

論文の内容の要旨

論文題目 前立腺がんにおける BMP シグナルの機能解析

氏名 西 森 光

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しばしば造骨性の特徴的な像を示す。骨転移をもつ前立腺がん患者の **quality of life** の著しい低下と医療費の増大などの影響から、骨転移の進展機序の解明が急務であるが、この過程に関わる分子メカニズムは十分には解明されていない。

骨転移形成の過程において、がん細胞と骨微小環境は **Bone morphogenetic protein (BMP)** を含む多様な液性因子を介して互いに相互作用する。BMP は **Transforming growth factor- β (TGF- β)** ファミリーに属し、骨・軟骨形成の誘導など、様々な生物学的活性を示すサイトカインである。一方、前立腺がんの進展にも BMP が寄与していることが示唆されており、骨転移組織において BMP の発現亢進が報告されている。BMP を介した骨形成の制御機構が作用することで、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、本研究では前立腺がん細胞と骨間質細胞の相互作用における BMP の役割を解明することを試みた。

まず、骨形成に重要な役割を担っている **Hedgehog (Hh)** のがん細胞での発現が BMP により制御されているかしらべた。前立腺がん細胞 LNCaP ないし CWR22、乳がん細胞 MDA-MB-231、多発性骨髄腫細胞 U266 で BMP-4 によって Hh ファミリーの遺伝子の発現が誘導されるか、**quantitative real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR)** で検討した。その結果、BMP-4 が前立腺がん細胞特異的に Hh ファミリーである **Sonic Hedgehog (SHH)** を mRNA レベルで誘導することを見出した。また、**Enzyme-linked immunosorbent assay** から、前立腺がん細胞培養上清中の SHH タンパクの発現が BMP-4 によって亢進することも認めた。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。

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を行った。qRT-PCR では、BMP-4、BMP-6、BMP-9 の各 BMP は SHH mRNA の発現量を用量依存的に増加させたが、TGF- β 3 や Activin A は SHH を誘導することができなかった。内在性の Smad4 を

siRNA によりノックダウンすることで、BMP-4 誘導性の SHH 発現が顕著に抑制された。一方で、Smad 非依存的な BMP シグナル伝達経路を担う各種キナーゼ (JNK、ERK、p38 MAPK、Akt) に対する阻害剤では、BMP-4 による SHH 発現誘導を抑制することは出来なかった。また *de novo* タンパク質合成阻害剤 Cycloheximide により、BMP-4 による SHH の発現誘導は顕著に抑制された。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と考えられた。

次に、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 により応答するレポーター活性の増強が認められた。MC3T3-E1 細胞で発現している BMP シグナル構成因子のうち、Smad1 と Acvr2b の発現が SHH により増加することが qRT-PCR から確認された。Immunoblotting によるタンパク質レベルでの発現量解析においても、Smad1 タンパク質発現の増加、BMP-4 による Smad1 の C 末端領域のリン酸化の増強が明らかとなった。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 Smad1 と Acvr2b 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。

さらに、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、骨分化マーカーの発現を qRT-PCR で評価した。BMP-4 による Id1 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、Alkaline phosphatase (Alp) 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。ALP 染色では BMP-4 と SHH の協調的な ALP 活性増加作用も認めたが、MC3T3-E1 細胞の増殖能に顕著な変化は認めなかった。以上から、BMP-4 と SHH により共刺激された MC3T3-E1 細胞は、それぞれの単独刺激と比較して骨芽細胞分化が亢進していたため、両因子が協調的に作用することが造骨性骨転移の形成に重要であると考えられた。

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 培養系を用いてこれを検証した。Cell culture insert を用いた LNCaP 細胞と MC3T3-E1 細胞の separate co-culture 実験系において、上層の LNCaP 細胞は BMP-4 に応答して SHH タンパク質の分泌し、これが下層に播種した MC3T3-E1 細胞に作用し *Gli1* mRNA の発現が誘導される。この *Gli1* の発現誘導は mono-culture 条件下で BMP-4 刺激をしたときよりも、顕著であった。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 細胞を単一ディッシュ内で培養した mixed co-culture 条件にお

いて Hh シグナル阻害剤を処理したところ、BMP-4 による MC3T3-E1 細胞での骨分化マーカーの発現誘導は、Hh シグナル阻害剤によって劇的に抑制された。Separate co-culture 実験系でも、Hh 阻害剤による ALP 染色強度の減弱が観察された。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 誘導性の 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。

最後に、骨間質細胞が BMP の作用を介して前立腺がんには何らかの生物学的影響を及ぼす可能性があるか検討した。LNCaP 細胞を mono-culture 条件で培養したところ、BMP-4 による LNCaP 細胞の増殖抑制効果が確認された。他方、LNCaP 細胞を MC3T3-E1 細胞と mixed co-culture した条件では、BMP-4 による増殖抑制効果が消失したのみならず、むしろ BMP-4 は LNCaP 細胞の増殖を促進させた。Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) の発現量を qRT-PCR により定量したところ、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 LNCaP 細胞で認められた一方で、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。また LNCaP 細胞と BMP-4 の存在時に、MC3T3-E1 細胞で Fibroblast growth factor (Fgf)-2 と Epidermal growth factor (Egf) の mRNA 発現レベルの増加が認められた。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 シグナル阻害剤と EGF シグナル阻害剤によって緩和された。これらの結果から、BMP が骨間質細胞からの FGF-2 や EGF など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。

以上の結果より、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。BMP は骨転移の中心的な役割を果たす因子の一つであることから、BMP やその標的遺伝子である SHH などの骨転移制御機構の詳細な解明により、前立腺がんの造骨性骨転移の治療法の開発に貢献できることが期待された。