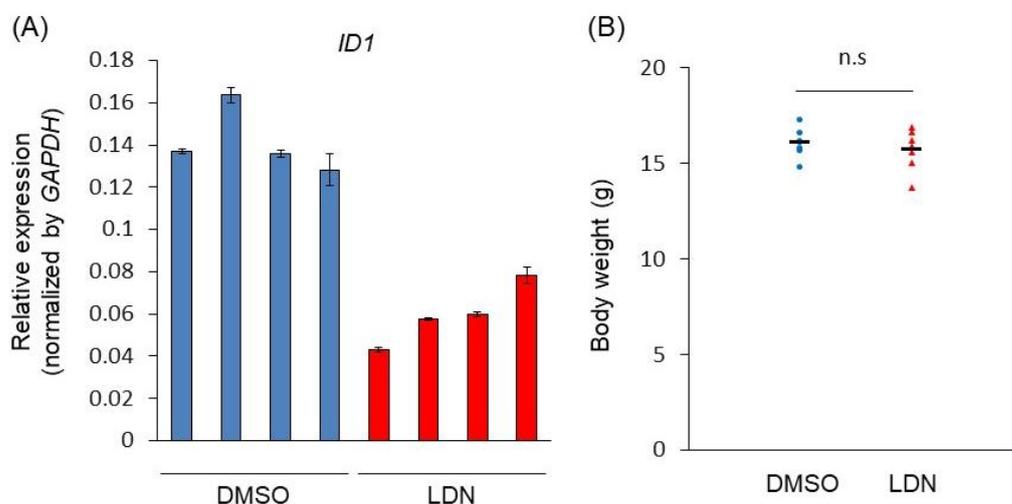


図 35 LDN-193189 は BALB/c *nu/nu* マウスの体内で毒性を示すことなく安定に存在する

(A) DLD-1 細胞に DMSO もしくは LDN を腹腔内投与した BALB/c *nu/nu* マウスの血清を培地にて 2 倍希釈したものを添加した。2 時間後に *ID1* の発現を qRT-PCR にて評価した。結果は平均値 ± 標準偏差を表す。

(B) (A)における BALB/c *nu/nu* マウスの体重を示す。(n.s., non-significant)

最後に LDN-193189 の *in vivo* での大腸がん細胞の腫瘍増殖能に対する効果について検討した。その結果、LDN-193189 は BALB/c *nu/nu* マウスの皮下移植モデルにおいて、大腸がん細胞の腫瘍増殖能を阻害した (図 36)。更には、*in vivo* においても LDN-193189 は腫瘍内の Smad1/5 のリン酸化、Erk MAPK のリン酸化を減弱させた (図 37)。これらの結果より、大腸がんにおいて内因性の BMP シグナルを LDN-193189 などの BMP シグナル阻害剤で阻害することは、新たな治療選択になり得ることが示された。

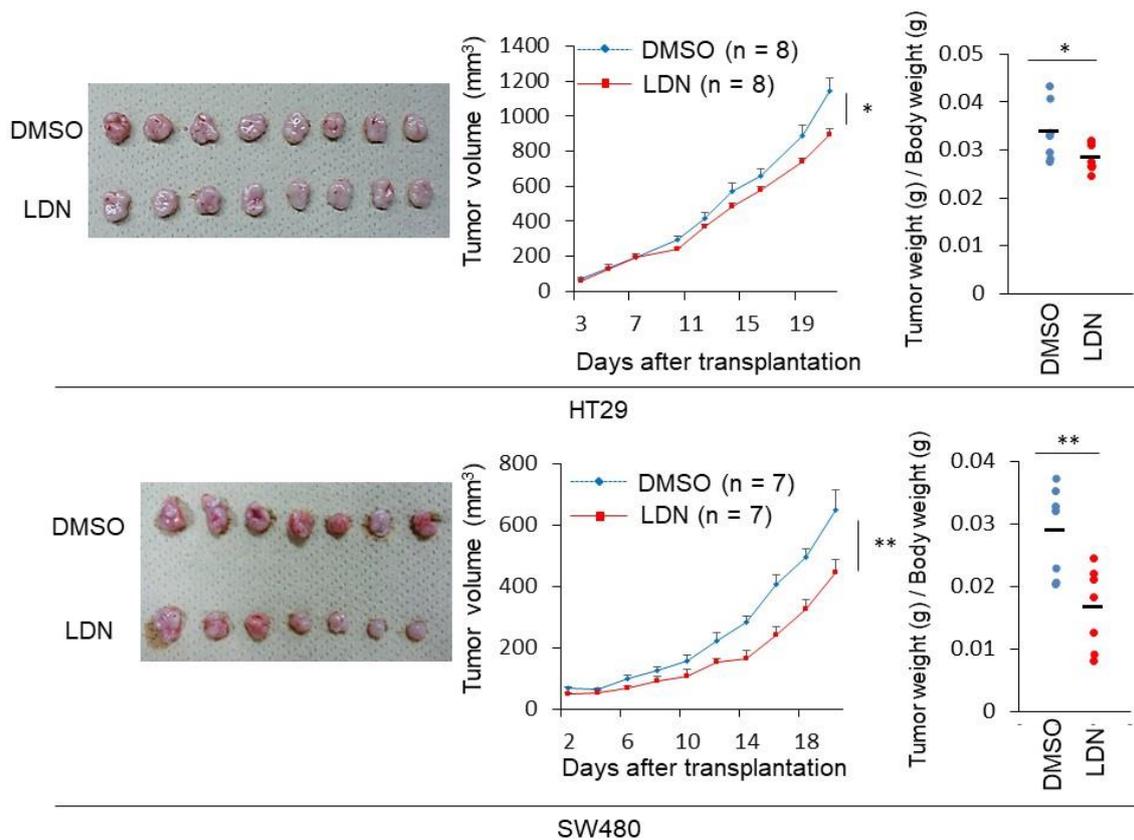


図 36 LDN-193189 は大腸がん細胞の腫瘍増殖を阻害する

BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に HT29 細胞 (n = 8) もしくは SW480 細胞 (n = 7) を移植した。DMSO もしくは LDN-193189 (LDN) を腹腔内投与し、腫瘍体積を経時的に測定した。移植後 21 日目の腫瘍の写真を示す (左)。図中に示す時間での腫瘍体積を示す (中)。移植後 21 日目の腫瘍の重量をマウスの体重で補正した値を示す (右)。(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

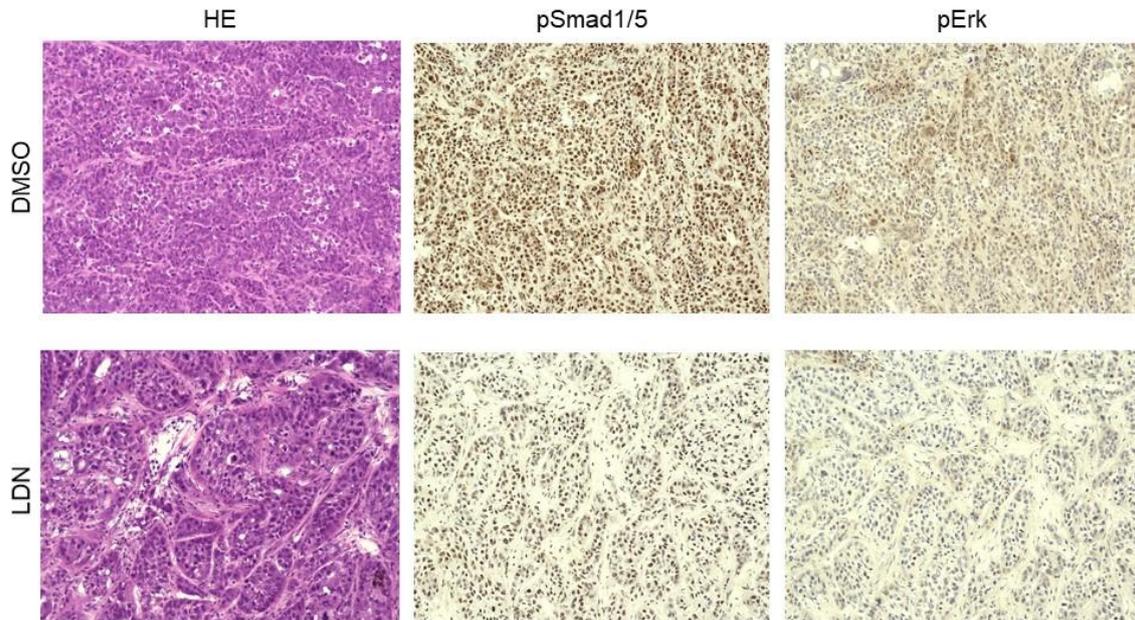


図 37 LDN-193189 は *in vivo* において、大腸がん細胞の内因性の BMP シグナルを阻害し、Erk のリン酸化を減弱させる。

図 36 において SW480 細胞から形成された皮下腫瘍組織に対し、図中に示す抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。代表的な染色像を示す。

5. 考察

本研究では、大腸がんにおける BMP-4 の腫瘍促進的な作用が明らかとなった。大腸がん細胞では、Wnt/ β -catenin シグナルの病的な活性化により、*BMP4* の発現が亢進している。自己分泌された BMP-4 は、内因性の BMP シグナルを活性化し、*DUSP5* の発現を介した Erk MAPK の脱リン酸化を抑制することで、大腸がん細胞の生存に寄与している (図 38A)。LDN-193189 により内因性の BMP シグナルが阻害されると、*DUSP5* の発現が上昇し、Erk MAPK が脱リン酸化されることで、大腸がん細胞に apoptosis を誘導する (図 38B)。以上の結果より、大腸がんが自己分泌する BMP-4 は、新たな治療標的になり得ることが示唆された。

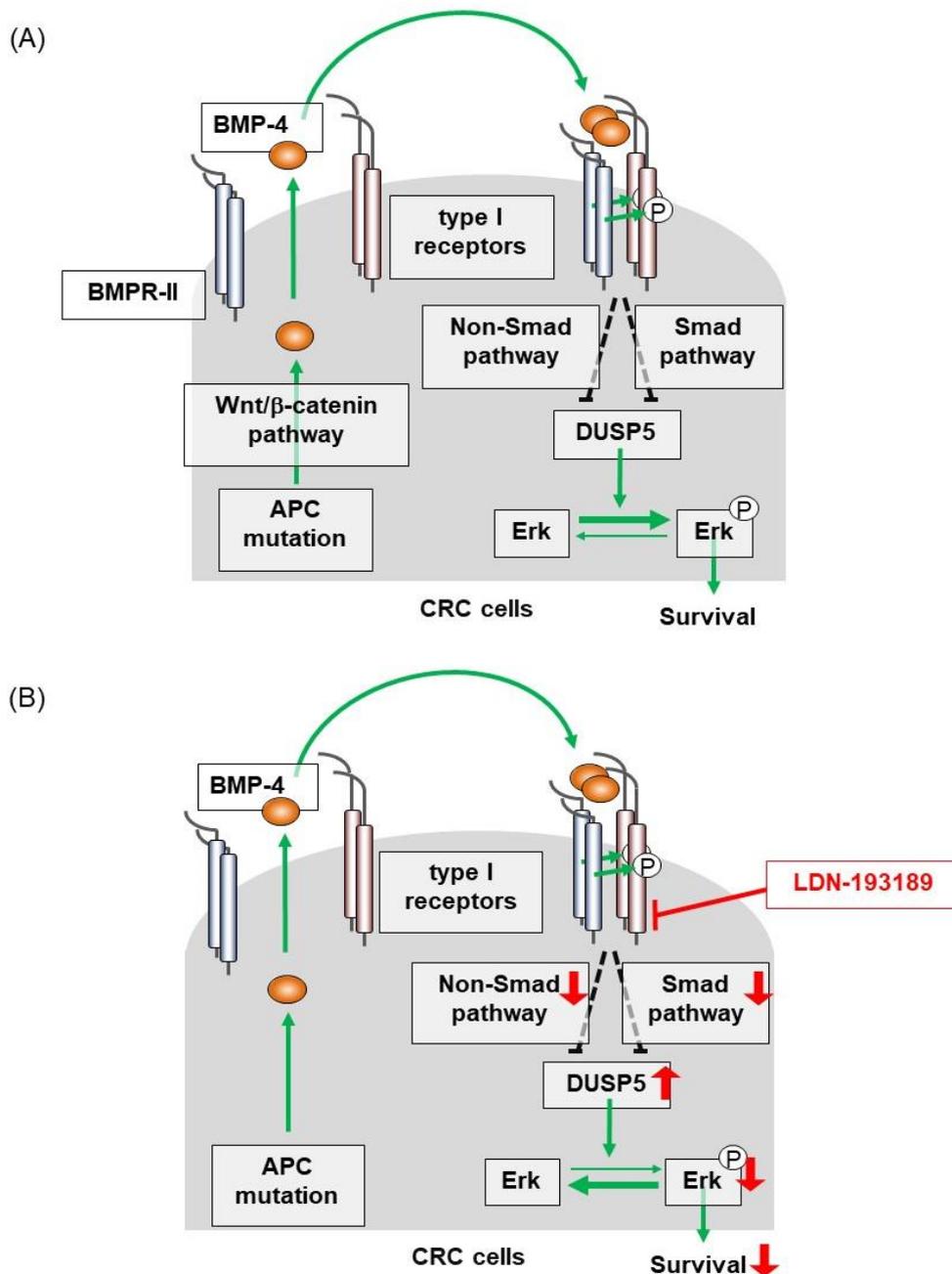


図 38 内因性の BMP-4 シグナルを LDN-193189 により抑制することは大腸がん細胞の進展を阻害する

(A) 大腸がん細胞では、Wnt/β-catenin シグナルが活性化しており、それに伴い BMP4 の発現も亢進している。この内因性の BMP シグナルが DUSP5 の発現を低下させることで、Erk のリン酸化を亢進させ、生存に寄与している。

(B) LDN-193189 などの BMP 阻害剤の存在下では、この内因性の BMP シグナルが減弱し、DUSP5 の発現が上昇する。それに伴い Erk が脱リン酸化され、大腸がん細胞に apoptosis を誘導する。

5-1 大腸がん細胞での内因性 BMP シグナルの活性化

本研究ではまず、大腸がんは、**BMP-4** を自己分泌しており、それに伴い内因性の **BMP** シグナルが活性化されていることを見出した。大腸がん細胞では、多くの **BMP** のアイソフォームの中で、**BMP4** のみ発現が亢進しており、またこの **BMP4** の発現亢進は種々のがん細胞の中で大腸がん細胞に特異的であった (図 2)。大腸がんにおいて一部の **BMP** の発現が亢進していることは、以前より指摘されており、この発現は予後不良因子と考えられている (15-17)。しかし、大腸がん細胞において、この自己分泌された **BMP** リガンドにより内因性の **BMP** シグナルが活性化されているかについては、一定の見解を得ていない。Kodach らは、多くの大腸がん組織において、**Smad4** や **BMPR-II** の変異が存在し、**Smad1/5** のリン酸化が消失していると報告している (18)。対照的に、Beck らは、**BMPR-II** の変異の有無に関わらず、**Smad1** のリン酸化は大腸がん細胞・組織にて亢進しているとしている (19)。本研究では、大腸がん組織に対する免疫組織化学染色を行い、大腸がん組織においては **BMP-4** の発現が亢進しており、それに呼応するように **Smad1/5** がリン酸化されていることを示した (図 5)。加えて、**BMPR-II** の変異を有する大腸がん細胞株である **DLD-1** においても、**Smad1/5** がリン酸化されていることを *in vitro* の実験により示した (図 17)。これは、大腸がん細胞では、**BMPR-II** に変異が存在しても、**ActR-II** や **ActR-IIB** など他の **BMP II** 型受容

体を介して **BMP** シグナルが伝達されていることを示唆しており、以上の結果から、本研究では大腸がん細胞・組織では、内因性の **BMP** シグナルが活性化していると判断した。

5-2 大腸がん細胞での **BMP-4** を介した内因性 **BMP** シグナルの anti-apoptotic な作用

大腸がんの進展における **BMP** シグナルの作用は未だ十分に解明されていない。**BMP** は大腸がん細胞の浸潤能を亢進し、腫瘍増殖を促進するとの報告がある一方で、**BMP** が大腸がんに対して腫瘍抑制的に作用するとの報告もある (14、15、20-25)。この **BMP** の機能を規定する分子として、**Smad4** と **p53** が想定されている。**Voorneveld** らは、大腸がんでは **Smad4** の変異によりその機能が消失することで、腫瘍抑制的に作用していた **BMP** が腫瘍促進的に作用するようになるとしている (26)。一方で、**Smad4** に変異のない大腸がん細胞において、抗がん剤の感受性を高めていた **BMP** シグナルが、**p53** に変異が生じることで、その機能が失われるとの報告もある (27)。本研究で用いた大腸がん細胞株はその全てにおいて **p53** の変異が確認されており (28)、今回の研究結果のみでは **p53** と **BMP** の腫瘍促進的な作用との関係を結論づけることはできない。しかしながら、本研究では **Smad4** に変異を有する **HT29** 細胞、**SW480** 細胞だけでなく、野生型の **Smad4**

を有する DLD-1 細胞においても内因性 BMP シグナルの阻害が apoptosis を誘導することを示した (図 18-21)。この結果は、大腸がん細胞において自己分泌された BMP-4 は、Smad4 の変異の有無に関わらず、大腸がん細胞の生存を促進することを示唆している。

5-3 大腸がん細胞における *DUSP5* の Erk MAPK の脱リン酸化を介した pro-apoptotic な作用

Erk MAPK はがん細胞の増殖、生存、転移を亢進する、oncogenic なシグナルカスケードとして知られている (29)。BMP は Erk1/2 をリン酸化し、Erk MAPK を活性化することが知られているが、その詳細な分子メカニズムは解明されていない (30-34)。本研究では、RNA-seq を用いた網羅的解析により、BMP の標的遺伝子として *DUSP5* を同定し、BMP-4 による *DUSP5* の発現低下が apoptosis 回避に重要であることを示した (図 22-33)。*DUSP5* は核内に存在する phosphatase の 1 つであり、Erk1/2 を特異的に脱リン酸化する (35、36)。*DUSP5* は皮膚がん、胃がん、前立腺がん、大腸がん、肺がんを含めた様々ながんにおいて腫瘍抑制的に作用することが知られている (37-40)。加えて今回の研究により、大腸がん細胞での BMP-4 による Erk MAPK のリン酸化は、*DUSP5* の発現低下によりもたらされている可能性が高いことが示された (図 22-33)。なお、今回データでは示し

ていないが、大腸がん細胞において Smad1、Smad4、Smad5 の siRNA による knockdown が、*DUSP5* の発現に与える影響についても検討した。しかし、用いる siRNA の配列により、結果が一定しなかった。このため、BMP による DUSP family 遺伝子の発現制御が、Smad 依存的であるかについては、現時点では結論を出すに至っていないが、本研究の結果は、BMP シグナルによる MAPK の制御の解明につながるものと考えられる。

5-4 大腸がん細胞での BMP 阻害剤による抗腫瘍効果

BMP の様々ながんにおける腫瘍促進的作用に着目し、多くの BMP 阻害剤が開発されてきた。Calpe らは、BMP-4 に対する中和抗体を作成し、これが大腸がん細胞 HT29 移植モデルの化学療法感受性を増強することを報告している (41)。

一方、胚での背腹軸決定を阻害する化合物である dorsomorphin が BMP 阻害作用を有することが報告されて以降、多くの dorsomorphin 類似体が BMP 阻害剤として開発されていった。その 1 つである dorsomorphin homolog 1 (DMH-1) は肺がんの腫瘍増殖を阻害し、乳がんの転移を抑制することが示されている (42、43)。また、今回使用した LDN-193189 も同様の類似体であるが、LDN-193189 は *in vivo* において乳がんと前立腺がんの腫瘍増殖能を低下させ、卵巣がんを移植したマウスの生存期間を延長することが報告されている (44-46)。大腸がんにおいては、

Voorneveld らは LDN-193189 が Smad4 を knock out した大腸がん細胞の増殖を抑制し、化学療法に対する感受性を高めることを示している (27)。しかしながら、LDN-193189 の大腸がんの腫瘍増殖に対する効果を直接的に検証した報告はない。そこで、本研究では LDN-193189 が大腸がんの *in vivo* における腫瘍増殖に与える影響を調べた。この結果、LDN-193189 は皮下移植モデルにおいて大腸がん細胞の腫瘍増殖能を阻害した (図 36)。LDN-193189 が、AMPK、PDGF や VEGF など他のキナーゼ活性に影響を与えた結果もたらされたものである可能性も否定はできないものの、このことは、BMP の阻害が大腸がんの治療に対して有効である可能性を示唆する結果である。しかし、LDN-193189 を *in vivo* において使用する場合に留意しなくてはならないのは、BMP シグナルと腸管の発がんとの関係である。Noggin を腸管に発現させたトランスジェニックマウスや、腸管において *Bmpr1a* を knockout したマウスでは、腸管での polyposis が誘発されたことから、BMP シグナルの阻害は、大腸粘膜での発がんを助長する危険があると考えられる (47、48)。例えば、Whissell らは Adenomatosis polyposis coli (*Apc*) の conditional knockout マウスにおいて、LDN-193189 の経口投与が腸管での腫瘍形成を促進したと報告している (9)。しかし、我々の研究では、LDN-193189 を投与したマウスにおいて、腸管での腫瘍形成は認めなかった。この違いをもたらした原因の 1 つとしては、LDN-193189 の投与経路の違いが考えられる。直接的に

腸管に作用する経口投与より、腹腔内投与の方が直接的な腸管への作用を抑えることができた可能性があり、臨床的に LDN-193189 を使用する際には、投与経路や至適血中濃度に留意すべきであろう。また、腸管での腫瘍形成が認められなかったもう一つの理由として、使用したマウスの違いがあると考えられる。腸上皮の恒常性を維持するためには、Wnt/ β -catenin シグナルと BMP シグナルとのバランスが重要である (48)。Apc knockout マウスでは、腸管での Wnt/ β -catenin シグナルが亢進していることから、野生型のマウスよりも BMP 阻害剤を用いた際に腸管発がんを誘発しやすい可能性がある。

本研究では更に、LDN-193189 がマウスに移植された大腸がん組織において Smad1/5 のリン酸化だけではなく Erk MAPK のリン酸化も減弱させることを示した (図 37)。Ras-Raf-MEK-Erk カスケードは、様々ながん細胞においてしばしばそのシグナル構成分子の変異により活性化しており、がん治療において重要な治療標的であるとされている (29)。実際、大腸がんにおいても、その 50% に Ras の変異を認める (49)。このカスケードを標的とした大腸がんの治療薬として、cetuximab や panitumumab などの抗 EGFR 抗体が導入され、一部の大腸がんに対しては非常に高い治療効果を示している。しかし、RAS の変異があるものに対しては、治療効果を示さない (1)。本研究において、LDN-193189 は、BRAF に変異を有する HT29 細胞や KRAS に変異を有する SW480 細胞においても治療

効果を有することを示した (50)。これらの結果は、BMP 阻害剤、特に LDN-193189 などの低分子化合物は、大腸がん治療にとって非常に魅力的な選択肢となり得ることを示している。

最後に、本研究は大腸がんの内因性の BMP シグナルを標的にする治療戦略が大腸がんの治療に対して有用であることを示したものであり、今後の新たな大腸がん治療の発展に大きくつながる可能性がある。

6. 結語

大腸がん細胞では、**BMP-4** の自己分泌を介して、内因性の **BMP** シグナルが亢進している。この内因性の **BMP** シグナルは、大腸がん細胞の生存に重要であり、これを標的とする **BMP** 阻害剤は、大腸がんの新たな分子標的薬となり得る可能性が示された。

7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 渡邊聡明教授ならびに野澤宏彰准教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。東京大学大学院 医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学分野 宮園浩平教授ならびに江幡正悟特任准教授には実際の実験手技から実験計画の作成まで多大なご指導を頂きました。また、東京大学大学院 医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学分野 森下保幸技術職員には免疫組織染色の御指導を頂きました。ここに深甚なる謝意を表します。また本研究で使用した LDN-193189 は国立研究開発法人理化学研究所 創薬・医療技術基盤プログラム 橋爪良信ユニットリーダーより供与頂きました。この場をお借りして感謝申し上げます。

8. 参考文献

1. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 383, 1490-1502 (2014)
2. Cercek A, Saltz L. Evolving treatment of advanced colorectal cancer. *Curr Oncol Rep* 3, 153-159 (2010)
3. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147, 35-51 (2010)
4. Ehata S, Yokoyama Y, Takahashi K, Miyazono K. Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer: another molecular Jekyll and Hyde? *Pathol Int* 63, 287-296 (2013)
5. Davis H, Raja E, Miyazono K, Tsubakihara Y, Moustakas A. Mechanisms of action of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 27, 81-92 (2016)

6. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF- β signals. *J Cell Sci* 118, 3573-3584 (2005)
7. Wakefield LM, Hill CS. Beyond TGF β : roles of other TGF β superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* 13, 328-341 (2013)
8. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444, 761-765 (2006)
9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767 (1990)
10. Whissell G, Montagni E, Martinelli P, Hernando-Momblona X, Sevillano M, Jung P, Cortina C, Calon A, Abuli A, Castells A, Castellvi-Bel S, Nacht AS, Sancho E, Stephan-Otto Attolini C, Vicent GP, Real FX, Batlle E. The transcription factor GATA6 enables self-renewal of colon adenoma stem cells by repressing BMP gene expression. *Nat Cell Biol* 16, 695-707 (2014)

11. Hao J, Ho JN, Lewis JA, Karim KA, Daniels RN, Gentry PR, Hopkins CR, Lindsley CW, Hong CC. In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem Biol* 5, 245-253 (2010)

12. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108, 1167-1174 (2001)

13. Kwon HJ, Kim GE, Lee YT, Jeong MS, Kang I, Yang D, Yeo EJ. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase and downstream signaling pathways by Compound C. *Cell Signal* 25, 883-897 (2013)

14. Vogt J, Traynor R, Sapkota GP. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF β and BMP pathways. *Cell Signal* 23, 1831-1842 (2011)

15. Deng H, Makizumi R, Ravikumar TS, Dong H, Yang W, Yang WL. Bone morphogenetic protein-4 is overexpressed in colonic adenocarcinomas and promotes migration and invasion of HCT116 cells. *Exp Cell Res* 313, 1033-1044 (2007)

16. Lorente-Trigos A, Varnat F, Melotti A, Ruiz i Altaba A. BMP signaling promotes the growth of primary human colon carcinomas in vivo. *J Mol Cell Biol* 2, 318-332 (2010)

17. Motoyama K, Tanaka F, Kosaka Y, Mimori K, Uetake H, Inoue H, Sugihara K, Mori M. Clinical significance of BMP7 in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 15, 1530-1537 (2008)

18. Kodach LL, Wiercinska E, de Miranda NF, Bleuming SA, Musler AR, Peppelenbosch MP, Dekker E, van den Brink GR, van Noesel CJ, Morreau H, Hommes DW, Ten Dijke P, Offerhaus GJ, Hardwick JC. The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology* 134, 1332-1341 (2008)

19. Beck SE, Jung BH, Fiorino A, Gomez J, Rosario ED, Cabrera BL, Huang SC, Chow JY, Carethers JM. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, 135-145 (2006)
20. Deng H, Ravikumar TS, Yang WL. Bone morphogenetic protein-4 inhibits heat-induced apoptosis by modulating MAPK pathways in human colon cancer HCT116 cells. *Cancer Lett* 256, 207-217 (2007)
21. Deng H, Ravikumar TS, Yang WL. Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 281, 220-231 (2009)
22. Grijelmo C, Rodrigue C, Svrcek M, Bruyneel E, Hendrix A, de Wever O, Gespach C. Proinvasive activity of BMP-7 through SMAD4/src-independent and ERK/Rac/JNK-dependent signaling pathways in colon cancer cells. *Cell Signal* 19, 1722-1732 (2007)
23. Kang MH, Kang HN, Kim JL, Kim JS, Oh SC, Yoo YA. Inhibition of PI3 kinase/Akt pathway is required for BMP2-induced EMT and invasion. *Oncol Rep* 22, 525-534

(2009)

24. Zhang Y, Chen X, Qiao M, Zhang BQ, Wang N, Zhang Z, Liao Z, Zeng L, Deng Y, Deng F, Zhang J, Yin L, Liu W, Zhang Q, Ya Z, Ye J, Wang Z, Zhou L, Luu HH, Haydon RC, He TC, Zhang H. Bone morphogenetic protein 2 inhibits the proliferation and growth of human colorectal cancer cells. *Oncol Rep* 32, 1013-1020 (2014)
25. Lee CW, Ito K, Ito Y. Role of RUNX3 in bone morphogenetic protein signaling in colorectal cancer. *Cancer Res* 70, 4243-4252 (2010)
26. Voorneveld PW, Kodach LL, Jacobs RJ, Liv N, Zonneville AC, Hoogenboom JP, Biemond I, Verspaget HW, Hommes DW, de Rooij K, van Noesel CJ, Morreau H, van Wezel T, Offerhaus GJ, van den Brink GR, Peppelenbosch MP, Ten Dijke P, Hardwick JC. Loss of SMAD4 alters BMP signaling to promote colorectal cancer cell metastasis via activation of Rho and ROCK. *Gastroenterology* 147, 196-208 (2014)
27. Voorneveld PW, Kodach LL, Jacobs RJ, van Noesel CJ, Peppelenbosch MP, Korkmaz KS, Molendijk I, Dekker E, Morreau H, van Pelt GW, Tollenaar RA, Mesker W,

- Hawinkels LJ, Paauwe M, Verspaget HW, Geraets DT, Hommes DW, Offerhaus GJ, van den Brink GR, Ten Dijke P, Hardwick JC. The BMP pathway either enhances or inhibits the Wnt pathway depending on the SMAD4 and p53 status in CRC. *Br J Cancer* 112, 122-130 (2015)
28. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7555-7559 (1990)
29. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291-3310 (2007)
30. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16, 291-299 (2004)
31. Yang X, Lee PJ, Long L, Trembath RC, Morrell NW. BMP4 induces HO-1 via a Smad-independent, p38MAPK-dependent pathway in pulmonary artery myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37, 598-605 (2007)

32. Lai CF, Cheng SL. Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277, 15514-15522 (2002)
33. Zhang Y, Wang Y, Yang K, Tian L, Fu X, Wang Y, Sun Y, Jiang Q, Lu W, Wang J. BMP4 increases the expression of TRPC and basal $[Ca^{2+}]_i$ via the p38MAPK and ERK1/2 pathways independent of BMPRII in PSMCs. *PLoS One* 9, e112695 (2014).
34. Gallea S, Lallemand F, Atfi A, Rawadi G, Ramez V, Spinella-Jaegle S, Kawai S, Faucheu C, Huet L, Baron R, Roman-Roman S. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone* 28, 491-498 (2001)
35. Kidger AM, Keyse SM. The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin Cell Dev Biol* 50, 125-132 (2016)

36. Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J* 280, 489-504 (2013)
37. Cai C, Chen JY, Han ZD, He HC, Chen JH, Chen YR, Yang SB, Wu YD, Zeng YR, Zou J, Liang YX, Dai QS, Jiang FN, Zhong WD. Down-regulation of dual-specificity phosphatase 5 predicts poor prognosis of patients with prostate cancer. *Int J Clin Exp Med* 8, 4186-4194 (2015)
38. Shin SH, Park SY, Kang GH. Down-regulation of dual-specificity phosphatase 5 in gastric cancer by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis. *Am J Pathol* 182, 1275-1285 (2013)
39. Ueda K, Arakawa H, Nakamura Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53. *Oncogene* 22, 5586-5591 (2003)
40. Rushworth LK, Kidger AM, Delavaine L, Stewart G, van Schelven S, Davidson J, Bryant CJ, Caddy E, East P, Caunt CJ, Keyse SM. Dual-specificity phosphatase 5 regulates nuclear ERK activity and suppresses skin cancer by inhibiting mutant

Harvey-Ras (HRas^{Q61L})-driven SerpinB2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 18267-18272 (2014)

41. Calpe S, Wagner K, El Khattabi M, Rutten L, Zimmerlin C, Dolk E, Verrips CT, Medema JP, Spits H, Krishnadath KK. Effective inhibition of bone morphogenetic protein function by highly specific llama-derived antibodies. *Mol Cancer Ther* 14, 2527-2540 (2015)

42. Hao J, Lee R, Chang A, Fan J, Labib C, Parsa C, Orlando R, Andresen B, Huang Y. DMH1, a small molecule inhibitor of BMP type I receptors, suppresses growth and invasion of lung cancer. *PLoS One* 9, e90748 (2014)

43. Owens P, Pickup MW, Novitskiy SV, Giltnane JM, Gorska AE, Hopkins CR, Hong CC, Moses HL. Inhibition of BMP signaling suppresses metastasis in mammary cancer. *Oncogene* 34, 2437-2449 (2015)

44. Ali JL, Lagasse BJ, Minuk AJ, Love AJ, Moraya AI, Lam L, Arthur G, Gibson SB, Morrison LC, Werbowetski-Ogilvie TE, Fu Y, Nachtigal MW. Differential cellular

responses induced by dorsomorphin and LDN-193189 in chemotherapy-sensitive and chemotherapy-resistant human epithelial ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 136, 455-469 (2015)

45. Balboni AL, Hutchinson JA, DeCastro AJ, Cherukuri P, Liby K, Sporn MB, Schwartz GN, Wells WA, Sempere LF, Yu PB, DiRenzo J. Δ Np63 α -mediated activation of bone morphogenetic protein signaling governs stem cell activity and plasticity in normal and malignant mammary epithelial cells. *Cancer Res* 73, 1020-1030 (2013)

46. Lee YC, Cheng CJ, Bilen MA, Lu JF, Satcher RL, Yu-Lee LY, Gallick GE, Maity SN, Lin SH. BMP4 promotes prostate tumor growth in bone through osteogenesis. *Cancer Res* 71, 5194-5203 (2011)

47. Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 303, 1684-1686 (2004)

48. He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X,

Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt- β -catenin signaling. *Nat Genet* 36, 1117-1121 (2004)

49. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3, 459-465 (2003)

50. Vecchione L, Gambino V, Raaijmakers J, Schlicker A, Fumagalli A, Russo M, Villanueva A, Beerling E, Bartolini A, Mollevi DG, El-Murr N, Chiron M, Calvet L, Nicolazzi C, Combeau C, Henry C, Simon IM, Tian S, in 't Veld S, D'ario G, Mainardi S, Beijersbergen RL, Liefink C, Linn S, Rumpf-Kienzl C, Delorenzi M, Wessels L, Salazar R, Di Nicolantonio F, Bardelli A, van Rheenen J, Medema RH, Tejpar S, Bernards R. *Cell* 165, 317-330 (2016)