

博士論文

前立腺がんにおける BMP シグナルの機能解析

西森 光

目次

1. 要旨.....	3
2. 序論.....	4
2-1 前立腺がんの骨転移	
2-2 BMP シグナル伝達機構	
2-3 がんと骨組織に対する BMP シグナルの機能	
2-4 Hh シグナル伝達機構	
3. 実験方法.....	13
3-1 細胞培養・試薬	
3-2 レンチウイルスベクターによる安定発現株の樹立	
3-3 一過性強制発現試験	
3-4 Separate co-culture と細胞増殖試験	
3-5 Mixed co-culture と細胞増殖試験	
3-6 遺伝子発現解析	
3-7 Immunoblotting	
3-8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	
3-9 Luciferase reporter assay	
3-10 Small interfering RNA (siRNA) による RNA 干渉	

3-11 骨間質細胞分化と Alkaline phosphatase (ALP) 染色

4. 結果.....	20
4-1 BMP による SHH 発現制御	
4-2 前立腺がん細胞での BMP による Smad 依存的な SHH 発現制御	
4-3 骨間質細胞の BMP シグナル感受性に対する SHH の機能	
4-4 骨間質細胞の分化に対する BMP と SHH の協調作用	
4-5 BMP と前立腺がん細胞由来 BMP 誘導性 SHH の骨間質細胞分化に対する 協調作用	
4-6 前立腺がんの増殖に対する BMP 誘導性骨間質細胞由来増殖因子の影響	
5. 考察.....	45
5-1 骨間質細胞の分化に対する前立腺がん細胞の役割とその分子メカニズム	
5-2 前立腺がん細胞の増殖に対する骨間質細胞の役割とその分子メカニズム	
6. 結語.....	57
7. 謝辞.....	58
8. 参考文献.....	59

1. 要旨

本研究では前立腺がんの骨転移におけるがん細胞と骨間質細胞の相互作用のメカニズムを解明した。前立腺がん細胞は **Bone morphogenetic protein (BMP)** 応答性に **Sonic Hedgehog (SHH)** を産生し、この **SHH** が骨間質細胞の **BMP** シグナルを増強することで、骨間質細胞の分化が促進された。一方で骨間質細胞は **BMP-4** 応答性にサイトカインを産生し、前立腺がん細胞の増殖を促進した。骨微小環境中で骨間質細胞と前立腺がん細胞は **BMP** を介して相互作用を行い、互いに有利な環境を形成することで骨転移が形成される可能性が示唆された。

2. 序論

2-1 前立腺がんの骨転移

前立腺がんは男性におけるがん関連死亡の一因であり、前立腺がんで死亡した患者の80%以上が骨転移を有している。乳がんやその他の多くのがんが溶骨性の骨転移の組織像を示すのとは対照的に、前立腺がんの骨転移は造骨性の組織像を示し、骨吸収と骨形成の破綻によって引き起こされることが知られている (1)。骨転移は、激しい疼痛、運動障害、脊髄圧迫、高カルシウム血症など数多くの合併症を引き起こし、患者の quality of life (QOL) を著しく悪化させる。またアメリカ合衆国では、がん患者に対する医療費総額 740 億ドルのうち、総額の 17%にあたる 126 億ドルが骨転移治療に費やされている。骨転移を有するがん患者の医療費は、有さない患者と比較して、最大 3 倍程度の費用にのぼることが報告されている (2)。がん患者へのこのような多大な複合的影響から、骨転移の発症メカニズムや進展機序の解明とその先にある新規治療法の開発は重要な課題となっている。

骨転移形成の過程において、がん細胞と骨微小環境は増殖因子を含む多様な液性因子を介して互いに相互作用する (3-5)。がん細胞は造骨因子と溶骨因子を産生することによって、骨微小環境でのがん細胞自身の増殖を促進すると考えられている。さらに骨は Transforming growth factor (TGF)- β や Bone morphogenetic protein (BMP) な

どのサイトカインの貯蔵庫として機能していると考えられている。これらのサイトカインはがん細胞の増殖を促進させる肥沃な地盤を提供するのみならず、例えば、TGF- β は上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition : EMT) をはじめとしたがん細胞自身の形質変化を誘導し、骨転移を含む転移の形成や進展に重要な役割を果たす。EMT では、がん細胞が間葉系様細胞へと形態変化し、がん細胞の細胞間接着や極性が喪失し、細胞外 protease 分泌能の増加、運動能の獲得を介して、浸潤や転移能が増加する結果、最終的に高浸潤性の悪性度の高いがん細胞の形質を獲得するようになる (6-8)。

乳がん細胞では、TGF- β に応答して Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) や Interleukin (IL)-11 が産生され、Receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) ligand (RANKL)- RANK システムにより破骨細胞を活性化し、活性化された破骨細胞が骨由来のサイトカインを放出する。この“Vicious cycle”モデルは乳がん細胞の骨転移を適切に説明できるモデルであり、がん転移に対する治療のためには、がん細胞と骨微小環境に着目した統合的分子メカニズムの理解が不可欠であることを示している。しかしながら、前立腺がんの骨転移に重要である分子メカニズムはいまだ研究段階に止まっていると言える。

2-2 BMP シグナル伝達機構

TGF- β ファミリーに属する BMP は、ラットにおいて異所性の骨・軟骨形成を誘導する能力をもつ因子として発見され (9)、現在までに 10 種類以上のリガンドが同定されている。BMP は多くの細胞の増殖や分化の調節など、様々な生物学的活性を示すサイトカインである (10, 11)。BMP シグナル伝達機構について図 1 に示す。BMP は細胞膜に存在している膜貫通型受容体である BMP type I receptor と BMP type II receptor という 2 つの serine/threonine kinase receptor への結合によって、細胞内にシグナルを伝達する (4)。Activin receptor-like kinase (ALK)-1、ALK-2、ALK-3、ALK-6 は BMP type I receptor として、Activin receptor (ActR)-IIA、ActR-IIB、BMP receptor type II (BMPRII) は BMP の type II receptor として機能することが知られている。これらに BMP が結合すると、2 分子の type I receptor と 2 分子の type II receptor は heterotetramer を形成し、恒常的に活性化している type II receptor の serine/threonine kinase が、type I receptor の glycine/serine-rich domain (GS domain) をリン酸化する (12, 13)。続いて、type I receptor の kinase domain に局在する L45 loop と細胞内の BMP 特異的 receptor-regulated Smads (R-Smads) である Smad1、Smad5 との相互作用により、R-Smad の Ser-Ser-X-Ser (SSXS motif) の serine 残基がリン酸化され、common-partner Smad (Co-Smad) である Smad4 とともに heteromeric Smad complex を形成し、核内移行する (14, 15)。核内移行した Smad complex は、MH1 domain を介して標的遺伝子やその近傍に存在する Smad binding

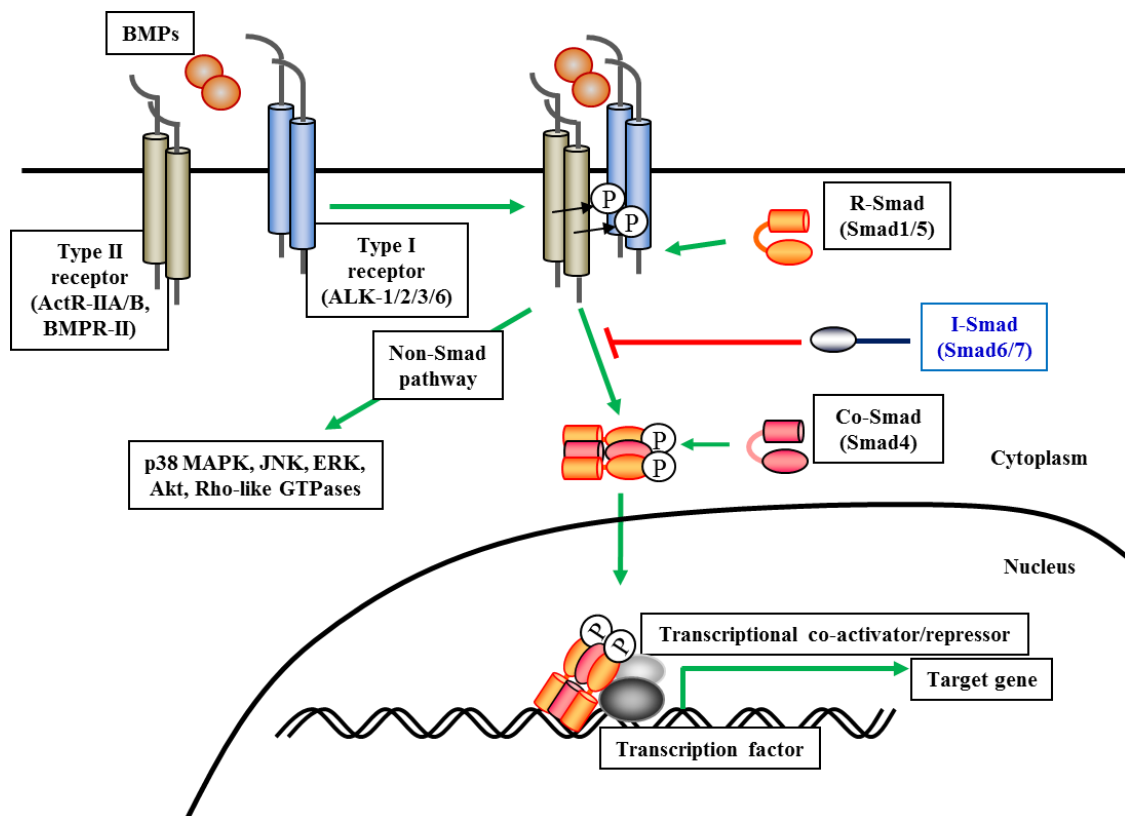


図 1. BMP シグナル伝達の概略

BMP は細胞膜上の膜貫通型受容体である BMP type I receptor と BMP type II receptor に結合して、細胞内にシグナルを伝達する。ALK-1/2/3/6 は BMP type I receptor、ActR-IIA/B、BMPR-II は BMP type II receptor 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 type I receptor と 2 分子の type II receptor は heterotetramer を形成し、R-Smad である Smad1/5 をリン酸化する。リン酸化された Smad1/5 は、Co-Smad である 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、標的遺伝子やその近傍に存在する SBE 配列や GC-rich 配列へ結合し、また DNA 結合タンパク質、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遺伝子発現を制御する。さらに、MAP キナーゼシグナルのように、BMP によって Smad 非依存的に活性化するシグナル伝達経路も存在する。

element (SBE : GTCT/AGAC) や GC-rich 配列 (GCCGnCGC motif) に結合するか、もしくは DNA 結合タンパク質、転写活性共役因子や転写抑制共役因子と協調的に作用し、様々な標的遺伝子の遺伝子発現を制御することで広範な生理学的活性を発揮する (16)。

2-3 がんと骨組織に対する BMP シグナルの機能

BMP は間葉系細胞において Smad 依存的に多くの標的遺伝子の発現を制御するが、これら標的遺伝子の中に、転写因子 Runt-related transcription factor 2 (Runx2) や Osterix などが含まれている。これらの転写因子は間葉系細胞の骨芽細胞への分化とその骨形成作用を増強し、軟骨細胞への分化も促進する。さらに BMP は神経・血管形成や器官形成などに関わり、個体発生に重要な役割を果たす (11, 17-19)。Bmp2、Bmp4、Bmp6、Bmp7 の各遺伝子のノックアウトマウスでは、胎生致死や骨化遅延、骨量減少などの骨格形成異常が確認される (20)。ActR-IIB 欠損マウスにおいては下顎の形成不全等の骨格形成の異常も認められている (21)。一方、がんの進展にも BMP が寄与していることが示唆されている (22, 23)。特に前立腺がんにおいては、原発腫瘍組織での BMP-6 の発現が転移の有無と相関することが示されている (24)。また、BMP-7 の発現が、前立腺がんの原発腫瘍組織に比して、転移性骨腫瘍組織において亢進している (25)。したがって、前立腺がんの造骨性骨転移部位においても、BMP を介した骨形成の制御機構が作用しており、前立腺がんの造骨性転移に何らかの関与があることが想定される。

2-4 Hh シグナル伝達機構

BMP 標的遺伝子の一つに、Hedgehog (Hh) ファミリー遺伝子がある (26-28)。哺乳類では Hh ファミリーとして、Sonic hedgehog (SHH)、Indian hedgehog (IHH)、Desert hedgehog (DHH) の三種類のリガンドが存在する。これらの Hh リガンドの局在と生理作用は異なり、SHH は神経管や四肢のパターニング、IHH は骨格形成、DHH は精子形成と末梢神経を囲む神経鞘の発生などに関与する。Hh リガンドは、細胞膜上の 12 回膜貫通型タンパク Patched (Ptch) に結合することで、細胞内へシグナルが伝達される (図 2)。Hh シグナルは、転写因子 Glioma-associated oncogene (Gli) の状態を、活性型 Gli (GliA) もしくは不活性型 Gli (GliR) に制御することで、標的遺伝子の転写を調節し、生物学的作用を発揮している。Hh リガンド非存在下では、Ptch は一次繊毛周辺に蓄積し、7 回膜貫通型タンパクである Smoothed (Smo) の活性を抑制している。このとき、一次繊毛の基底部では、Gli は Suppressor of Fused (SuFu) と複合体 (SuFu-Gli 複合体) を形成する。Hh リガンドが Ptch に結合すると、一次繊毛における Ptch と Smo の局在が入れ替わる。Smo は Casein kinase 1 (CK1) と G-protein-coupled receptor kinase 2 (GPRK2) によるリン酸化を受けて活性型となる。活性型 Smo は β -arrestin や Kinesin protein 3a (Kif3a) と相互作用し、さらには Ellis-van Creveld syndrome protein (EVC) および EVC2 と複合体を形成し、一次繊毛に集積する。これにより一次繊毛の先端部における SuFu-Gli 複合体が増加し、SuFu-Gli 複合体は分解され、Gli2 と Gli3 がプロセ

シングから逃れ、全長型の GliA として標的遺伝子の転写を活性化する。なお、Gli2 と Gli3 の一次繊毛内の移動は Kif7 依存性であることがわかっている。Hh シグナルの標的遺伝子の中には、Cyclin D1 や N-myc proto-oncogene protein (N-myc) などがあり、がんの進展に関与することが知られている。さらに Jagged-2 (JAG-2) など、がん細胞の骨転移に重要な役割を果たす因子の発現が Hh シグナルに制御される (29、30)。これらの報告を統合的に解釈し、本研究では、前立腺がんと骨間質細胞の相互作用における BMP シグナル、Hh シグナルの役割を解明することを目的に研究を行った。

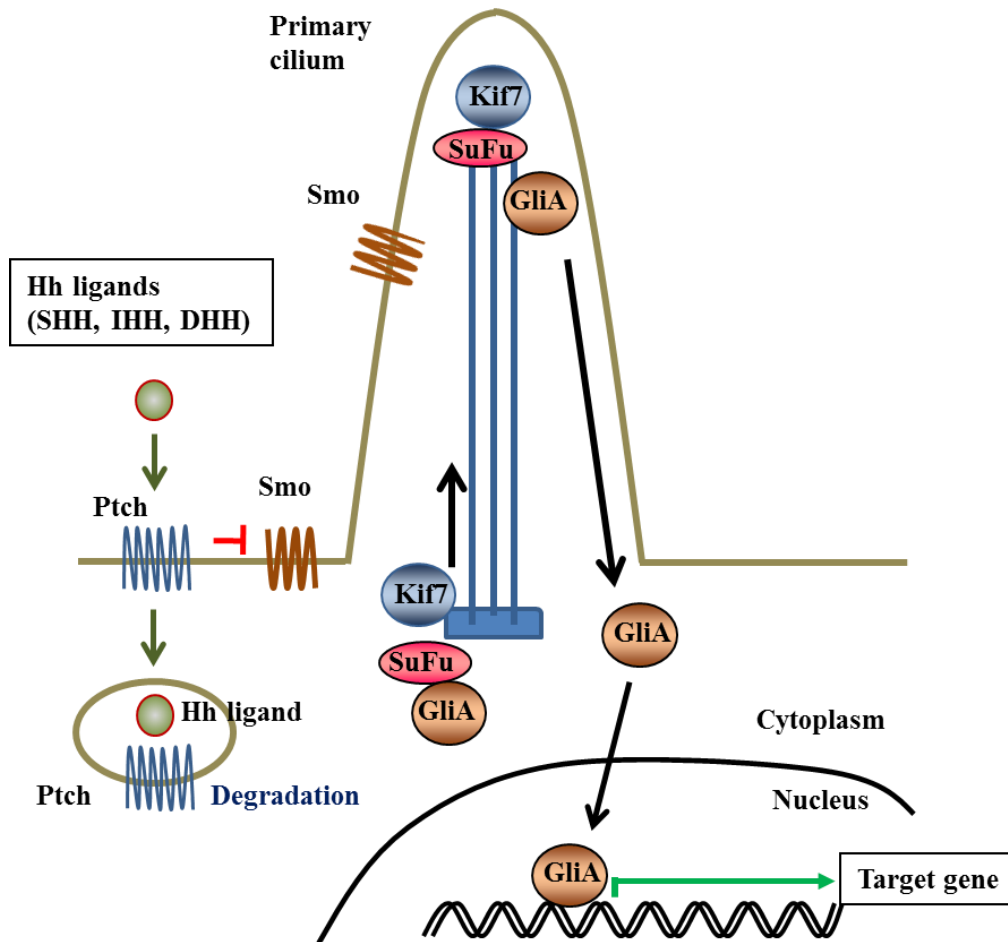


図2. Hh シグナル伝達の概略

Hh リガンド非存在下では、Ptch が Smo の活性化と一次繊毛への局在を抑制する。一次繊毛の Kif7、SuFu、活性型 Gli (GliA) も低レベルである。Hh リガンド存在下では、Hh リガンドが Ptch に結合後、リガンドと受容体の両者が細胞内へ移行し分解される。これにより Ptch の阻害から解放された Smo は CK1 や GPRK2 によってリン酸化され、活性化型となり、一次繊毛先端へ移動する。Kif7、SuFu や GliA もまた一次繊毛で蓄積し、一次繊毛先端へ移動後、活性化 Smo が SuFu-GliA 複合体を分離し、GliA を誘導する。GliA は核に移行し、標的遺伝子の転写を活性化する。

3. 実験方法

3-1 細胞培養・試薬

ヒト前立腺がん細胞株 (LNCaP、CWR22 : Dr. Wu Lily (University of California at Los Angeles) より供与) とヒト多発性骨髄腫細胞株 (U266) は RPMI 1640 medium (Life Technologies) に 10% Fetal bovine serum (FBS : HyClone) を添加した培地で培養した (31-34)。ヒト乳がん細胞株 (MDA-MB-231) は、High-glucose DMEM (Life Technologies) に 10% FBS を添加した培地で培養した。マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1) は α -modified minimum essential medium (α MEM : Life Technologies) に 10% FBS を添加した培地で培養した。なお、全ての培地には、さらに Streptomycin (Life Technologies : 50 units/ml) と Penicillin G (Life Technologies : 50 μ g/ml) を添加した。BMP-4、BMP-6、BMP-9、TGF- β 3、Activin A (全て R & D Systems) は 4 mM HCl (Nacalai Tesque) に 0.1% Bovine serum albumin (BSA : Sigma-Aldrich) で溶解した。BMP-4 は表記のない場合は 10 ng/ml で使用した。SHH は、N-terminal SHH (R & D Systems) を 0.1% BSA で溶解し、500 ng/ml で使用した。LDN-193189 (Wako)、SP600125 (Calbiochem)、U0126 (Promega)、SB203580 (Calbiochem)、LY294002 (Calbiochem)、Cycloheximide (Sigma-Aldrich)、SANT-1 (Sigma-Aldrich)、Itraconazol (Kaken Pharmaceutical)、PD173074 (Wako)、PD153035 (Merck) は Dimethyl sulphoxide (DMSO : Nacalai Tesque) で溶解した。

3-2 レンチウイルスベクターによる安定発現株の樹立

安定発現株の樹立はレンチウイルスベクターにより行い、レンチウイルスベクター作製のため実験に用いたプラスミドは三好浩之博士（理化学研究所）より供与頂いた。HEK293FT 細胞に、Green fluorescent protein (GFP) を導入した pCSII-EF とともに、pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev を Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) を用いてトランスフェクションし、レンチウイルスベクターを得た。本ベクターを LNCaP 細胞に 24 時間感染後、培地交換により余剰のレンチウイルスベクターを除去して数回継代し、GFP を安定的に発現する細胞株 (LNCaP-GFP) を樹立した (35)。

3-3 一過性強制発現試験

LNCaP 細胞を 6 well plate に播種し、FuGENE HD (Roche Diagnostics) を用いてヒト *ID1* 配列を含むプラスミド (pcDNA3-hID1) をトランスフェクションした。トランスフェクション 72 時間後に、total RNA を回収し、遺伝子発現解析を行った。

3-4 Separate co-culture と細胞増殖試験

LNCaP 細胞 (5×10^5 個) を cell culture insert (0.4 μm pore size : BD Biosciences) に播種し、 αMEM に 1% FBS を添加した培地で 1 日間前培養した。MC3T3-E1 細胞 (2×10^5

個) を 6 well plate に播種し、 α MEM に 1% FBS を添加した培地で 1 日間前培養した。

翌日、LNCaP 細胞が接着している cell culture insert を MC3T3-E1 細胞が培養されている 6 well plate 上に設置し、BMP-4 存在下に α MEM に 1% FBS を添加した培地で 7 日間培養した。培地交換は 3~4 日毎に実施した。MC3T3-E1 細胞の細胞増殖は、血球計算盤を用いた生細胞数の計測により評価した。

3-5 Mixed co-culture と細胞増殖試験

LNCaP 細胞 (8×10^5 個) もしくは LNCaP-GFP 細胞 (8×10^5 個) を、MC3T3-E1 細胞 (2×10^5 個) を混合して 6 well plate に播種し、 α MEM に 1% FBS を添加した培地で培養を開始した。播種 24 時間後、SANT-1 存在下もしくは非存在下で BMP-4 を添加し、72 時間刺激した。LNCaP-GFP 細胞の細胞増殖は、血球計算盤を用いた GFP 陽性細胞の生細胞数の計測により評価した。

3-6 遺伝子発現解析

細胞からの total RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて行い、complementary DNA (cDNA) の合成は PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて oligo dT protocol で行った。Quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) による遺伝子発現量は StepOne Plus Real-time PCR System (Life Technologies) で、Fast

SYBR Green Master Mix (Life Technologies) を用いて解析した (36)。各遺伝子の発現量

は Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) の発現量で標準化した。

qRT-PCR で用いた primer を以下に示す。

Gene	Forward primer	Reverse primer
Human		
<i>GAPDH</i>	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
<i>SHH</i>	5'-GCTCGGTGAAAGCAGAGAAC-3'	5'-CCAGGAAAGTGAGGAAGTCG-3'
<i>IHH</i>	5'-CCACCACTCAGAGGAGTCC-3'	5'-GTGCTCGGACTTGACGGAG-3'
<i>DHH</i>	5'-TGATGACCGAGCGTTGTAAG-3'	5'-GCCAGCAACCCATACTTGTT-3'
<i>ID1</i>	5'-AGCACGTCATCGACTACATCAGG-3'	5'-GGATTCCGAGTTCAGCTCCAA-3'
<i>SMAD4</i>	5'-AAAACGGCCATCTTCAGCAC-3'	5'-AGGCCAGTAATGTCCGGGA-3'
<i>SMO</i>	5'-TGGTCACTCCCCTTTGTCCTCAC-3'	5'-GCACGGTATCGGTAGTTCTTGTAGC-3'
<i>CEBPA</i>	5'-TGGACAAGAACAGCAACGAG-3'	5'-TTGTCAGTGGTCAGCTCCAG
<i>CDKN1A</i>	5'-AGTGGACAGCGAGCAGCTGA-3'	5'-CGAAGTTCATCGCTCACGG-3'
<i>CDKN2B</i>	5'-CCGCCACAACGACTTTATT-3'	5'-CAGCCTTCATCGAATTAGGTG-3'
Mouse		
<i>Gapdh</i>	5' -ATGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'	5' -TTGAAGTCGCAGGAGACAACCT-3'
<i>Tgfb2</i>	5' -CCTACTCTGTCTGTGGATGACCT-3'	5' -ACTTCCGGGGCCATGTAT-3'
<i>Bmpr2</i>	5' -TGGGAGGTGTTTATGAGGTGT-3'	5' -GAAAAGCCATCTGGTAATCTGG-3'
<i>Acvr2a</i>	5' -CCCTCCTGTACTTGTTCCTACTCA-3'	5' -GCAATGGCTTCAACCCTAGT-3'
<i>Acvr2b</i>	5' -GCTCAGCTCATGAACGACT-3'	5' -CTCTGCCACGACTGCTTGT-3'
<i>Tgfb1</i>	5' -AAATTGCTCGACGCTGTTCT-3'	5' -GGTACAAGATCATAATAAGGCAACTG-3'
<i>Bmpr1a</i>	5' -TGACCTGGGCCTAGCTGTTA-3'	5' -TTCAGGCTTTCATCCAGCA-3'
<i>Bmpr1b</i>	5' -GCCCAAGATCCTACGTTGTAA-3'	5' -CGTGAAGCAGTACCCATCTG-3'
<i>Acvr1</i>	5' -AGGGCTCATCACCACCAAT-3'	5' -GCCACTTCCTGATGTACACG-3'
<i>Acvr11</i>	5' -ACACCCACCATCCCTAACCG-3'	5' -ACCAGCACTCTCTCATCATCTG-3'
<i>Smad1</i>	5' -ACTGAAGCCTCTGGAATGCT-3'	5' -CTGGAAAGAGTCTGGGAACG-3'
<i>Smad2</i>	5' -CGGAGATTCTAACAGAACTG-3'	5' -AACACCAGAATGCAGGTTCC-3'
<i>Smad3</i>	5' -AGCACACAATAAATTGGACC-3'	5' -CGATGTAGTAGAGCCGCACA-3'
<i>Smad4</i>	5' -CATTCTGTGGCTTCCACAA-3'	5' -GTTTTGGTGGTGAGGCAAAAT-3'
<i>Smad5</i>	5' -ATGCCAGCATATCCAGCAG-3'	5' -CCAATATGCCGCTAGTGTT-3'
<i>Smad8</i>	5' -CCATCAGCTCCCTCTTCTCC-3'	5' -CGCTGTGTCTTGGTACCAGC-3'
<i>Gli1</i>	5' -TCGACCTGCAAACCGTAATCC-3'	5' -TCCTAAAGAAGGGCTCATGGTA-3'
<i>Id1</i>	5' -AGGTGAACGTCCTGCTCTACGA-3'	5' -CAGGATCTCCACCTTGCTCACT-3'
<i>Alp</i>	5' -TCAGGGCAATGAGGTCACATC-3'	5' -CACCCGAGTGGTAGTCACAATG-3'
<i>Ibsp</i>	5' -CACCCCAAGCACAGACTTTT-3'	5' -TCGTCGCTTTCCTTCACTTT-3'
<i>Bglap</i>	5' -GGCCCTGAGTCTGACAAAGC-3'	5' -GCCGGAGTCTGTTCACTACCTT-3'
<i>Fgf2</i>	5' -GGCTGCTGGCTTCTAAGTGT-3'	5' -CCGTTTTGGATCCGAGTTTA-3'
<i>Egf</i>	5' -CCTGGGAATGTGATTGCTTT-3'	5' -CCTGGGAATTTGCAAACAGT-3'

3-7 Immunoblotting

細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で wash した後に、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics) と EDTA-free phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque) を添加した radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1% Nonidet P-40、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.5% sodium deoxycholate) で溶解して 15,000 rpm 4°C で 30 分間遠心分離した後、上清を回収し、Immunoblotting 用タンパク質サンプルとした。各サンプルのタンパク質濃度を BCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific) で定量後、全サンプルで等量のタンパク質を用いて SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。続けて gel を Fluoro Trans W membrane (Pall) に転写し、Tris-buffered saline and Tween 20 (TBS-T) buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween-20) で溶解した 5% スキムミルクで membrane のブロッキングを行った。1 次抗体は 4°C で 16 時間反応させ、2 次抗体を常温で 30 分間反応させた後に ImageQuant LAS4000 (Fujifilm) で検出した (37)。使用した抗体と希釈倍率を以下に示す。

1 次抗体	2 次抗体
抗 Smad1 抗体 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 IgG, HRP-linked 抗体 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 Smad1/5/8 抗体 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 IgG, HRP-linked 抗体 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 pSmad1/5 抗体 (Cell Signaling, 1:1000)	抗 IgG, HRP-linked 抗体 (Cell Signaling, 1:10000)
抗 α -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich, 1:10000)	抗 IgG, HRP-linked 抗体 (Cell Signaling, 1:10000)

3-8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

培養上清を回収し、Sonic Hedgehog Human ELISA Kit (Abcam) 用のサンプルは 4°C、200 × g で 5 分間遠心後、Kit 付属の希釈用バッファー Assay Diluent B で 50 倍希釈し、ELISA 用タンパク質サンプルとした。ELISA Kit for Hedgehog Homolog, Indian (Uscn Business) と ELISA Kit for Hedgehog Homolog, Desert (Uscn Business) 用のサンプルは 4°C、1000 × g で 20 分間遠心後、上清を回収し ELISA 用タンパク質サンプルとした。実験は ELISA Kit 付属のプロトコルに従い、450 nm における吸光度を測定することで培養上清中の各 Hh タンパク質含有量を定量した。

3-9 Luciferase reporter assay

MC3T3-E1 細胞 (7×10^4 個) を 12 well plate に播種し、FuGENE HD を用いて BMP 応答性に Firefly luciferase を発現するレポータープラスミドである BMP-responsive element-luciferase (BRE-luc) をトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に、SHH を添加し、36 時間刺激した。続いて BMP-4 刺激を 12 時間行った後、Firefly luciferase 活性を測定した。なお、cytomegalovirus (CMV) プロモーター下に恒常的に Renilla luciferase を発現するプラスミド (CMV-renilla) をトランスフェクションし、Renilla luciferase 活性で Firefly luciferase 活性を決定した (38)。

3-10 Small interfering RNA (siRNA) による RNA 干渉

LNCaP 細胞 (8×10^5 個) を 6 well plate に播種し、Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific) と複合体を形成させた Stealth RNAi-siSMAD4 (Invitrogen : siSMAD4) もしくは control siRNA (Invitrogen : siNTC) を細胞にトランスフェクションした (39)。さらに細胞に BMP-4 を刺激後 72 時間に RNA を精製し、遺伝子のノックダウン効率ならびにノックダウン時における各遺伝子の発現を評価した。

3-11 骨間質細胞分化と Alkaline phosphatase (ALP) 染色

MC3T3-E1 細胞 (2×10^5 個) を 6 well plate に播種し、 α MEM に 1% FBS を添加した培地で 1 日間前培養した。翌日、BMP-4 ならびに SHH を添加し 7 日間刺激した。細胞内の ALP 活性は、ALP Staining Kit (Sigma-Aldrich) で解析した。

4. 結果

4-1 BMP による SHH 発現制御

多数の BMP 標的遺伝子が多くの細胞で同定されている (12, 16)。それらの中でも Hh ファミリー遺伝子は、一部の種類の細胞における BMP の標的であり、骨形成に重要な役割を担っている (26-28)。そこで本研究では、前立腺がん細胞で BMP-4 によって Hh ファミリー遺伝子が誘導されるか、検討した。今回は免疫不全マウス内ヒト骨組織モデルにおいて組織学的に造骨性骨転移を示す前立腺がん細胞株 LNCaP 細胞を用いた (40)。その結果、qRT-PCR から、LNCaP 細胞では BMP-4 が Hh ファミリーリガンドである SHH、IHH、DHH の mRNA を誘導することを見出した (図 3A)。さらに ELISA を用いた定量的実験では、BMP 刺激を行っても LNCaP 細胞の培養上清中の IHH タンパク質濃度と DHH タンパク質濃度は変化していなかったが、SHH タンパク質は BMP-4 により 44.4 ng/ml まで増加することを見出した (図 3B)。また、IHH や DHH は、mRNA レベルでは増加が認められるものの、タンパクレベルでは増加が認められなかった。何らかの理由により BMP-4 による IHH タンパク質と DHH タンパク質は発現誘導されないと考えられたが、定量に使用した ELISA の抗体の検出感度や、タンパク質自体の安定性など、解析上の技術的な問題が関係している可能性も想定された (41)。ただし本研究では、BMP-4 刺激により少なくとも SHH タンパク質

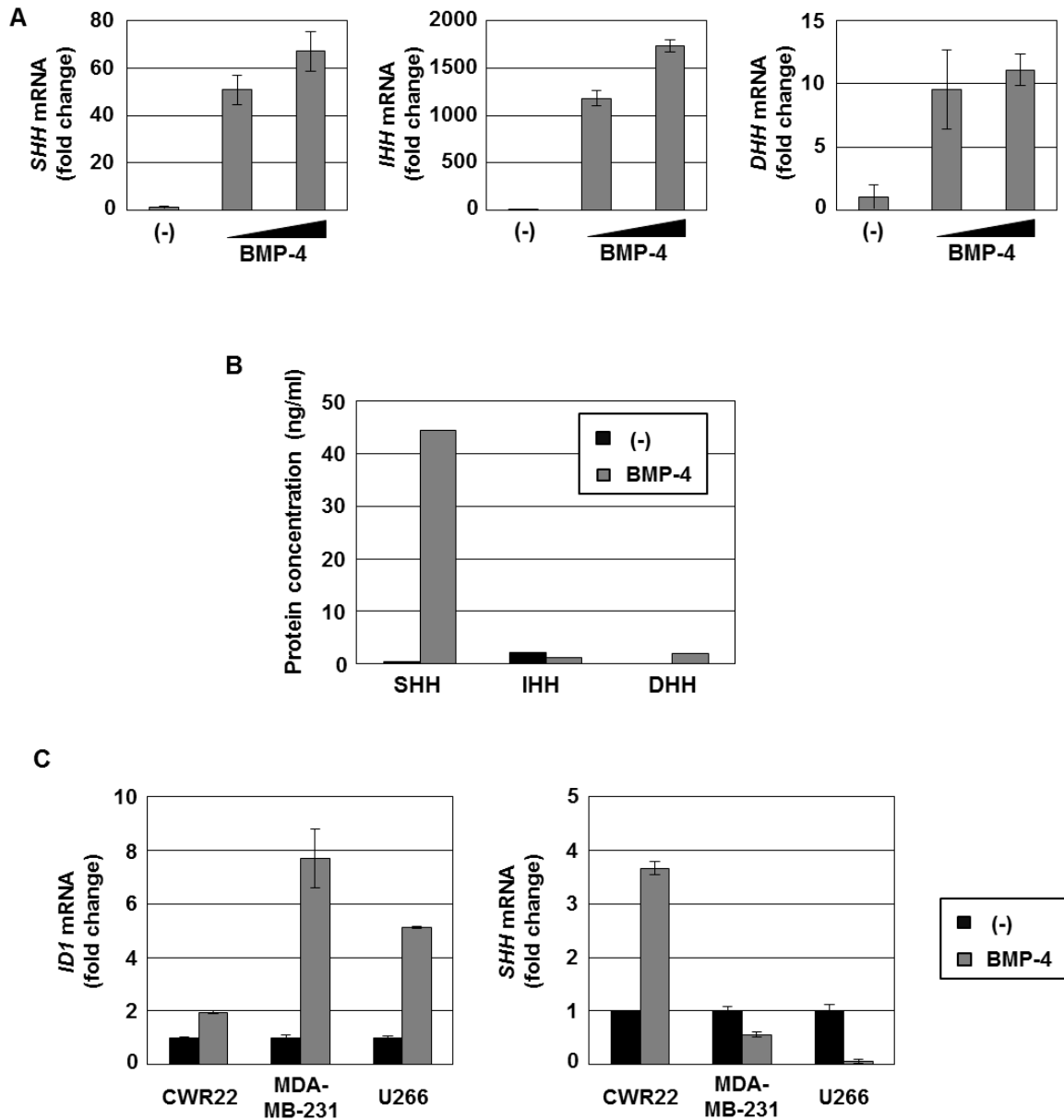


図3. BMP-4による前立腺がんでのSHH発現誘導

(A) BMP-4を10 ng/ml および100 ng/mlでLNCaP細胞に4日間刺激したときのSHH、IHH、DHHの発現をqRT-PCRにより評価した。各サンプルをduplicateで測定し、結果は平均値 ± SDを表す。

(B) BMP-4を7日間刺激したときの培地中のSHH、IHH、DHHリガンドタンパク質の濃度を測定した。培養上清を回収後、ELISAにて評価し、リガンドの濃度を定量した。

(C) BMP-4で各細胞を4日間刺激したときのID1、SHHの発現をqRT-PCRにより評価した。各サンプルをduplicateで測定し、結果は平均値 ± SDを表す。

は発現が亢進しているため、BMP-4により前立腺がん細胞株でHhリガンドが誘導されることが明らかとなった。BMP-4によるSHH mRNAの転写制御を、骨転移能を示す他のがん細胞でも検討した(図3C)。試験した全てのがん細胞株で、代表的なBMP標的遺伝子のひとつであるIDI mRNAの発現増加が認められたため、全てのがん細胞株は少なくとも外因性のBMPに応答していると考えられる。この実験条件でのSHHの発現変化を調べたところ、ヒト前立腺がん細胞株CWR22では、LNCaP細胞と同様に、BMPによるSHH mRNAの発現の増加が見られた。CWR22細胞は免疫不全ラットの脛骨へ移植を行うと、造骨性組織像を呈することが報告されている前立腺がん細胞である(42)。一方、転移性骨腫瘍が溶骨性の組織像を示すことが知られている乳がんや多発性骨髄腫の細胞株であるMDA-MB-231やU266では、BMP-4によるSHH mRNAの増加は認められなかった。また、前立腺がん細胞のアンドロゲン依存性とSHH発現誘導の関係を検討するため、アンドロゲン非依存性の細胞株であるLNCaP-C4-2、LNCaP-C4-2BおよびPC-3細胞を用いて同様の検討を行った。これらの細胞にBMP-4を刺激し、SHH mRNAの発現量をqRT-PCRで検討したところ、LNCaP-C4-2細胞とLNCaP-C4-2B細胞ではSHH mRNAの発現誘導が認められたが、PC-3細胞では発現誘導が認められなかった(Data not shown)。LNCaP細胞を親株とするLNCaP-C4-2細胞とLNCaP-C4-2B細胞は、LNCaPと同様に造骨性骨転移を示すが、これに対し、PC-3細胞は溶骨性の骨転移を示す(43-45)。以上の結果から、BMP-4に

よる SHH の発現誘導は、造骨性の骨転移を示す前立腺がん細胞特異的な制御機構であり、前立腺がん細胞による造骨性骨転移の形成に重要である可能性が示唆された。また前立腺がん細胞のアンドロゲン依存性は、BMP による SHH の発現誘導には直接的に関係しているものではないと推測された。

4-2 前立腺がん細胞での BMP による Smad 依存的な SHH 発現制御

続いて、SHH の発現制御を担うシグナル伝達経路を明らかにするために、BMP を含めた TGF- β ファミリーのリガンドが SHH の発現制御に寄与するか検討した。BMP は結合する type I receptor からいくつかのグループに大別されるため (12)、それぞれのグループのリガンド刺激を行った。LNCaP 細胞において、BMP-4 (BMP-2/4 グループ)、BMP-6 (Osteogenic protein (OP)-1 グループ)、BMP-9 (BMP-9/10 グループ) は全て SHH mRNA の発現量を用量依存的に増加させたが、BMP-4 や BMP-6 と比較すると、BMP-9 は弱い SHH の発現増加に止まった (図 4A)。また他の TGF- β ファミリーメンバーである TGF- β 3 や Activin A は SHH mRNA を誘導することができなかった。BMP シグナルには Smad 依存的な経路と Smad 非依存的な経路の両方が存在する (図 1)。Smad 依存的な経路では Smad complex が BMP の標的遺伝子を発現制御している。そこで、LNCaP 細胞における内在性の Smad4 を siRNA によりノックダウンし (siSMAD4)、SHH の発現制御において Smad 依存的な経路と Smad 非依存的な経路のどちらが重要な役割を

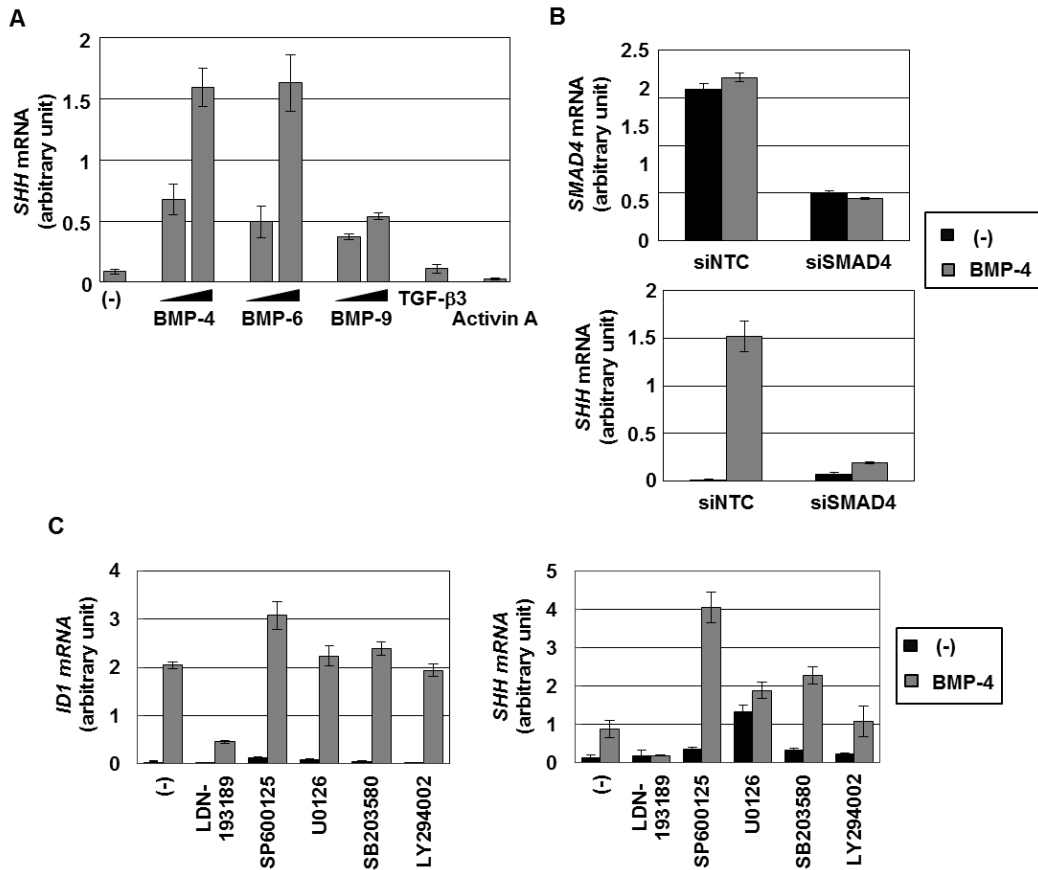


図 4. BMP-4 による前立腺がんでの SHH 発現誘導の Smad 依存性

(A) BMP-4、BMP-6、BMP-9 を 10 ng/ml および 100 ng/ml で、TGF-β3 を 1 ng/ml、Activin A を 30 ng/ml で LNCaP 細胞に 4 日間刺激したときの SHH の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ±SD を表す。

(B) siNTC もしくは siSMAD4 をトランスフェクションした LNCaP 細胞に、BMP-4 を 3 日間刺激したときの SMAD4、SHH の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ±SD を表す。

(C) LDN-193189 (10 μM)、SP600125 (10 μM)、U0126 (10 μM)、SB203580 (10 μM)、LY294002 (10 μM) を処理した LNCaP 細胞に、BMP-4 を 2 日間刺激したときの ID1、SHH の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ±SD を表す。

果たしているか検討した。比較として用いた **Negative control siRNA (siNTC)** で処理した LNCaP 細胞では、**BMP-4** による **SHH** 発現誘導が見られたが、**siSMAD4** で処理した LNCaP 細胞では **SMAD4** mRNA が効率良くノックダウンされていたのみならず、**BMP-4** 誘導性の **SHH** 発現誘導が顕著に抑制されていた (図 4B)。

一方で、**BMP** による **Smad** 非依存的なシグナル伝達経路では、**Extracellular signal-regulated kinase (ERK)**、**p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)** や **c-Jun N-terminal kinase (JNK)** 経路を介して標的遺伝子の発現が制御される (図 1 および 46-48)。そこで、**Smad** 非依存的なシグナル伝達経路を担う各種キナーゼの阻害剤を LNCaP 細胞に処理し、同様の解析をおこなった。**BMP** 阻害剤である **LDN-193189** 処理により、**BMP-4** による **SHH** mRNA 発現誘導は顕著に抑制された (図 4C)。これに対し、**JNK** 阻害剤 (**SP600125**) や **ERK** 阻害剤 (**U0126**)、**p38 MAPK** 阻害剤 (**SB203580**)、そして **Akt** 阻害剤 (**LY294002**) では、**BMP-4** 誘導性の **SHH** 発現増加を抑制することは出来なかった。これらの結果から、LNCaP 細胞での **SHH** 発現誘導は **BMP** 特異的な制御機構であり、これは **Smad** 依存的なシグナル伝達により引き起こされることが明らかとなった。しかしながら本研究では、実際に阻害剤により標的シグナル経路が十分に阻害されているかどうか検証できていない。さらに **SP600125** や **U0126** は、**aryl hydrocarbon receptor** の **partial agonist** としても作用し、**LY294002** は **PLK1** や **PIM1** を阻害するなど、これらの阻害剤が非特異的にシグナルを阻害している可能性も否定でき

ず、より厳密な検証が必要かもしれない (49-51)。なお U0126 は、BMP-4 未刺激時の *SHH* mRNA の発現を増加させている。幼若マウスの毛包では *KRAS* シグナルの活性化により *SHH* の発現が阻害されるとする報告があり、今回用いた *MEK* 阻害剤により *SHH* mRNA の発現増加が引き起こされている可能性が考えられる (52)。

LNCaP 細胞で *SHH* の発現を制御するシグナル伝達経路のさらなる同定を試みた。LNCaP 細胞を BMP-4 で刺激を行い経時変化を観察したところ、*ID1* mRNA は刺激 1 時間でただちに増加し、その後にプラトーに達したが、*SHH* mRNA は刺激後 24 時間から顕著な発現増加を示し、刺激後 48 時間まで増加し続けるという比較的緩やかな発現誘導を示した (図 5A)。そこで BMP-4 による *SHH* の発現制御が直接的な制御機構か間接的な伝達機構に依るものか検討するため、*de novo* タンパク質合成阻害剤である Cycloheximide (CHX) で LNCaP 細胞を処理した。この結果、CHX 存在下であっても、BMP の直接的な標的である *ID1* の発現は、BMP-4 刺激による発現誘導が保たれたままであった。これに対し、BMP の間接的な標的である CCAAT/enhancer binding protein- α (*CEBPA*) と同様に、*SHH* の発現誘導は、CHX によって顕著に抑制されていたため、BMP-4 による *SHH* の転写制御には新規の転写因子が介在していると想定された (図 5B)。なお、この実験結果において、CHX 処理のみで *ID1* mRNA の発現が増加している。過去の報告では CHX により *c-myc* の発現を誘導し、さらに *c-myc* の標的遺伝子の一つとして *ID1* mRNA が誘導されることが示されていることから (53、

54)、本研究の CHX による ID1 の発現誘導は、c-myc を介した制御である可能性が考えられた。他方、ID1 は BMP により発現誘導を受ける転写因子であり、この発現誘導が SHH の発現制御に関与しているかを検討するため、LNCaP 細胞に pcDNA3-hID1 を強制発現させたが、SHH mRNA の発現は変化しなかった。したがって、BMP による SHH の転写制御には ID1 以外の転写因子が関与していると推測された (図 5C)。以上の結果から、BMP シグナルの活性化による LNCaP 細胞での SHH の発現誘導は、Smad 依存的かつ間接的な誘導機構であるが、これは ID1 非依存的な経路であると考えられた。

4-3 骨間質細胞の BMP シグナル感受性に対する SHH の機能

BMP が骨間質細胞の骨芽細胞分化に重要であることから、骨間質細胞の BMP シグナル伝達に対して SHH が影響を及ぼしているか調べた。MC3T3-E1 細胞の BMP 応答性を Luciferase reporter assay で評価したところ、SHH リガンド刺激をすることで BMP-4 により誘導されるレポーター活性の増強が認められた (図 6A)。続いて、SHH が MC3T3-E1 細胞の BMP シグナル伝達系の増強を引き起こすメカニズムを評価するため、MC3T3-E1 細胞での BMP シグナル構成因子の発現レベルを qRT-PCR で検討した。この結果、BMP type I receptor と type II receptor のうち、ActR-IIIB (*Acvr2b*) の発現が

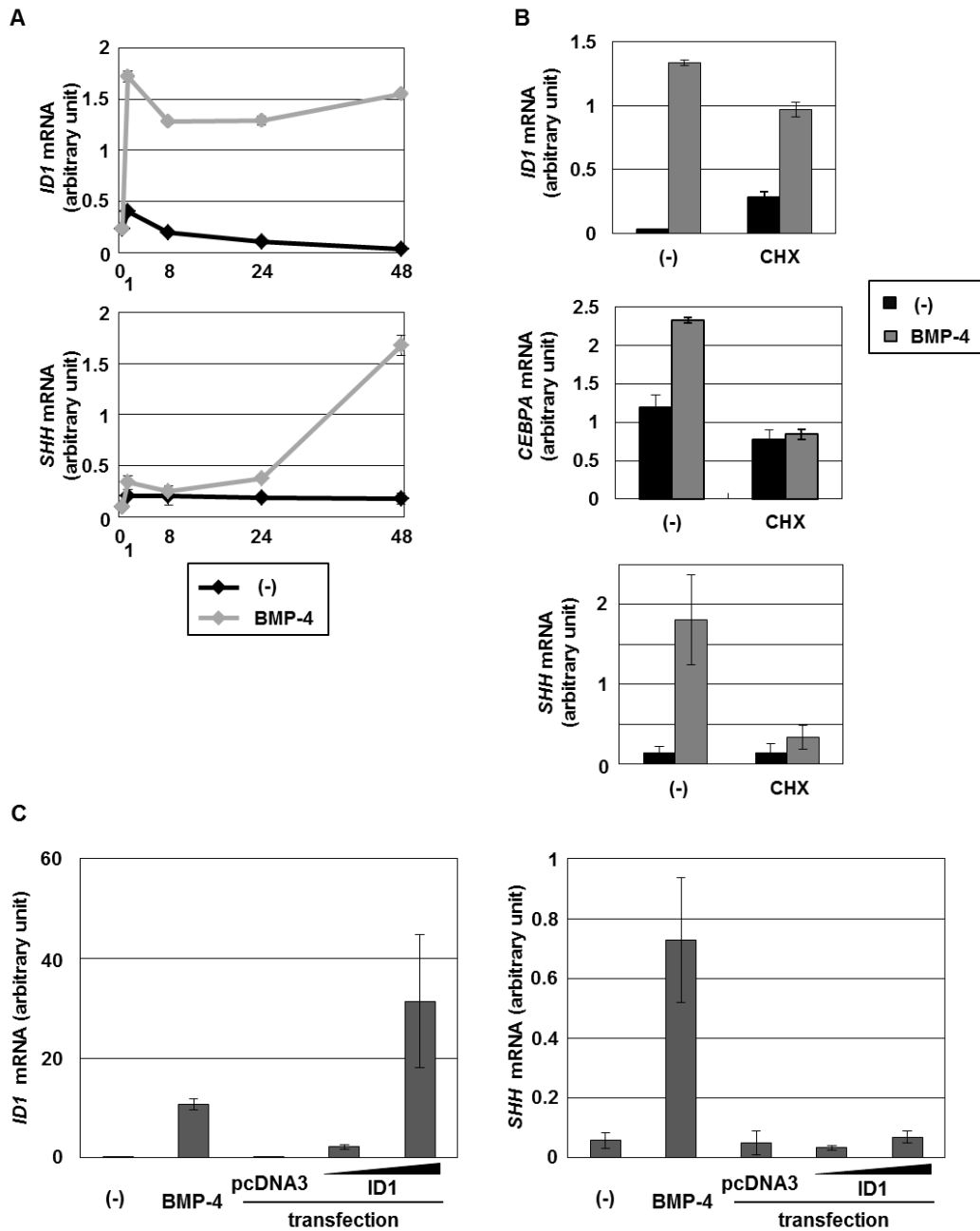


図5. 前立腺がん細胞での BMP-4 による間接的な SHH 発現誘導

(A) BMP-4 を LNCaP 細胞に刺激したときの *ID1* と *SHH* の発現の経時変化を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ± SD を表す。

(B) CHX (2 mg/ml) を前処理した LNCaP 細胞に、BMP-4 を 3 日間刺激したときの *ID1*、*CEBPA*、*SHH* の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ± SD を表す。

(C) LNCaP 細胞に BMP-4 刺激、もしくは pcDNA3-h*ID1* を遺伝子導入した 3 日後の *ID1*、*SHH* の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ± SD を表す。

SHHにより誘導されていた (図 6B)。また BMP 特異的 R-Smad や Co-Smad の中では、*Smad1* の発現が SHH により増加していた。さらに、Immunoblotting によるタンパク質レベルでの発現量解析においても、MC3T3-E1 細胞を SHH 刺激することにより *Smad1* タンパク質発現が増加することが明らかとなった (図 6C)。また、SHH で刺激した MC3T3-E1 細胞における *Smad1* タンパク質の増加に伴い、結果として BMP-4 により C 末端領域がリン酸化される *Smad1* (p*Smad1*) の量も増加することが明らかとなった (図 6C)。これらの結果から、MC3T3-E1 細胞において、SHH は BMP シグナル構成因子である ActR-IIIB と *Smad1* の発現誘導を介して、BMP シグナル伝達を増強していることが示唆された。

なお、LNCaP 細胞が産生する SHH がオートクライン様式により LNCaP 細胞自身に作用しているかどうかを検討するため、SHH 標的遺伝子である GLI-Kruppel family member (*GLI1*) の発現レベルを、BMP-4 刺激を受けた LNCaP 細胞で検討した。ところが BMP-4 刺激では *GLI1* mRNA の変動は認められなかった上に、Hh ファミリーに対する受容体である Smo の発現低下が認められた (図 7A)。さらに、LNCaP 細胞が SHH に応答してシグナル伝達を行うかどうか検討するため SHH リガンドで LNCaP 細胞を刺激したところ、BMP-4 の存在・非存在に関わらず、*GLI1* mRNA の発現誘導は認められなかった (図 7B)。これらのことから、LNCaP 細胞は SHH に対する感受性が喪失しており、BMP-4 誘導性 SHH は LNCaP 細胞でオートクライン様式では作用

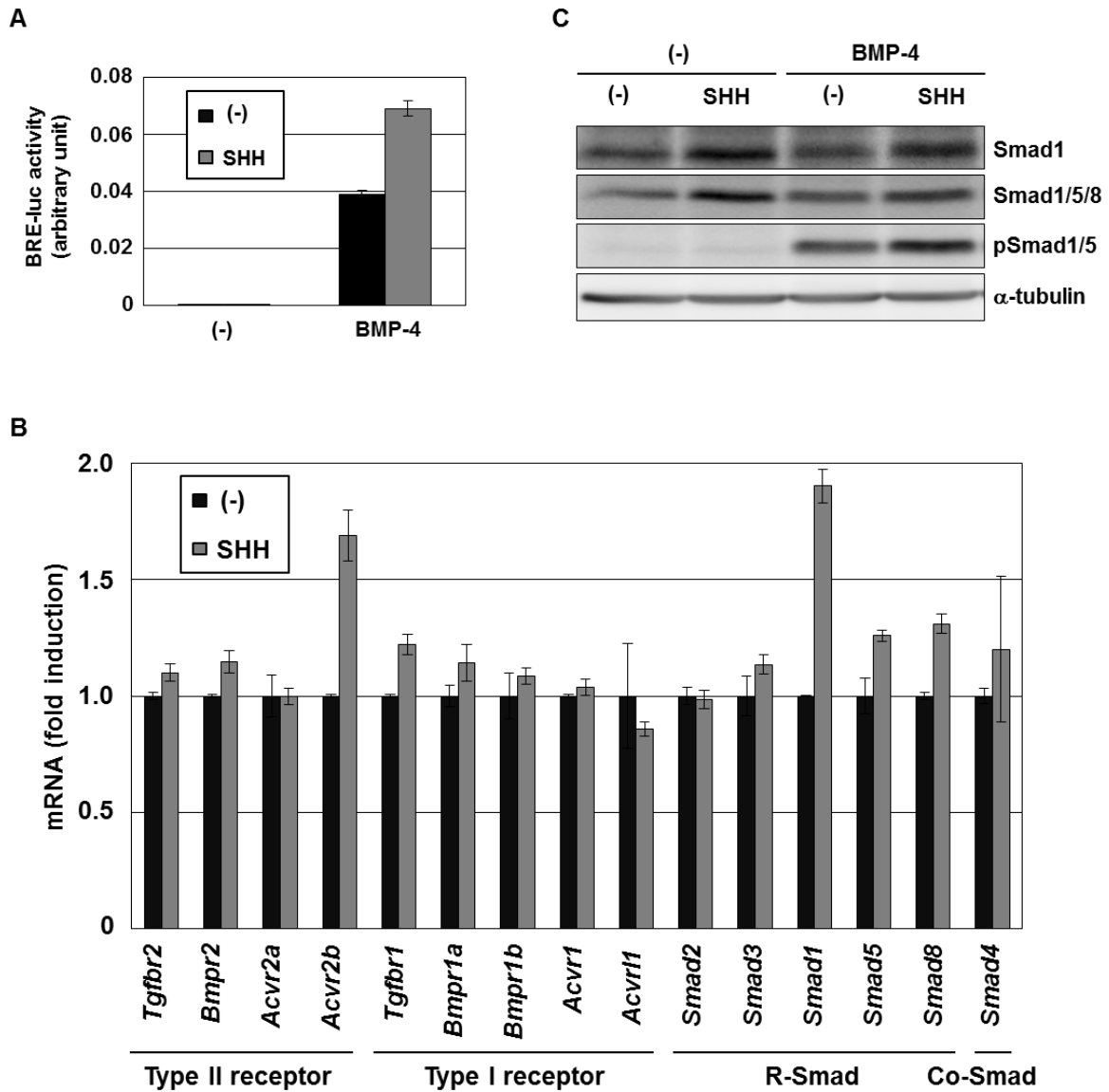


図 6. SHH による骨間質細胞での BMP 感受性の亢進

(A) レポータープラスミド BRE-Luc をトランスフェクションした MC3T3-E1 細胞に SHH を 36 時間刺激後、さらに BMP-4 を 12 時間刺激したときの luciferase 活性を評価した。各サンプルを duplicate で測定後、平均値を luciferase の値とした。結果は平均値 \pm SD を表す。

(B) SHH を 48 時間前刺激した MC3T3-E1 細胞での BMP シグナル構成因子の発現を qRT-PCR により網羅的に評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

(C) MC3T3-E1 細胞に SHH を 48 時間前刺激後、BMP-4 を 1 時間刺激したときの Smad1、Smad1/5/8、リン酸化 Smad1/5 の発現 (pSmad1/5) を Immunoblotting で検討した。

していないと考えられた。

4-4 骨間質細胞の分化に対する BMP と SHH の協調作用

SHH により増強される BMP シグナルは、骨間質細胞の骨芽細胞分化を制御している (12)。そこで、BMP-4 と SHH が、骨間質細胞の骨芽細胞分化に対して協調的に影響を及ぼすかどうか検証するため、MC3T3-E1 細胞を BMP-4 リガンドと SHH リガンドで共刺激した。qRT-PCR により、*Gli1* mRNA の発現を検討したところ、SHH による明らかな増加が認められた (図 8A)。また、BMP-4 による *Id1* mRNA の発現誘導は、SHH で刺激した MC3T3-E1 細胞において顕著に増強された。このとき、MC3T3-E1 細胞において SHH や BMP-4 による明らかな増殖への影響は見られなかった (図 8B)。さらに *Alp*、Bone sialoprotein (Integrin binding sialoprotein : *Ibsp*) や Osteocalcin (Bone γ carboxyglutamate protein : *Bglap*) といった多様な骨分化マーカーが、BMP-4 と SHH の共刺激により著しく誘導された (図 8A)。本条件下での ALP 活性を評価したところ、BMP-4 と SHH による協調的な ALP 活性増加作用を認めた (図 8C)。以上から、BMP-4 と SHH により共刺激された MC3T3-E1 細胞は、BMP-4 単独もしくは SHH 単独で刺激された場合と比較して、増殖能には変化がないが、骨芽細胞分化が亢進しており、これにより両因子は造骨性骨転移の形成に重要であると考えられた。

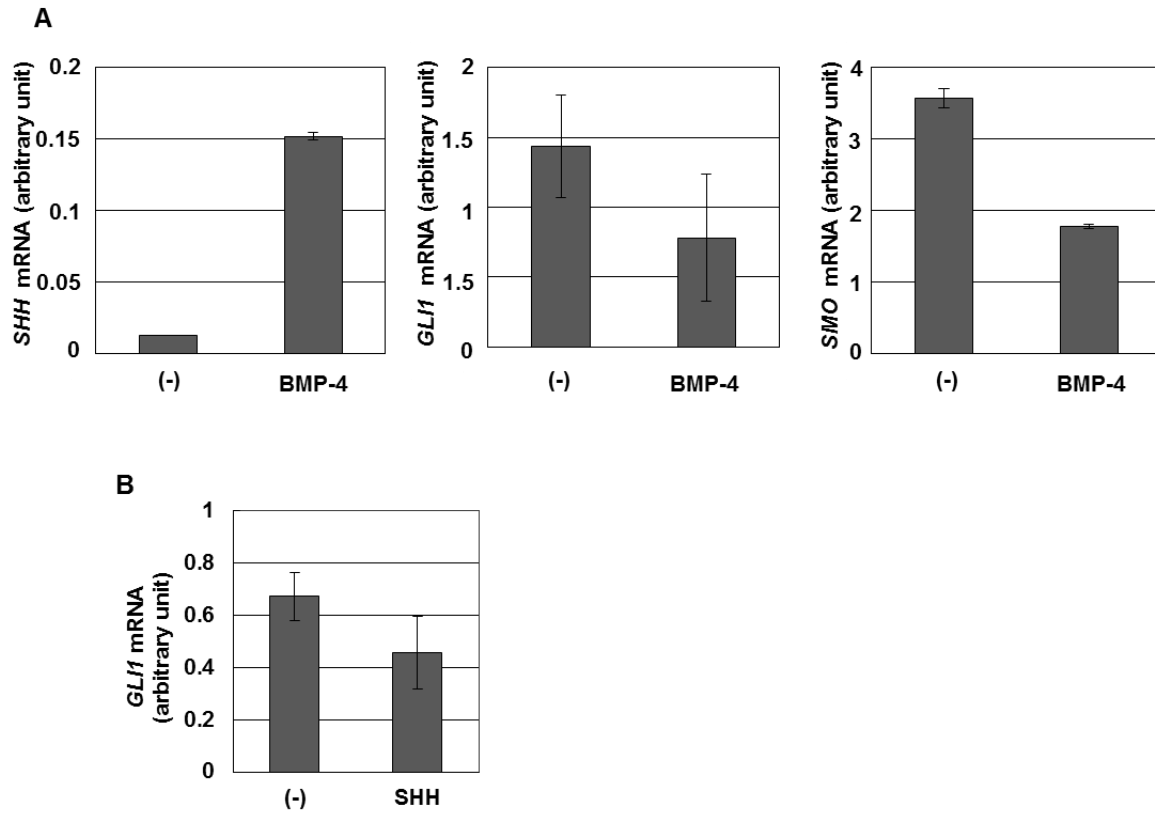


図 7. 前立腺がん細胞の SHH 感受性

(A) BMP-4 を LNCaP 細胞に刺激したときの *SHH*、*GLI1*、*SMO* の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ±SD を表す。

(B) SHH を LNCaP 細胞に刺激したときの *GLI1* の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ±SD を表す。

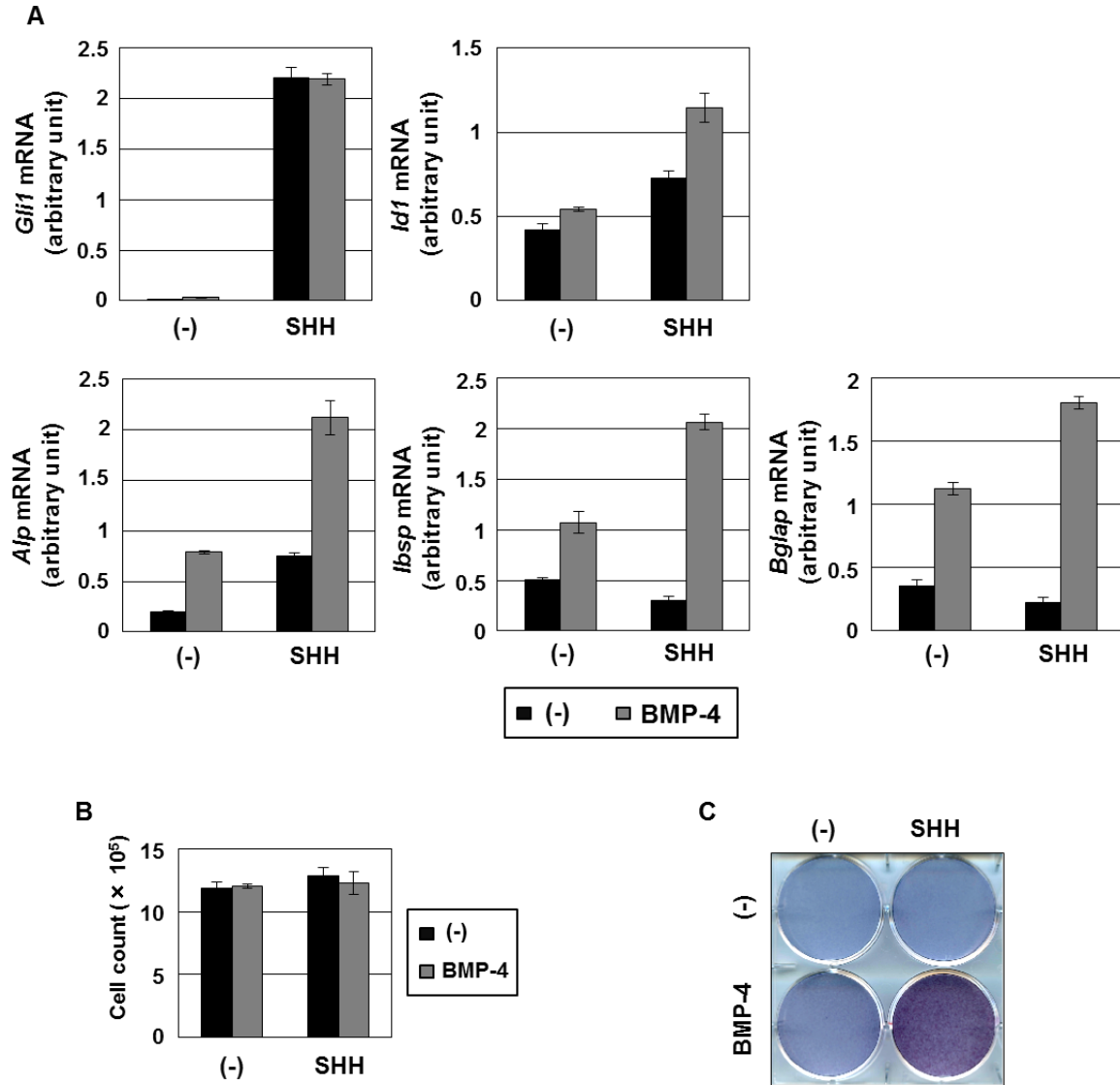


図 8. BMP-4 と SHH による協調的な骨芽細胞分化の亢進作用

(A) BMP-4、SHH を MC3T3-E1 細胞に 72 時間共刺激したときの *Gli1*、*Id1* と各種骨芽細胞分化マーカーの発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

(B) BMP-4、SHH で MC3T3-E1 細胞に 72 時間共刺激したときの細胞数を血球計算盤による計数により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

(C) MC3T3-E1 細胞に BMP-4、SHH で 7 日間共刺激したときの ALP 活性を ALP 染色により評価した。

4-5 BMP と前立腺がん細胞由来 BMP 誘導性 SHH の骨間質細胞分化に対する協調作用

これまでの検証から、造骨性骨転移を示す前立腺がんでは、BMP により誘導される SHH が骨間質細胞の骨芽細胞分化を促進するという仮説を立てるに至り、co-culture 培養系を用いて、本仮説の検証を実施した。今回は、前立腺がん細胞由来の SHH の役割を試験するため、MC3T3-E1 細胞の mono-culture と cell culture insert を用いての LNCaP 細胞との separate co-culture を行った (図 9A)。Separate co-culture において、上層の LNCaP 細胞は BMP-4 に応答して、SHH mRNA の高発現と顕著な SHH タンパク質の分泌を示した (図 9B、8C)。その後、分泌された SHH タンパク質は、cell culture insert の小孔を介して下層に移行し、下層に播種した MC3T3-E1 細胞に作用することが確認された (図 9C)。図 9D に示すように、MC3T3-E1 細胞の増殖は BMP-4 刺激の有無に関わらず、mono-culture でも separate co-culture でも明らかな変化は認められなかった。しかしながら、LNCaP 細胞と separate co-culture で培養した条件において、MC3T3-E1 細胞での *Gli1* mRNA 発現レベルは BMP-4 により著しく増加した (図 10A)。

また、separate co-culture した MC3T3-E1 細胞を BMP-4 刺激したところ、mono-culture 条件下で BMP-4 刺激をしたときよりも、各骨分化マーカー (*Alp*、*Ibsp*、*Bglap*) は、高い発現量を呈した。さらに、MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化を ALP 染色で視覚的に確認したところ、separate co-culture 条件では BMP-4 による MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化促進作用が認められた (図 10B)。

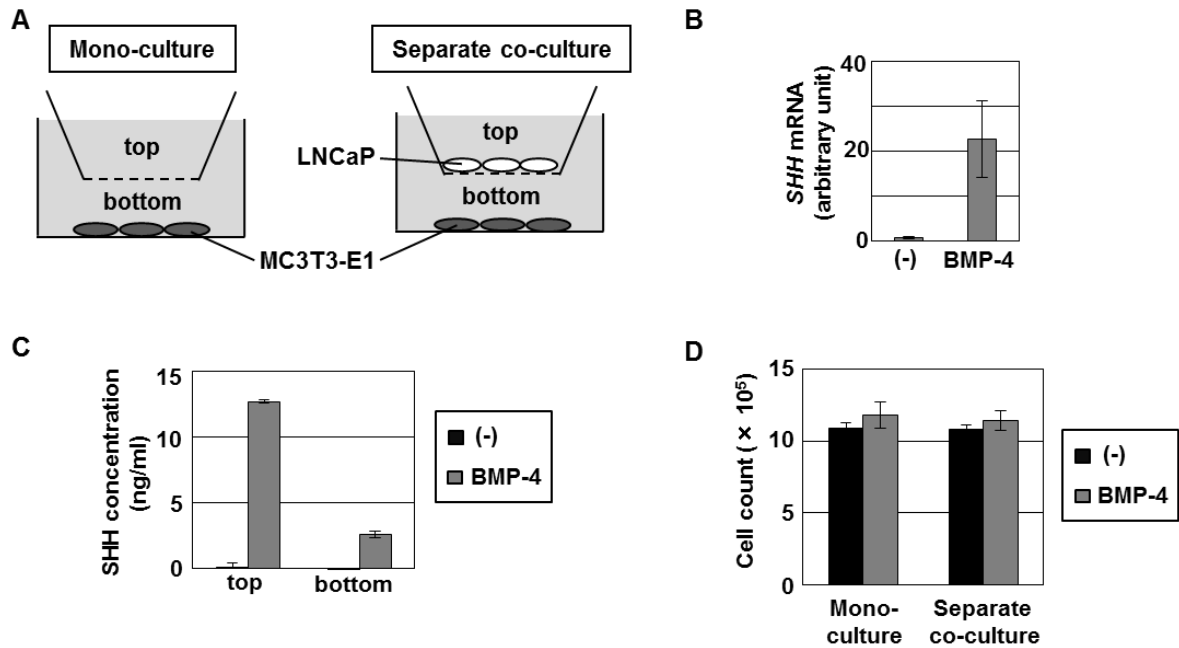


図9. Separate co-culture 条件における前立腺がんと骨間質細胞に対する BMP-4 の作用

(A) Mono-culture と separate co-culture のモデル。Separate co-culture では培養プレート上に MC3T3-E1 細胞を (bottom)、cell insert 上に LNCaP 細胞を播種し (top)、両層の培地に BMP-4 を添加し、7 日間刺激した。

(B) Separate co-culture 条件で BMP-4 を 7 日間刺激したときの top の LNCaP 細胞での *SHH* の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

(C) Separate co-culture 条件で BMP-4 を 7 日間刺激したときの top と bottom の両層内の *SHH* タンパク質の発現を ELISA により定量した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

(D) Mono-culture と separate co-culture 条件で、BMP-4 を 7 日間刺激したときの MC3T3-E1 細胞数を血球計算盤により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

続いて、今回確認された骨間質細胞の骨芽細胞分化における SHH の関与を直接的に確認するために、LNCaP 細胞と MC3T3-E1 細胞を Hh シグナル阻害剤で処理した。LNCaP 細胞と MC3T3-E1 細胞を Hh シグナル阻害剤である SANT-1 や Itraconazol 存在下で、単一ディッシュ内で mixed co-culture により培養し (図 11A)、BMP-4 で処理した後、マウス特異的プライマーを用いた qRT-PCR を行うことで、MC3T3-E1 細胞由来の mRNA の発現量の変化を特異的に定量した。その結果、mixed co-culture 条件における MC3T3-E1 細胞での *Gli1*、*Alp*、*Ibsp* 発現は、BMP-4 により著しい増加が認められた上、この誘導は Hh シグナル阻害剤である SANT-1 や Itraconazol によって劇的に抑制された (図 11B、11C)。また、SANT-1 により LNCaP 細胞が増殖抑制や細胞死を誘導されていないことを、BMP-4 と SANT-1 を LNCaP 細胞単独培養条件で処理することで確認することができている (図 12A)。SANT-1 は LNCaP 細胞数を減少させるのではなく、SHH シグナルを抑制した結果、MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞様分化を抑制していることが示唆された。また separate co-culture 培養系に SANT-1 を処理した ALP 染色の解析からも、BMP-4 存在下での LNCaP 細胞との co-culture による ALP 活性化は、BMP シグナルと SHH シグナルにより協調的に亢進されることが観察された (図 12B)。図 7A において、BMP-4 により LNCaP 細胞から誘導された SHH はオートクライン様式では作用していないことが明らかとなっている。したがって、これらの結果は LNCaP 細胞が BMP に応答して SHH リガンドを産生し、BMP と BMP 誘導性

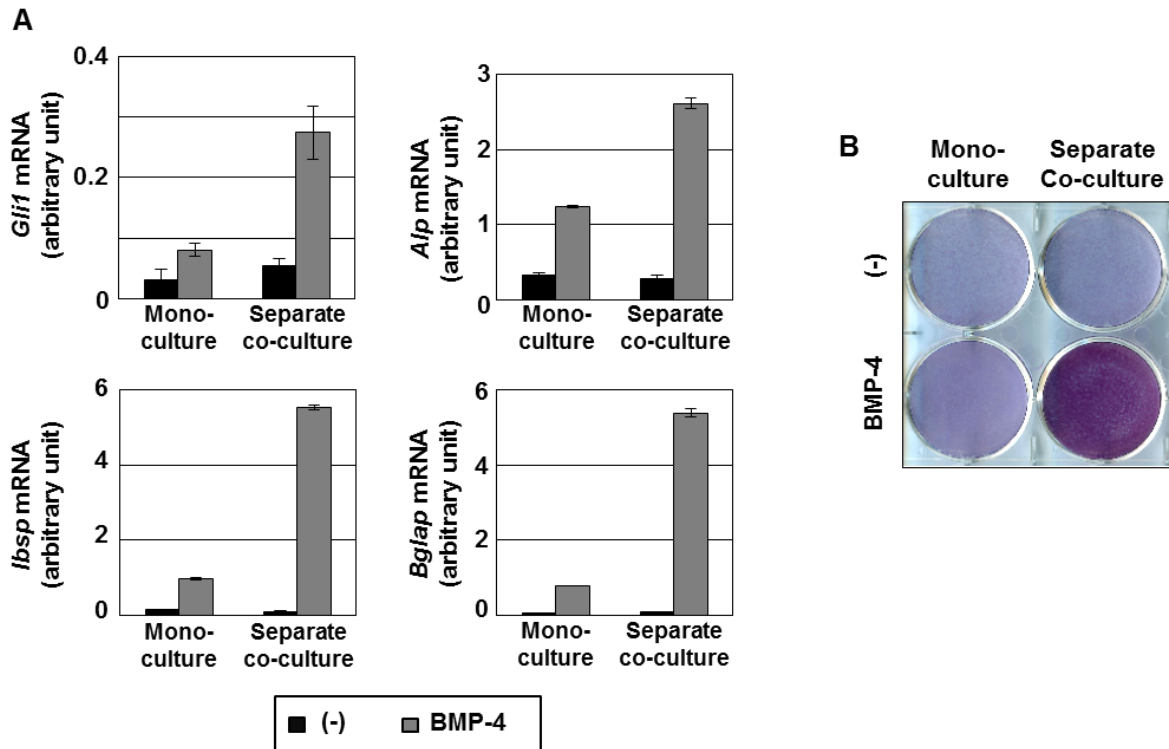


図 10. LNCaP 細胞で誘導された BMP-4 応答性に誘導された SHH と BMP-4 による協調的な骨芽細胞分化の亢進作用

(A) Mono-culture と separate co-culture 条件で BMP-4 を 7 日間刺激したときの MC3T3-E1 細胞での *Gli1* と骨分化マーカーの発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ± SD を表す。

(B) Mono-culture と separate co-culture 条件で BMP-4 を 7 日間刺激したときの MC3T3-E1 細胞での ALP 活性を ALP 染色により評価した。

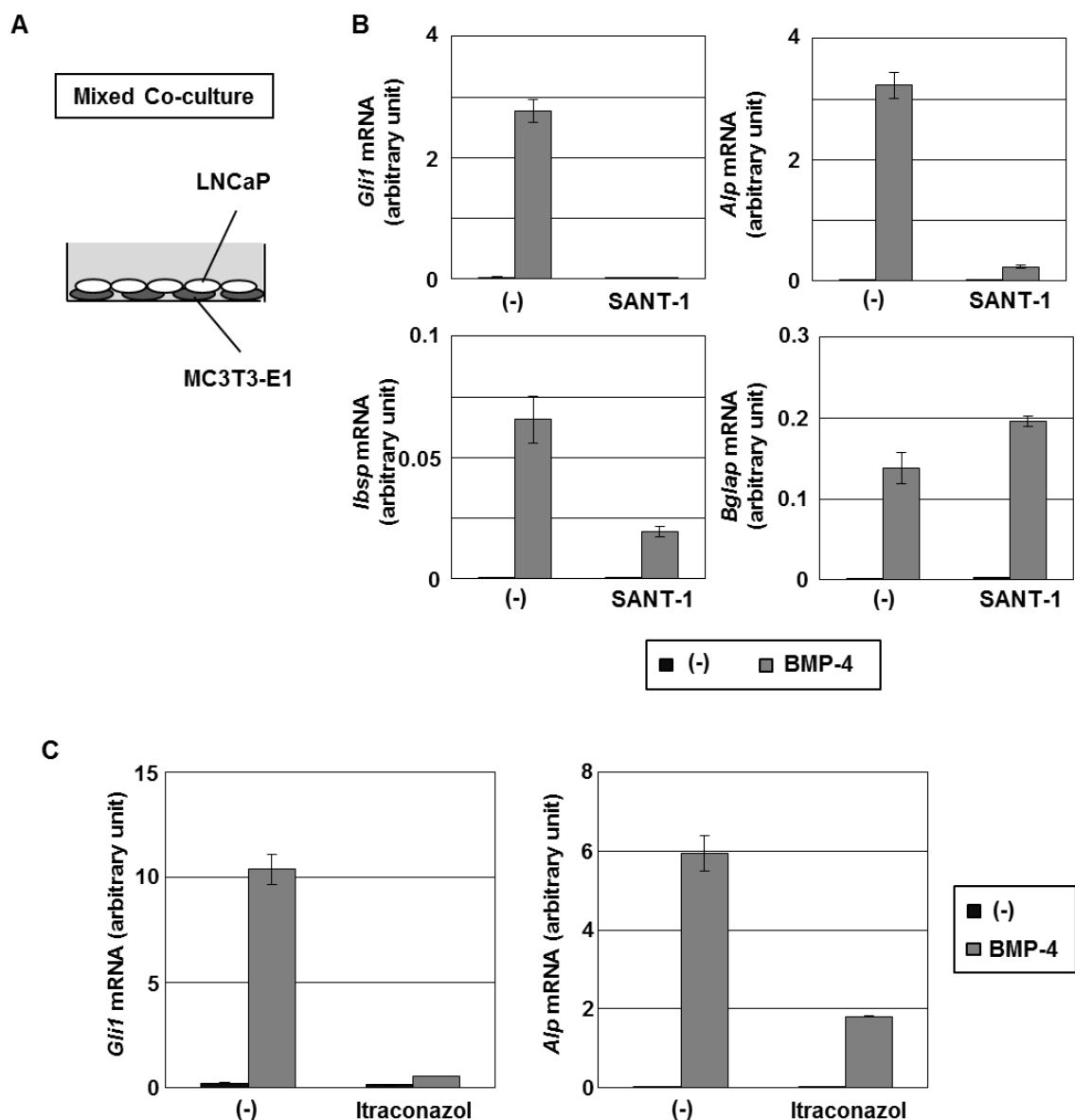


図 11. Mixed co-culture 条件における BMP 誘導性骨芽細胞分化に対する SHH の関与

(A) Mixed co-culture のモデル。培養プレートの同一面上に LNCaP 細胞と MC3T3-E1 細胞を播種し、BMP-4 のみを添加し、72 時間刺激した。

(B) SANT-1 (1 μ M) を前処理しておいた mixed co-culture 条件で BMP-4 を 72 時間刺激したときの、MC3T3-E1 細胞での *Gli1* と骨分化マーカーの発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

(C) Itraconazol (1 μ M) を前処理しておいた mixed co-culture 条件で BMP-4 を 72 時間刺激したときの、MC3T3-E1 細胞での *Gli1* と *Alp* の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

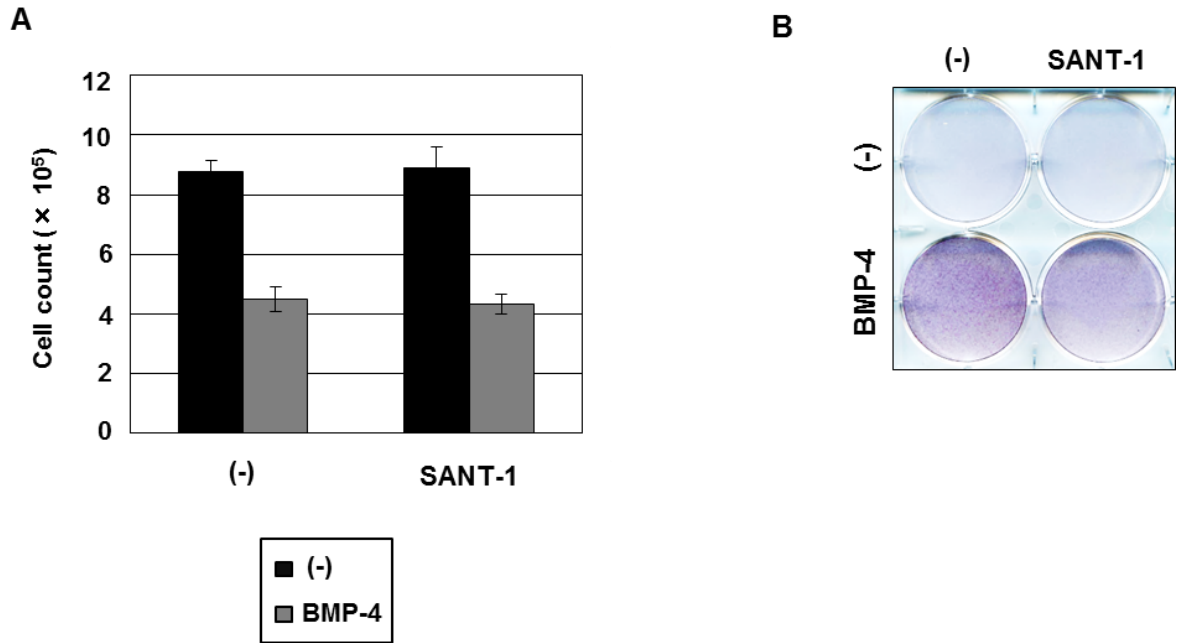


図 12. LNCaP 細胞の増殖に与える SANT-1 の影響と mixed co-culture 条件における ALP 活性

(A) SANT-1 (1 μ M) を前処理しておいた LNCaP 細胞に BMP-4 を 72 時間刺激したときの細胞数を血球計算盤による計数により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

(B) SANT-1 (1 μ M) を前処理しておいた mixed co-culture 条件で BMP-4 を 7 日間刺激したときの ALP 活性を ALP 染色により評価した。

のパラクライン型に作用する SHH が協調して MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化を促進していることを強く示唆した。しかしながら、Mixed co-culture 条件での SANT-1 処理時の *Alp* mRNA の顕著な低下と比較すると、SANT-1 処理時の ALP 活性の減少は僅かであった (図 11、図 12)。 *Alp* mRNA 発現と ALP 活性はしばしば乖離する可能性があることや、LNCaP 細胞が同一ディッシュ上に残存し、染色に何らかの影響を与えているとも考えられた。また、BMP-4 存在下での LNCaP 細胞による *Bglap* の発現誘導は SANT-1 では抑制されておらず (図 11B)、BMP 存在下での LNCaP 細胞による MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化には SHH 以外の因子も関与している可能性も考えられた。

4-6 前立腺がんの増殖に対する BMP 誘導性骨間質細胞由来増殖因子の影響

これまでの検証から、骨間質細胞の造骨性分化に対する前立腺がん細胞と BMP の協調的な効果が明らかとなったが、反対に骨間質細胞が BMP の作用を介して前立腺がんは何らかの協調的な影響を及ぼす可能性があるか mixed co-culture 培養系で検討した。GFP を過剰発現した LNCaP 細胞 (LNCaP-GFP) を、mono-culture もしくは MC3T3-E1 細胞との co-culture 条件で培養し、BMP-4 で刺激した後の GFP 陽性細胞の数を比較することで、co-culture による LNCaP 細胞の増殖能の変化を評価した (図 13A)。BMP-4 は前立腺がんに対し、増殖抑制効果を示すことが知られている (55)。

本実験においても、mono-culture 条件では、BMP-4 による LNCaP 細胞の増殖抑制効果が確認された (図 13B、12C)。他方、LNCaP 細胞を MC3T3-E1 細胞と co-culture した条件では、BMP-4 の増殖抑制効果が消失したのみならず、むしろ BMP-4 は LNCaP 細胞の増殖を促進していた。これらの結果から、BMP 存在下において、MC3T3-E1 細胞は LNCaP 細胞の増殖や生存に寄与していると考えられた。

BMP による細胞増殖の抑制作用や senescence 誘導効果は、様々な Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) の発現誘導を介して生じる (55、56)。そこで、BMP-4 誘導性の CDKI の発現量に対して mixed co-culture が影響を及ぼすかどうか検討した。qRT-PCR により CDKI の発現量を定量したところ、mono-culture 条件下では BMP-4 により Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (*CDKN1A* : p21^{WAF1/CIP1}) や Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (*CDKN2B* : p15^{INK4B}) の発現誘導が認められた一方で、MC3T3-E1 細胞との mixed co-culture 条件では、BMP-4 によるそれら CDKI の発現増加は顕著に抑制されていた (図 14A)。

前立腺がん細胞の増殖や生存は多岐に渡るサイトカインやケモカインに大きく依存している (57-59)。そこで、MC3T3-E1 細胞が BMP-4 に応答して、前立腺がんの増殖にとって不可欠なサイトカインやケモカインを分泌しているという仮説を立てた。これらの因子を同定するため、Insulin-like growth factor-1/2 (IGF1/IGF2)、Platelet-derived growth factor B/C (PDGFB/PDGFC)、Monocyte chemoattractant protein-1

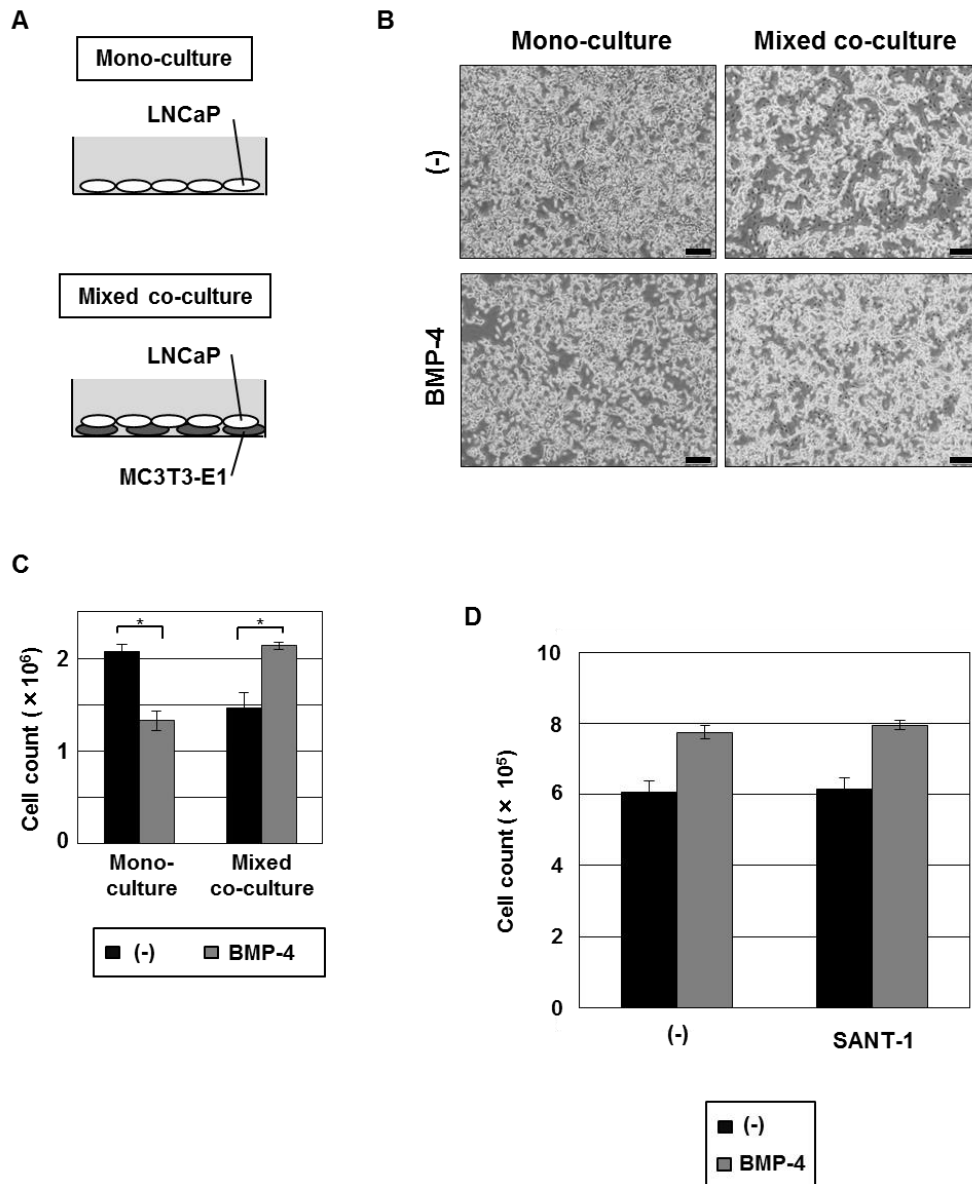


図 13. Mixed co-culture 条件での BMP による前立腺がん細胞の増殖能亢進作用

(A) Mono-culture と mixed co-culture のモデル。培養プレートの同一面上に LNCaP 細胞と MC3T3-E1 細胞を播種し、BMP-4 のみを添加し、72 時間刺激した。

(B、C) Mixed co-culture 条件で BMP-4 を 72 時間刺激したときの LNCaP-GFP 細胞の細胞数を、血球計算盤による GFP 陽性細胞の計数により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。* $P < 0.05$ 。写真中の scale bar は、200 μ m を表す。

(D) SANT-1 (1 μ M) を前処理しておいた mixed co-culture 条件で BMP-4 を 72 時間刺激したときの LNCaP-GFP 細胞の細胞数を、血球計算盤による GFP 陽性細胞の計数により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 \pm SD を表す。

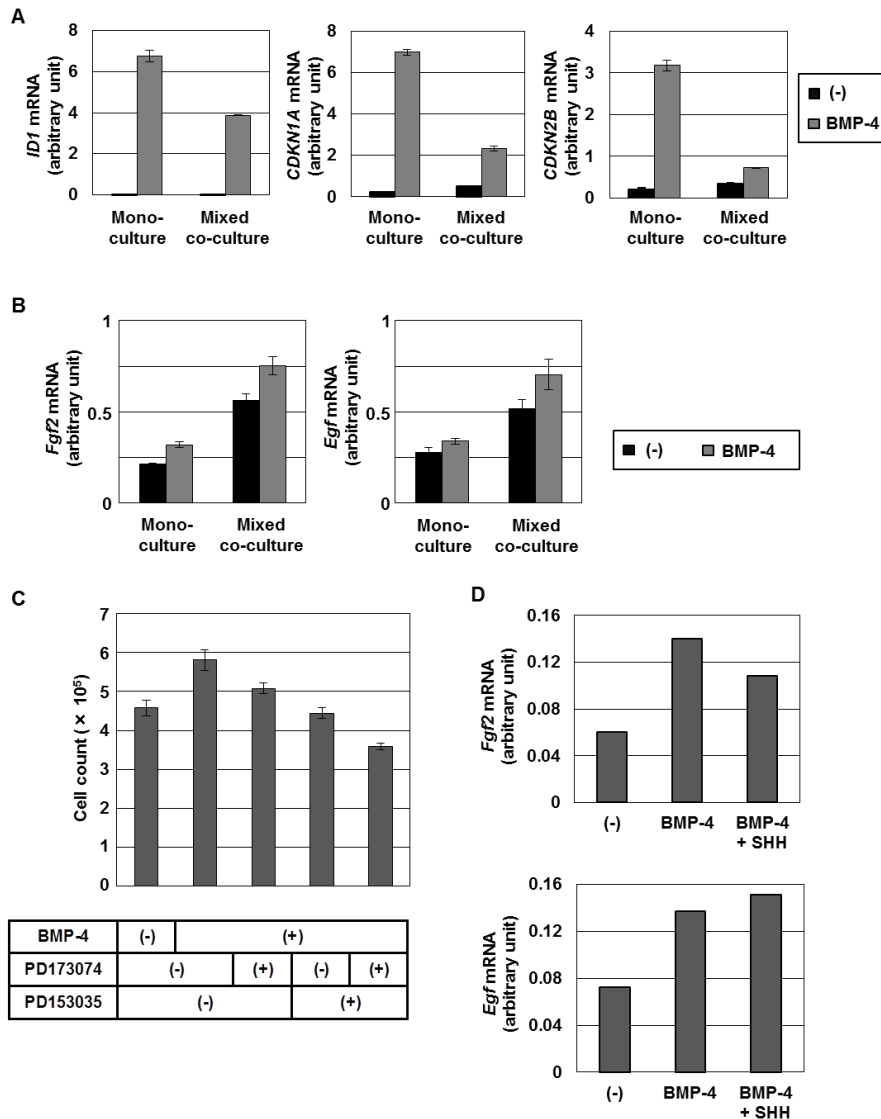


図 14. Mixed co-culture 条件における骨間質細胞での BMP 誘導性増殖因子

(A) Mixed co-culture 条件で BMP-4 を 72 時間刺激したときの、LNCaP 細胞での *ID1* と *CDKN1A*、*CDKN2B* 発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ± SD を表す。

(B) Mixed co-culture 条件で BMP-4 を 72 時間刺激したときの、MC3T3-E1 細胞での *Fgf2* と *Egf* の発現を qRT-PCR により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ± SD を表す。

(C) PD173074 (0.3 μM)、PD153035 (3 μM) を前処理しておいた mixed co-culture 条件で BMP-4 を 72 時間刺激したときの LNCaP-GFP 細胞の細胞数を、血球計算盤による GFP 陽性細胞の計数により評価した。各サンプルを duplicate で測定し、結果は平均値 ± SD を表す。

(D) MC3T3-E1 細胞に BMP-4 と SHH を 72 時間共刺激したときの、MC3T3-E1 細胞での *Fgf2* と *Egf* の発現を qRT-PCR により評価した。

(MCP1)、Endothelin-1 (ET1)、Urokinase-type plasminogen activator (uPA)、Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)、Epidermal growth factor (EGF) の mRNA の発現変化を検討した結果、LNCaP 細胞と BMP-4 の存在時に、特に MC3T3-E1 細胞での *Fgf2* と *Egf* の mRNA 発現レベルの増加が認められた (図 14B)。さらに、BMP-4 と MC3T3-E1 細胞による LNCaP 細胞の増殖に対する協調的な亢進作用は、FGF シグナル阻害剤 PD173074 と EGF シグナル阻害剤 PD153035 によって解除された (図 14C)。以上の結果から、BMP が骨間質細胞からのサイトカインの放出を促進し、骨微小環境における前立腺がん細胞の増殖や生存に寄与している可能性を見出した。なお、BMP-4 誘導性に LNCaP 細胞で産生される SHH が、MC3T3-E1 細胞での FGF-2 と EGF の発現誘導に関与するか検討するため、MC3T3-E1 細胞を BMP-4 と SHH で刺激した。刺激後の MC3T3-E1 細胞での両 mRNA 発現量を qRT-PCR で解析したところ、BMP-4 が両 mRNA の発現を誘導した一方で、BMP-4 と SHH の協調的な発現誘導作用は認められなかった (図 14D)。したがって、MC3T3-E1 細胞における BMP-4 応答性の FGF-2 と EGF の発現誘導には、SHH 以外の LNCaP 細胞由来因子が関与していることが示唆された。

5. 考察

本研究の結果から、前立腺がん細胞と骨間質細胞における BMP を媒介とした新しい相互作用のモデルが想定された。LNCaP 細胞では、BMP は Smad 経路を介して SHH の産生を誘導する (図 15A)。産生された SHH は MC3T3-E1 細胞に作用し、ActR-IIB や Smad1 の発現を誘導することで BMP リガンドに対する感受性や BMP シグナル伝達能を増加させ、骨芽細胞への分化を促進させる。同時に、BMP-4 は MC3T3-E1 細胞にも作用して FGF-2 や EGF といったサイトカインの産生を誘導し、LNCaP 細胞の増殖を亢進させることが示唆された (図 15B)。したがって、前立腺がん細胞と骨間質細胞は、BMP に媒介された相互作用から、お互いの生存や活性に適した環境を提供している可能性が示唆された (図 15C)。

5-1 骨間質細胞の分化に対する前立腺がん細胞の役割とその分子メカニズム

骨転移を発症している前立腺がん患者の血清では、骨特異的な ALP、Bone sialoprotein、Amino-terminal procollagen propeptides of type I collagen (PINP)、Osteoprotegerin (OPG) のような骨芽細胞の分化マーカーの増加が知られている (60)。この知見は、前立腺がん細胞が骨微小環境において骨間質細胞を活性化する多数の因子を分泌している可能性を強く示すものである (1)。また前立腺がん細胞は、ET1 や uPA、Prostate-specific

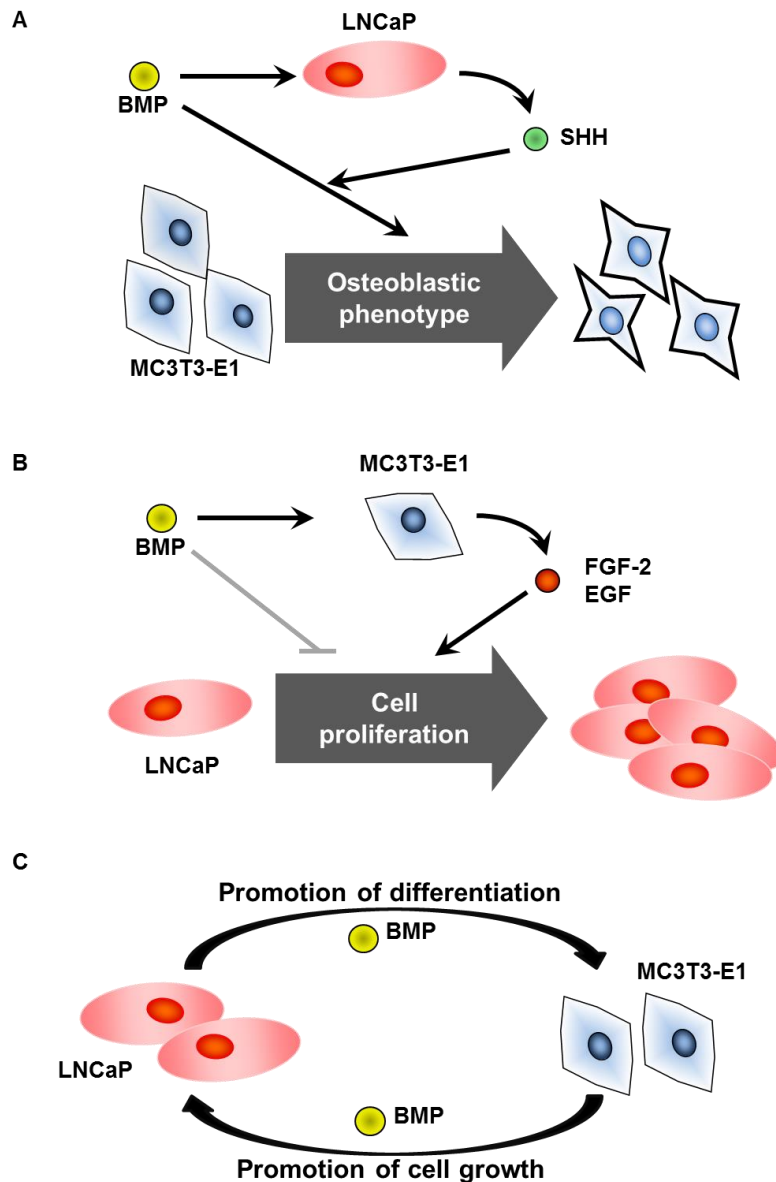


図 15. 骨微小環境における BMP の前立腺がんの生存と骨芽細胞分化誘導作用

(A) 骨間質細胞の分化に対する前立腺がん細胞の役割。BMP は Smad 依存的なシグナル伝達経路を介して、LNCaP 細胞での SHH 産生を誘導する。SHH は MC3T3-E1 細胞の ActR-IIB と Smad1 の発現誘導を介し、MC3T3-E1 細胞の BMP シグナル感受性を亢進させる。MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化は、BMP と BMP によって LNCaP 細胞が分泌する SHH によって協調的に促進される。

(B) 前立腺がん細胞の増殖に対する骨間質細胞の役割。BMP は LNCaP 細胞に増殖抑制作用を示す。ただし、BMP は MC3T3-E1 細胞の FGF-2、EGF 産生を亢進させ、これらのサイトカインが LNCaP 細胞の増殖を促進する。

(C) (A)と(B)から想定される本研究のモデル。BMP は前立腺がん細胞の増殖もしくは生存と骨間質細胞の分化にとって有利な微小環境を提供する。

Antigen (PSA) を産生し、骨芽細胞の生物学的活性を促進することが報告されている (61)。これらのうち、今回の研究では Hh ファミリーに着目した。Hh ファミリータンパク質は胚発達において、脊索、神経管、脳、形成中の脚や胃での極性化活性帯等で発現するのみならず、腸管内胚葉中の膵臓を形成する領域では除去される必要があるなど、組織形成において一時的かつ空間的な制御が必要とされる極めて重要なタンパク質である (62-64)。また、がんの進展においても非常に重要な役割を担うことが知られている。SHH の標的である GLI1 は、ヒト脳腫瘍で発現している遺伝子としてはじめに発見されたが (65、66)、その後の研究で、他の Hh シグナル構成因子 Ptch1 や Smo の変異が基底細胞がん、横紋筋肉腫、脳腫瘍といった多様な悪性腫瘍にて発見された (67)。SHH をはじめとする Hh ファミリーメンバーは、Cyclin D や Cyclin E、N-Myc の制御を介して細胞増殖を亢進させるのみならず、基底細胞がんや膵臓がんでは EMT の誘導ならびに病態の進行にも関与しているため、SHH は腫瘍によってはがん遺伝子として機能していると想定されている (68-71)。今回の研究において、前立腺がんでの SHH の発現は、Smad 依存性シグナルを介して BMP によって誘導されていることがわかった (図 3)。

ヒト SHH を過剰発現させた前立腺がん細胞株によって産生される SHH は、骨間質細胞に作用して Hh シグナルの活性化させ、骨芽細胞への分化を促進することが知られている (72)。BMP ファミリーと Hh ファミリーは多くの臓器で共発現してい

ることが報告されているため、BMP シグナルと Hh シグナル間のシグナルクロストークが、ある種の生理学的・病理学的状態で存在している可能性が示唆される (73)。例えば、発生期中胚葉からの脚形成において、SHH は FGF-4 のみならず BMP-2 の発現を刺激する (74)。またニワトリ胚の未分節中胚葉の軟骨形成においては、SHH は BMP と協調的な造骨作用を示すのみならず、BMP に対する細胞の応答性を変化させる (75)。さらに骨間質細胞を用いた実験では、可溶性の BMPR-IA が SHH による ALP 活性誘導を抑制することが報告されているのみならず、Smad1-Gal4 DNA-binding domain 融合タンパク質を用いた実験から BMP-2 による Smad1 の転写活性化を SHH が促進することが報告されている (76、77)。本研究では、骨間質細胞の骨芽細胞への分化の誘導因子として、BMP のみならず BMP 誘導性に前立腺がん細胞が産生する SHH が関与している可能性を見出した (図 4)。また本研究で用いた co-culture システムにより、BMP と BMP 誘導性 SHH が協調的に骨間質細胞の骨芽細胞分化を亢進させることを明らかにした (図 10)。このようなシグナルクロストークに加え、SHH は *Acvr2b* と *Smad1* の発現ならびに Smad1 のリン酸化を増加させ、骨間質細胞で BMP シグナル伝達の増強因子として機能していることを見出した (図 6)。BMP と SHH の協調作用には Smad を介したクロストーク以外にも報告がある。例えば、BMP は軟骨細胞分化に必須の因子である Sex determining region Y -box 9 (Sox9) の発現や転写活性を誘導するが、Hh シグナルは Sox9 の発現や活性を抑制し、軟骨細胞への分化を抑制

する (78、79)。また、脂肪細胞分化に重要な因子である C/EBP α に対しても同様の報告があり (80、81)、Hh シグナルは C/EBP α の発現や活性を抑制し、BMP による分化の方向性を骨芽細胞に偏らせているとも言える。

IHH と PTHrP の関連が 1996 年に内軟骨性骨化に寄与していることが報告されて以降 (82、83)、Hh シグナルの骨転移への関与が明らかになっている。例えば、Hh シグナルによって誘導される転写因子 GLI2 の発現が乳がん細胞で高発現し、同時に高レベルの PTHrP 分泌が認められ、GLI2 の過剰発現は PTHrP 発現を誘導し、溶骨性の骨転移を促進する (84)。また転写因子 Runx2 は、骨転移の進展に貢献する骨マトリックスタンパクや接着タンパク、Matrix metalloproteinase (MMP) や血管新生因子を直接活性化し、乳がんの骨転移の形成を促進させ、予後不良にも関連しているが、IHH による Runx2 発現誘導を抑制することで乳がん細胞の溶骨性骨転移の形成が減少したという報告もある (85-87)。一方、前立腺がんにおいては、パラクライン様式で作用する SHH シグナルは、Gli1 依存的ではあるが Runx2 非依存的なメカニズムを介して造骨性分化を誘導することが知られている (72)。本研究においても、LNCaP 細胞由来 SHH による Gli1 の発現増加は、MC3T3-E1 細胞では認められるにもかかわらず、LNCaP 細胞では GLI1 の発現は変化していないため、主にパラクライン様式で作用していると考えられた (図 7)。これらの研究成果は、正常の骨組織での恒常性維

持に不可欠なシグナル経路と転写制御が、腫瘍細胞によっても活用化され、骨転移を促進するため利用されていることを示している。

BMP-4 による *SHH* mRNA の転写誘導は、比較的緩やかであり、CHX 処理によりほぼ完全に消失したことから、SHH は BMP の間接的な標的であると考えられた (図 5)。また、LNCaP 細胞に ID1 を強制発現させても *SHH* mRNA の発現は変化しなかったため、ID1 以外の転写因子が関与していると推測される (図 5)。SHH の発現を誘導する転写因子として Jun proto-oncogene (JUN) が報告されている (88)。さらに最近では、miR-602 や miR-608 は *SHH* mRNA を標的とする miRNA であり、miRNA のプロセッシングを行う DGCR8 は SHH の発現を抑制する因子として報告されている (89、90)。今後、BMP-4 による SHH の発現制御に関する詳細な理解のためには、多くの転写因子の関与や、転写産物の安定性等にも言及する必要があると思われる。また作用様式に関する解析では、LNCaP 細胞では、BMP-4 処理による *GLI1* の発現レベルは変動しなかったため (図 7)、LNCaP 細胞が BMP-4 誘導性に産生した SHH は自律的なシグナルとしては機能せずに、主に骨間質細胞へパラクライン様式で作用していると考えられた。LNCaP 細胞由来の BMP-4 誘導性 SHH が、骨間質細胞における BMP シグナル構成因子の発現誘導ならびに BMP シグナルへの感受性の亢進させることを見出したが (図 6)、これはこれまでに知られていない作用であり、造骨性骨転移を示

す前立腺がんの特徴である骨間質細胞の骨芽細胞様細胞への分化の促進を説明する重要な作用であることが示唆された。

5-2 前立腺がん細胞の増殖に対する骨間質細胞の役割とその分子メカニズム

Lang らは 1995 年に、骨芽細胞様細胞からの conditioned medium が前立腺がん細胞の増殖を促進したが、一方で骨髄細胞由来の conditioned medium が前立腺がん細胞の増殖を促進することが出来なかったことを示した (91)。さらに、乳がんなどの他の種類のがん細胞ではその効果が認められなかったことを報告している。これらの報告は、前立腺がんの骨微小環境における増殖が骨間質細胞由来因子に依存している可能性を示唆している (92)。本研究では、前立腺がん細胞に対する骨間質細胞の機能的な役割を、co-culture システムを用いて解析した。BMP は骨微小環境で豊富に存在しており (93)、本研究では BMP の存在下で両細胞の mixed co-culture システムを利用することとした。この結果、LNCaP 細胞の増殖は MC3T3-E1 細胞の存在下で BMP-4 により亢進した (図 13)。Hh シグナルの前立腺がん細胞の増殖への関与も示唆されており、恒常活性化した SMO が Transformed 3T3 cell double minute 2 (MDM2) の p53 への結合を促進することが報告されている (94)。興味深いことに本 co-culture システムにおいては、MC3T3-E1 細胞の有無に関わらず、SANT-1 は LNCaP 細胞の BMP による増殖制御に影響を及ぼさなかったため、SHH は LNCaP 細胞の増殖に関与していないと

考えた (図 13)。他方、標的遺伝子の発現解析から、FGF-2 と EGF が前立腺がんの BMP を介した増殖の促進を説明できる可能性がある候補として同定された (図 14)。EGF は前立腺がんの造骨性転移形成に重要な役割を果たすことが報告されており、EGF シグナル阻害剤により骨転移の形成が抑制されることが報告されている (95、96)。FGF-2 は自然発症前立腺がんマウスモデルにおいてがんの進展に重要な役割を果たすことが示されている (97)。また、FGF-2 は内皮細胞からの VEGF の産生を誘導し、同時に VEGF の生理活性を発揮するために必要な因子としても知られ、FGF-2 と VEGF の両因子を同時に作用させることで相乗的な血管新生作用を示すことが示されている (98-100)。今回の研究では予想に反して、MC3T3-E1 細胞での FGF-2 と EGF の発現誘導には、BMP-4 と SHH の両刺激による相加もしくは相乗的な誘導作用が確認されなかったため (図 14)、SHH 以外の LNCaP 細胞由来因子が、MC3T3-E1 細胞における BMP-4 による FGF-2 と EGF の誘導にとって重要であることが考えられる。本因子の探索ならびに発見により、骨微小環境における前立腺がんの増殖を制御する画期的な機序の解明につながると考えられる。

近年、前立腺がんの進展における BMP シグナルの役割が立証されており、BMP は骨組織への前立腺がん転移の促進因子の一つとして見なされている (22、101-104)。BMP4 mRNA の高発現は、LNCaP 細胞と CWR22 細胞で共通に認められるものではないことから、BMP は骨微小環境から主に由来し、前立腺がん細胞に作用

している可能性がある。今回の研究では、各がん細胞に BMP-4 を 10 ng/ml で刺激する系を主に使用した (図 4A)。BMP の刺激を行う際はその濃度を慎重に判断する必要があるが、脱灰したヒト骨マトリックス内では BMP-4 の濃度が 5.45 ± 2.04 ng/g (単位脱灰骨マトリックス中の BMP-4 濃度) であり、また BMP-9 の血中濃度は 2-12 ng/ml であると報告されていることから (105、106)、今回の刺激条件は、生理的条件から大きくは乖離しておらず、ヒト前立腺がん患組織内で生じているシグナル伝達と符合するものと言える。前立腺がんでの BMP アンタゴニスト Noggin の過剰発現は、マウスモデルでの骨転移を抑制したことが知られている (107)。実際に本研究において、BMP-4 は MC3T3-E1 細胞の存在下で LNCaP 細胞の増殖を促進していた (図 13)。しかしながら、BMP-4 は骨間質細胞の非存在下では、LNCaP 細胞の増殖を抑制することは注目すべきことである (図 13)。2005 年に Yang らは、前立腺がんに対する BMP-7 の多彩な生理学的効果を報告した (108)。BMP-2 と BMP-4 は LNCaP 細胞に対し、p21^{WAF1/CIP1} の発現誘導と G1 期細胞周期停止作用を示すことが知られており、mono-culture 条件での本研究の結果を支持するものである (109)。また、BMP-2 は低濃度の FBS 培養条件下で去勢抵抗性前立腺がん細胞に対して細胞増殖抑制効果をもつことが知られている (31)。これらの知見は、がんの進展において、BMP が腫瘍進展効果と腫瘍抑制効果の二面的な作用を持つことを示唆する重要な結果である。一方、本研究においては、骨間質細胞の存在下で BMP-4 は前立腺がんの増殖を促進したた

め、BMP シグナルの抑制は、前立腺がんの骨転移に対する有用な治療法である可能性を示唆することができた (図 13)。このとき、BMP-4 による p21^{WAF1/CIP1} や p15^{INK4B} の発現の増加が抑制されていたことは、骨間質細胞の存在下での前立腺がん増殖亢進の一因と考えられる (図 14)。

がん細胞は、がんの種類によって特定の臓器に選択的に転移する傾向があるが、この臓器嗜好性 (“Organ tropism”) を説明するいくつかのモデルが提唱されている。Bastou 静脈叢などの関連を考慮すると、“Anatomical mechanical theory” は、前立腺がんの骨嗜好性を説明するモデルのひとつとして重要であると思われる (110)。一方、本研究では、前立腺がん細胞と骨間質細胞が BMP を介して一連の相互作用していることを示したが、BMP と SHH の一連のクロストークは、臓器選択性を説明するもうひとつのモデルであり、がんの転移の成立はがん細胞の増殖に適した微小環境を有する臓器にのみ可能とする “Seed and soil theory” を支持しているとも解釈できる (111)。どちらか一方のモデルだけで臓器嗜好性を説明することは困難であることも明らかになっており (112)、両方のモデルで説明されるメカニズムが複雑に絡み合い、転移臓器の決定ならびに転移先でのがん細胞の血管外漏出、生着、生存ならびに増殖を介して転移性腫瘍を形成していると予想された。

前述したように、BMP や、前立腺がん細胞で BMP 応答性に誘導された SHH は、胚発生において重要な機能を有していることも解明されている (113、114)。BMP-4

は、原腸形成や中胚葉形成に関与し、*Bmp4* 欠損マウス胚が E6.5 - E9.5 で胎生致死であることから、**BMP-4** は胚発達に不可欠であることは明らかである (115)。このような胚発達において機能する発生シグナル伝達経路が、発がんや EMT、転移といったがんの進展において、非常に重要な役割を果たしていることが認められている (116)。治療後の再発や転移に関連するがん幹細胞への関与も示唆されていることから考えると (117)、がん細胞は、胚発達やパターン形成のシグナルを利用して、多能性の維持や EMT 可塑性のような発生の表現型を示すことで、血管内漏出から遠隔組織でのコロニー形成に至る転移の形成における困難な多段階ステップを克服しているかもしれない (118)。また、がん細胞自身の環境適応のための可塑性獲得といった形質変換のみならず、転移組織の微小環境を変換し、自らの生存や増殖に適した環境を作製可能ながん幹細胞を作出するための利点を供給している可能性も考えられる。骨転移の病態発現における発生シグナル経路の関与の詳細な分子メカニズムの理解により、新たな標的分子の同定につながるかもしれない。

本研究で得られた知見のように、がん細胞に対する BMP の効果は、がん細胞の周囲を取り巻く微小環境により変化する可能性があるが、前立腺がんの進展における BMP の役割の解明のためには、さらなる研究が必要となるだろう。特に本研究はがん細胞を用いた *in vitro* での検証にとどまっており、今後、前立腺がんの *in vivo* 骨転移モデルによる実験病理学的な解析、さらに臨床検体を用いた病理組織学的解析な

どを併用することで、前立腺がんの進展における **BMP** シグナルの意義を多角的に検証する必要があると考えられた。この解明により、がん治療の観点からも **BMP** を含めた **TGF- β** ファミリーを標的とした治療法の開発が進んでいくことが期待される。現在、**TGF- β** 阻害剤は、抗がん剤をはじめとした様々な分野で進められており、転移抑制作用も期待されている (119-121)。**BMP** 阻害剤は、2008 年に Yu らのグループによって **Dorsomorphin** の研究がなされた (122)。また、**Dorsomorphin** の誘導体として、**LDN-193189** や **DM-3189** が **BMP type I receptor** を特異的に強力に阻害する阻害剤として見出されている (122-124)。これらの阻害剤は、進行性骨化性線維形成異常症 (**Fibrodysplasia ossificans progressive : FOP**) の治療薬としての検証が先行しているが、今後、がんにおける **BMP** シグナル伝達の寄与が検証されていくことで、がん治療にも貢献できることも期待される (125)。最後に、本研究は **BMP** や **SHH** シグナルを標的にする治療法が、前立腺がんの造骨性骨転移の治療に有効であり、多くの前立腺がん患者の **QOL** の改善に貢献できる可能性を示唆するものである。

6. 結語

- ◆ BMP-4 による SHH 発現誘導は、造骨性骨転移を示す前立腺がん細胞に特異的な制御機構であり、Smad 依存的なシグナル伝達による。
- ◆ SHH は、MC3T3-E1 細胞の BMP シグナル構成因子である ActR-IIIB と Smad1 の誘導を介して BMP シグナルの感受性を亢進させている。
- ◆ BMP-4 と SHH により共刺激された MC3T3-E1 細胞は、各々単独で刺激された場合と比較して、骨芽細胞様に分化した表現型を獲得する。
- ◆ BMP-4 存在下での LNCaP 細胞による MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化の促進作用は、BMP-4、SHH が関与している。
- ◆ BMP-4 は骨間質細胞からのサイトカインの放出を刺激することで、骨微小環境における前立腺がん細胞の増殖や生存に貢献している。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、多大な御指導、御鞭撻を賜りまし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の宮園浩平教授に厚く御礼申し上げます。また、研究全般において、終始御指導、御助言を頂きました分子病理学分野の江幡正悟特任准教授に心から御礼申し上げます。本研究の進行において御助言頂きました分子病理学分野の勝野蓉子特任助教に深く感謝致します。本研究で使用したプラスミドをいただきました理研バイオリソースセンター細胞運命情報解析技術開発サブチームの三好浩之博士に深く御礼申し上げます。研究遂行にあたり、多くの御支援をいただき、研究面から日常生活に至るまで大変お世話になりました分子病理学分野の皆様から心から感謝申し上げます。

最後に、温かく見守り、支えてくださった家族に深く感謝致します。

8. 参考文献

1. Ibrahim, T., Flamini, E., Mercatali, L., Sacanna, E., Serra, P., and Amadori, D. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer* 116, 1406-1418 (2010)
2. Schulman, K. L., and Kohles, J. Economic burden of metastatic bone disease in the U.S. *Cancer* 109, 2334-2342 (2007)
3. Mundy, G. R. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 2, 584-593 (2002)
4. Roodman, G. D. Mechanisms of bone metastasis. *N. Engl. J. Med.* 350, 1655-1664 (2004)
5. Lim, P. K., Bliss, S. A., Patel, S. A., Taborga, M., Dave, M. A., Gregory, L. A., Greco, S. J., Bryan, M., Patel, P. S., and Rameshwar, P. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. *Cancer Res.* 71, 1550-1560 (2011)
6. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, RY., and Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890 (2009)
7. Turley, E. A., Veiseh, M., Radisky, D. C., and Bissell, M. J. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition--does cellular plasticity fuel neoplastic progression?

- Nat. Clin. Pract. Oncol. 5, 280-290 (2008)
8. Moustakas, A., and Heldin, C. H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* 98, 1512-1520 (2007)
 9. Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., and Wang, E. A. Novel regulators of bone formation; Molecular clones and activities. *Science* 141, 1528-1534 (1998)
 10. Kallioniemi, A. Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genet.* 205, 267-277 (2012)
 11. Katagiri, T., Suda, T., and Miyazono, K. The bone morphogenetic proteins. In: Derynck R, Miyazono K, eds. *The TGF- β Family*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 121-146 (2008)
 12. Miyazono, K., Kamiya, Y., and Morikawa, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem.* 147, 35-51 (2010)
 13. Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9, 49-61 (1998)
 14. Shi, Y., Hata, A., Lo, R.S., Massagué, J., and Pavletich, N.P. A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 388, 87-93 (1997)

15. Wu, G., Chen, Y. G., Ozdamar, B., Gyuricza, C. A., Chong, P. A., Wrana, J. L., Massagué, J., and Shi, Y. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287, 92-97 (2000)
16. Morikawa, M., Koinuma, D., Tsutsumi, S., Vasilaki, E., Kanki, Y., Heldin, C. H., Aburatani, H., and Miyazono, K. ChIP-seq reveals cell typespecific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res.* 39, 8712-8727 (2011)
17. Miyazono, K., Maeda, S., and Imamura, T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF- β superfamily and Runx proteins. *Oncogene* 23, 4232-4237 (2004)
18. Nishimura, R., Hata, K., Matsubara, T., Wakabayashi, M., and Yoneda, T. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signaling and transcription factors. *J. Biochem.* 151, 247-254 (2012)
19. Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F. M., Haydon, R. C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H. H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., Szatkowski, J. P., Park, J. Y., and He, T. C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A, 1544-1552 (2003)
20. Kamiya, N., and Mishina, Y. New insights on the roles of BMP signaling in bone-A

- review of recent mouse genetic studies. *Biofactors* 37, 75-82 (2011)
21. Matzuk M. M., Kumar T. R., and Bradley, A. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374, 356-360 (1995)
 22. Ehata, S., Yokoyama, Y., Takahashi, K., and Miyazono, K. Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer: another molecular Jekyll and Hyde? *Pathol. Int.* 63, 287-296 (2013)
 23. Davis, H., Raja, E., Miyazono, K., Tsubakihara, Y., and Moustakas, A. Mechanisms of action of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 27, 81-92 (2016)
 24. Hamdy, F. C., Autzen, P., Robinson, M. C., Horne, C. H., Neal, D. E., and Robson, C. N. Immunolocalization and messengerRNA expression of bone morphogenetic protein-6 in human benign and malignant prostatic tissue. *Cancer Res.* 57, 4427-4431 (1997)
 25. Masuda, H., Fukabori, Y., Nakano, K., Takezawa, Y., CSuzuki, T., and Yamanaka, H. Increased expression of bone morphogenetic protein-7 in bone metastatic prostate cancer. *Prostate* 54, 268-274 (2003)
 26. Grimsrud, C. D., Romano, P. R., D'Souza, M., Puzas, J. E., Schwarz, E. M., Reynolds, P. R., Roiser, R. N., and O'Keefe, R. J. BMP signaling stimulates chondrocyte

- maturation and the expression of Indian hedgehog. *J. Orthop. Res.* 19, 18-25 (2001)
27. Zhang, D., Schwarz, E. M., Rosier, R. N., Zuscik, M. J., Puzas, J. E., and O'Keefe, R. J. ALK2 functions as a BMP type I receptor and induces Indian hedgehog in chondrocytes during skeletal development. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1593-1604 (2003)
28. Seki, K., and Hata, A. Indian hedgehog gene is a target of the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 18544–18549 (2004)
29. Katoh, Y., and Katoh, M. Hedgehog target genes: Mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant Hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.* 9, 873-886 (2009)
30. Xing, F., Okuda, H., Watabe, M., Kobayashi, A., Pai, S.K., Liu, W., Pandey, P.R., Fukuda, K., Hirota, S., Sugai, T., Wakabayashi, G., Koeda, K., Kashiwaba, M., Suzuki, K., Chiba, T., Endo, M., Mo, Y.Y., and Watabe, K. Hypoxia-induced Jagged2 promotes breast cancer metastasis and self-renewal of cancer stem-like cells. *Oncogene* 29, 4075-4086 (2011)
31. Miyazaki, H., Watabe, T., Kitamura, T., and Miyazono, K. BMP signals inhibit proliferation and in vivo tumor growth of androgen-insensitive prostate carcinoma cells. *Oncogene* 23, 9326-9335 (2004)
32. Cheng, L., Sun, J., Pretlow, T. G., Culp, J., and Yang, N. S. CWR22 xenograft as an ex

- vivo human tumor model for prostate cancer gene therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 607-611 (1996)
33. Nagano, Y., Koinuma, D., Miyazawa, K., and Miyazono, K. Context- dependent regulation of the expression of c-Ski protein by Arkadia in human cancer cells. *J. Biochem.* 147, 545-554 (2010)
34. Sagawa, M., Nakazato, T., Uchida, H., Ikeda, Y., and Kizaki, M. Cantharidin induces apoptosis of human multiple myeloma cells via inhibition of the JAK/STAT pathway. *Cancer Sci.* 99, 1820-1826 (2008)
35. Ehata, S., Hanyu, A., Fujime, M., Katsuno, Y., Fukunaga, E., Goto, K., Ishikawa, Y., Nomura, K., Yokoo, H., Shimizu, T., Ogata, E., Miyazono, K., Shimizu, K., and Imamura, T. Ki26894, a novel transforming growth factor- β type I receptor kinase inhibitor, inhibits in vitro invasion and in vivo bone metastasis of a human breast cancer cell line. *Cancer Sci.* 98, 127-133 (2007)
36. Hoshino, Y., Katsuno, Y., Ehata, S., and Miyazono, K. Autocrine TGF- β protects breast cancer cells from apoptosis through reduction of BH3-only protein, Bim. *J. Biochem.* 149, 55-65 (2011)
37. Ehata, S., Hanyu, A., Hayashi, M., Aburatani, H., Kato, Y., Fujime, M., Saitoh, M., Miyazawa, K., Imamura, T., and Miyazono, K. Transforming growth factor- β

- promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer Res.* 67, 9694-9703 (2007)
38. Kamiya, Y., Miyazono, K., and Miyazawa, K. Smad7 inhibits transforming growth factor- β family type I receptors through two distinct modes of interaction. *J. Biol. Chem.* 285, 30804-30813 (2010)
39. Ehata, S., Johansson, E., Katayama, R., Koike, S., Watanabe, A., Hoshino, Y., Katsuno, Y., Komuro, A., Koinuma, D., Kano, M. R., Yashiro, M., Hirakawa, K., Aburatani, H., Fujita, N., and Miyazono, K. Transforming growth factor- β decreases the cancer-initiating cell population within diffuse-type gastric carcinoma cells. *Oncogene* 30, 1693-1705 (2011)
40. Nemeth, J. A., Harb, J. F., Barroso, U. Jr., He, Z., Grignon, D. J., and Cher, M. L. Severe combined immunodeficient-hu model of human prostate cancer metastasis to human bone. *Cancer Res.* 59, 1987-1993 (1999)
41. Ma, G., Yu, J., Xiao, Y., Chan, D., Gao, B., Hu, J., He, Y., Guo, S., Zhou, J., Zhang, L., Gao, L., Zhang, W., Kang, Y., Cheah, K.S., Feng, G., Guo, X., Wang, Y., Zhou, C.Z., and He, L. Indian hedgehog mutations causing brachydactyly type A1 impair Hedgehog signal transduction at multiple levels. *Cell Res.* 21, 1343-1357 (2011)
42. Andersen, C., Bagi, C. M., and Adams, S. W. Intra-tibial injection of human prostate

- cancer cell line CWR22 elicits osteoblastic response in immunodeficient rats. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 3, 148-155 (2003)
43. Thalmann, G.N., Anezinis, P.E., Chang, S.M., Zhau, H.E., Kim, E.E., Hopwood, V.L., Pathak, S., von Eschenbach, A.C., and Chung, L.W. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res.* 54, 2577-2581 (1994)
44. Zhang, J., Dai, J., Qi, Y., Lin, D.L., Smith, P., Strayhorn, C., Mizokami, A., Fu, Z., Westman, J., and Keller, E.T. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J. Clin. Invest.* 107, 1235-1244 (2001)
45. Wu, T.T., Sikes, R.A., Cui, Q., Thalmann, G.N., Kao, C., Murphy, C.F., Yang, H., Zhau, H.E., Balian, G., and Chung, L.W. Establishing human prostate cancer cell xenografts in bone: induction of osteoblastic reaction by prostate-specific antigen-producing tumors in athymic and SCID/bg mice using LNCaP and lineage-derived metastatic sublines. *Int. J. Cancer* 77, 887-94 (1998)
46. Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., and Nohe, A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* 23, 609-620 (2011)
47. Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K., and Taga, T. BMP2-induced

- apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J. Biol. Chem.* 275, 17647-17652 (2000)
48. Otani, H., Otsuka, F., Inagaki, K., Takeda, M., Miyoshi, T., Suzuki, J., Mukai, T., Ogura, T., and Makino, H. Antagonistic effects of bone morphogenetic protein-4 and -7 on renal mesangial cell proliferation induced by aldosterone through MAPK activation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 292, F1513-F1525 (2007)
49. Dvorak, Z.1., Vrzal, R., Henklova, P., Jancova, P., Anzenbacherova, E., Maurel, P., Svecova, L., Pavek, P., Ehrmann, J., Havlik, R., Bednar, P., Lemr, K., and Ulrichova, J. JNK inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 75, 580-588 (2008)
50. Andrieux, L., Langouët, S., Fautrel, A., Ezan, F., Krauser, J.A., Savouret, J.F., Guengerich, F.P., Baffet, G., and Guillouzo, A. Aryl hydrocarbon receptor activation and cytochrome P450 1A induction by the mitogen-activated protein kinase inhibitor U0126 in hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 65, 934-943 (2004)
51. Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., and Cohen, P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297-315 (2007)

52. Mukhopadhyay, A., Krishnaswami, S.R., Cowing-Zitron, C., Hung, N.J., Reilly-Rhoten, H., Burns, J., and Yu, B.D. Negative regulation of Shh levels by Kras and Fgfr2 during hair follicle development. *Dev. Biol.* 373, 373-382 (2013)
53. Linial, M., Gunderson, N., and Groudine, M. Enhanced transcription of c-myc in bursal lymphoma cells requires continuous protein synthesis. *Science* 230, 1126-1132 (1985)
54. Swarbrick, A., Akerfeldt, M.C., Lee, C.S., Sergio, C.M., Caldon, C.E., Hunter, L.J., Sutherland, R.L., and Musgrove, E.A. Regulation of cyclin expression and cell cycle progression in breast epithelial cells by the helix-loop-helix protein Id1. *Oncogene* 381-389 (2005)
55. Haudenschild, D. R., Palmer, S. M., Moseley, T. A., You, Z., and Reddi, A. H. Bone morphogenetic protein (BMP)-6 signaling and BMP antagonist noggin in prostate cancer. *Cancer Res.* 64, 8276-8284 (2004)
56. Brubaker, K. D., Corey, E., Brown, L. G., and Vessella, R. L. Bone morphogenetic protein signaling in prostate cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.* 91, 151-160 (2004)
57. Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Radmayr, C., Hittmair, A., Zhang, J., Thurnher, M., Bartsch, G., and Klocker, H. Regulation of prostatic growth and function by peptide growth factors. *Prostate* 28, 392-405 (1996)

58. Sherwood, E. R., Van Dongen, J. L., Wood, C. G., Liao, S., Kozlowski, J. M., and Lee, C. Epidermal growth factor receptor activation in androgen-independent but not androgen-stimulated growth of human prostatic carcinoma cells. *Br. J. Cancer* 77, 855-861 (1998)
59. Hatziapostolou, M., Polytarchou, C., Katsoris, P., Courty, J., and Papadimitriou, E. Heparin affin regulatory peptide/pleiotrophin mediates fibroblast growth factor 2 stimulatory effects on human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* 281, 32217-32226 (2006)
60. Jung, K., Lein, M., Stephan, C., Von Hösslin, K., Semjonow, A., Sinha, P., Loening, S. A., and Schnorr, D. Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications. *Int. J. Cancer* 111, 783-791 (2004)
61. Achbarou, A., Kaiser, S., Tremblay, G., Ste-Marie, L. G., Brodt, P., Goltzman, D., and Rabbani, S. A. Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo. *Cancer Res.* 54, 2372-2377 (1994)
62. Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T. M., and Dodd, J. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the

- notochord. *Cell* 76, 761-775 (1994)
63. Odenthal, J., van Eeden, F. J., Haffter, P., Ingham, P. W., and Nusslein-Volhard, C.
Two distinct cell populations in the floor plate of the zebrafish are induced by different pathways. *Dev. Biol.* 219, 350-363 (2000)
64. Apelqvist, A., Ahlgren, U., and Edlund, H. Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr. Biol.* 7, 801-804 (1997)
65. Pasca di Magliano, M., and Hebrok, M. Hedgehog signaling in cancer formation and maintenance. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 903-911 (2003)
66. Kinzler, K. W., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Trent, J. M., Law, M. L., O'Brien, S. J., Wong, A. J., and Vogelstein, B. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236, 70-73 (1987)
67. Varjosalo, M., and Taipale, J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 22, 2454-2472 (2008)
68. Duman-Scheel, M., Weng, L., Xin, S., and Du, W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 417, 299-304 (2002)
69. Hatton, B.A., Knoepfler, P.S., Kenney, A.M., Rowitch, D.H., de Alboran, I.M., Olson, J.M., and Eisenman, R.N. N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res.* 66, 8655-8661

(2006)

70. Thayer, S. P., di Magliano, M. P., Heiser, P. W., Nielsen, C. M., Roberts, D. J., Lauwers, G. Y., Qi, Y. P., Gysin, S., Fernández-del Castillo, C., Yajnik, V., Antoniu, B., McMahon, M., Warshaw, A. L., and Hebrok, M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 851-856 (2003)
71. Feldmann, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C., Jimeno, A., Gabrielson, K. L., Matsui, W., and Maitra, A. Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res.* 67, 2187-2196 (2007)
72. Zunich, S. M., Douglas, T., Valdovinos, M., Chang, T., Bushman, W., Walterhouse, D., Iannaccone, P., and Lamm, M. L. Paracrine sonic hedgehog signalling by prostate cancer cells induces osteoblast differentiation. *Mol. Cancer* 8, 12 (2009)
73. Bitgood, M. J., and McMahon, A. P. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 172, 126-138 (1995)
74. Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A., and Tabin, C. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate

- growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 79, 993-1003 (1994)
75. Murtaugh, L. C., Chyung, J. H., and Lassar, A. B. Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes Dev.* 13, 225-237 (1999)
76. Yuasa, T., Kataoka, H., Kinto, N., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Iemura, S., Ueno, N., Shibata, Y., Kurosawa, H., and Yamaguchi, A. Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J. Cell. Physiol.* 193, 225-232 (2002)
77. Spinella-Jaegle, S., Rawadi, G., Kawai, S., Gallea, S., Faucheu, C., Mollat, P., Courtois, B., Bergaud, B., Ramez, V., Blanchet, A. M., Adelmant, G., Baron, R., and Roman-Roman, S. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J. Cell Sci.* 114, 2085-2094 (2001)
78. Hojo, H., Ohba, S., Taniguchi, K., Shirai, M., Yano, F., Saito, T., Ikeda, T., Nakajima, K., Komiyama, Y., Nakagata, N., Suzuki, K., Mishina, Y., Yamada, M., Konno, T., Takato, T., Kawaguchi, H., Kambara, H., and Chung, U.I. Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J. Biol. Chem.* 288, 9924-9932 (2013)

79. Hojo, H., Ohba, S., Yano, F., Saito, T., Ikeda, T., Nakajima, K., Komiyama, Y., Nakagata, N., Suzuki, K., Takato, T., Kawaguchi, H., and Chung, U.I. Gli1 protein participates in Hedgehog-mediated specification of osteoblast lineage during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.* 287, 17860-17869 (2012)
80. Bächner, D., Ahrens, M., Schröder, D., Hoffmann, A., Lauber, J., Betat, N., Steinert, P., Flohé, L., and Gross, G. Bmp-2 downstream targets in mesenchymal development identified by subtractive cloning from recombinant mesenchymal progenitors (C3H10T1/2). *Dev. Dyn.* 213, 398-411 (1998)
81. Spinella-Jaegle, S., Rawadi, G., Kawai, S., Gallea, S., Faucheu, C., Mollat, P., Courtois, B., Bergaud, B., Ramez, V., Blanchet, A.M., Adelmant, G., Baron, R., and Roman-Roman, S. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation. *J. Cell Sci.* 114, 2085-2094 (2001)
82. Lanske, B., Karaplis, A. C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L. H., Ho, C., Mulligan, R. C., Abou-Samra, A. B., Jüppner, H., Segre, G. V., and Kronenberg, H. M. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273, 663-666 (1996)
83. Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M., and Tabin, C. J.

- Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273, 613-622 (1996)
84. Sterling, J. A., Oyajobi, B. O., Grubbs, B., Padalecki, S. S., Munoz, S. A., Gupta, A., Story, B., Zhao, M., and Mundy, G. R. The hedgehog signaling molecule Gli2 induces parathyroid hormone-related peptide expression and osteolysis in metastatic human breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 7548-7553 (2006)
85. Pratap, J., Wixted, J. J., Gaur, T., Zaidi, S. K., Dobson, J., Gokul, K. D., Hussain, S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., and Lian, J. B. Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells. *Cancer Res.* 68, 7795-7802 (2008)
86. Bellahcene, A., Menard, S., Bufalino, R., Moreau, L., and Castronovo, V. Expression of bone sialoprotein in primary human breast cancer is associated with poor survival. *Int. J. Cancer* 69, 350-353 (1996)
87. Sharp, J. A., Waltham, M., Williams, E. D., Henderson, M. A., and Thompson, E. W. Transfection of MDA-MB-231 human breast carcinoma cells with bone sialoprotein (BSP) stimulates migration and invasion in vitro and growth of primary and secondary tumors in nude mice. *Clin. Exp. Metastasis* 21, 19-29 (2004)
88. Hung, H.A., Sun, G., Keles, S., and Svaren, J. Dynamic regulation of Schwann cell

- enhancers after peripheral nerve injury. *J. Biol. Chem.* 290, 6937-6950 (2015)
89. Akhtar, N., Makki, M.S., and Haqqi, T.M. MicroRNA-602 and microRNA-608 regulate sonic hedgehog expression via target sites in the coding region in human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* 67, 423-434 (2015)
90. Lin, H.P., Oksuz, I., Hurley, E., Wrabetz, L., and Awatramani, R. Microprocessor complex subunit DiGeorge syndrome critical region gene 8 (*Dgcr8*) is required for schwann cell myelination and myelin maintenance. *J. Biol. Chem.* 290, 24294-24307 (2015)
91. Lang, S. H., Miller, W. R., and Habib, F. K. Stimulation of human prostate cancer cell lines by factors present in human osteoblast-like cells but not in bone marrow. *Prostate* 27, 287-293 (1995)
92. Fizazi, K., Yang, J., Peleg, S., Sikes, C. R., Kreimann, E. L., Daliani, D., Olive, M., Raymond, K. A., Janus, T. J., Logothetis, C. J., Karsenty, G., and Navone, N. M. Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. *Clin. Cancer Res.* 9, 2587-2597 (2003)
93. Anderson, H. C., Hodges, P. T., Aguilera, X. M., Missana, L., and Moylan, P. E. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate,

- metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 1493-1502 (2000)
94. Abe, Y., Oda-Sato, E., Tobiume, K., Kawauchi, K., Taya, Y., Okamoto, K., Oren, M., and Tanaka, N. Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 4838-4843 (2008)
95. Lu, X., and Kang, Y. Epidermal growth factor signalling and bone metastasis. *Br. J. Cancer* 102, 457-461 (2010)
96. Kim, S. J., Uehara, H., Karashima, T., Shepherd, D. L., Killion, J. J., and Fidler, I. J. Blockade of epidermal growth factor receptor signaling in tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of androgenindependent human prostate cancer growing in the bone of nude mice. *Clin. Cancer Res.* 9, 1200-1210 (2003)
97. Polnaszek, N., Kwabi-Addo, B., Peterson, L. E., Ozen, M., Greenberg, N. M., Ortega, S., Basilico, C., and Ittmann, M. Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Res.* 63, 5754-5760 (2003)
98. Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., Shapiro, R. L., Galloway, A. C., Rifkin, D. B., and Mignatti, P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the

- endothelial cells of forming capillaries: An autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J. Cell Biol.* 141, 1659-1673 (1998)
99. Jonca, F., Ortega, N., Gleizes, P. E., Bertrand, N., and Plouet, J. Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 272, 24203-24209 (1997)
100. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 824-831 (1992)
101. Dai, J., Keller, J., Zhang, J., Lu, Y., Yao, Z., and Keller, E. T. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res.* 65, 8274-8285 (2005)
102. Feeley, B. T., Gamradt, S. C., Hsu, W. K., Liu, N., Krenek, L., Robbins, P., Huard, J., and Lieberman, J. R. Influence of BMPs on the formation of osteoblastic lesions in metastatic prostate cancer. *J. Bone Miner. Res.* 20, 2189-2199 (2005)
103. Buijs, J. T., Rentsch, C. A., van der Horst, G., van Overveld, P. G., Wetterwald, A., Schwaninger, R., Henriquez, N. V., Ten Dijke, P., Borovecki, F., Markwalder, R., Thalmann, G. N., Papapoulos, S. E., Pelger, R. C., Vukicevic, S., Cecchini, M. G., Löwik, C. W., and van der Pluijm, G. BMP7, a putative regulator of epithelial

- homeostasis in the human prostate, is a potent inhibitor of prostate cancer bone metastasis in vivo. *Am. J. Pathol.* 171, 1047-1057 (2007)
104. Morrissey, C., Brown, L. G., Pitts, T. E., Vessella, R. L., and Corey, E. Bone morphogenetic protein 7 is expressed in prostate cancer metastases and its effects on prostate tumor cells depend on cell phenotype and the tumor microenvironment. *Neoplasia* 12, 192-205 (2010)
105. Pietrzak, W.S., Woodell-May, J.E., and McDonald, N.M. Assay of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 in human demineralized bone matrix. *J. Craniofac. Surg.* 17, 84-90 (2006)
106. David, L., Mallet, C., Keramidis, M., Lamandé, N., Gasc, J.M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J.J., and Bailly, S. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.* 102, 914-922 (2008)
107. Hogan, B. L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10, 1580-1594 (1996)
108. Yang, S., Zhong, C., Frenkel, B., Reddi, A. H., and Roy-Burman, P. Diverse biological effect and Smad signaling of bone morphogenetic protein 7 in prostate tumor cells. *Cancer Res.* 65, 5769-5777 (2005)
109. Brubaker, K. D., Corey, E., Brown, L. G, and Vessella, R. L. Bone morphogenetic

- protein signaling in prostate cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.* 91, 151-160 (2004)
110. Langley, R. R., and Fidler, I. J. The seed and soil hypothesis revisited--the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer.* 128, 2527-2535 (2011)
111. Paget, S. Distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet* 133, 571-573 (1889)
112. Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Schrag, D., Boer, R., Winawer, S. J., Habbema, J. D., and Zauber, A. G. How much can current interventions reduce colorectal cancer mortality in the U.S.? Mortality projections for scenarios of risk-factor modification, screening, and treatment. *Cancer* 107, 1624-1633 (2006)
113. Feeley, B. T., Krenek, L., Liu, N., Hsu, W. K., Gamradt, S. C., Schwarz, E. M., Huard, J., and Lieberman, J. R. Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone* 38, 154-166 (2006)
114. Zhao, G. Q. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35, 43-56 (2003)
115. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., and Hogan, B. L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9, 2105-2116 (1995)

116. Kelleher, F. C., Fennelly, D., and Rafferty, M. Common critical pathways in embryogenesis and cancer. *Acta. Oncol.* 45, 375-388 (2006)
117. Lombardo, Y., Scopelliti, A., Cammareri, P., Todaro, M., Iovino, F., Ricci-Vitiani, L., Gulotta, G., Dieli, F., de Maria, R., and Stassi, G. Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. *Gastroenterology* 140, 297-309 (2011)
118. Tantivejkul, K., Kalikin, L. M., and Pienta, K. J. Dynamic process of prostate cancer metastasis to bone. *J. Cell. Biochem.* 91, 706-717 (2004)
119. Akhurst, R. J., and Hata, A. Targeting the TGF- β signaling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 790-811 (2012)
120. Zhong, Z., Carroll, K. D., Policarpio, D., Osborn, C., Gregory, M., Bassi, R., Jimenez, X., Prewett, M., Liebisch, G., Persaud, K., Burtrum, D., Wang, S., Surguladze, D., Ng, S., Griffith, H., Balderes, P., Doody, J., Schwartz, J. D., Youssoufian, H., Rowinsky, E. K., Ludwig, D. L., Witte, L., Zhu, Z., and Wu, Y. Anti-transforming growth factor beta receptor II antibody has therapeutic efficacy against primary tumor growth and metastasis through multieffects on cancer, stroma, and immune cells. *Clin. Cancer Res.* 16, 1191-1205 (2008)
121. Yang, Y. A., Dukhanina, O., Tang, B., Mamura, M., Letterio, J. J., MacGregor, J., Patel,

- S. C., Khozin, S., Liu, Z. Y., Green, J., Anver, M. R., Merlino, G., and Wakefield, L. M. Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J. Clin. Invest.* 109, 1607-1615 (2002)
122. Yu, P. B., Hong, C. C., Sachidanandan, C., Babitt, J. L., Deng, D. Y., Hoyng, S. A., Lin, H. Y., Bloch, K. D., and Peterson, R. T. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat. Chem. Biol.* 4, 33-41 (2008)
123. Cuny, G. D., Yu, P. B., Laha, J. K., Xing, X., Liu, J. F., Lai, C. S., Deng, D. Y., Sachidanandan, C., Bloch, K. D., and Peterson, R. T. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 4388-4392 (2008)
124. Boergemann, J. H., Kopf, J., Yu, P. B., and Knaus, P. Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1802-1807 (2010)
125. Lee, Y. C., Cheng, C. J., Bilen, M. A., Lu, J. F., Satcher, R. L., Yu-Lee, L. Y., Gallick, G. E., Maity, S. N., and Lin, S. H. BMP4 promotes prostate tumor growth in bone through osteogenesis. *Cancer Res.* 71, 5194-5203 (2011)