論文の内容の要旨

論文題目　　新規大腸がん治療標的分子としての BMP-4 の機能解析
氏名　横山　雄一郎

大腸がんは、罹患率世界第 3 位、死亡率世界第 4 位のがんである。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の併用が必要となる。近年では様々な分子標的薬が使用されるようになり、大腸がんの治療成績は向上してきている。しかし、転移を有する大腸がんの予後は未だ不良であり、新たな分子標的薬の開発が望まれている。本研究では、大腸がんの内因性の bone morphogenetic protein 4 (BMP-4)シグナルが新たな治療標的になり得ることを明らかにした。

まず NCI-60 の cell line panel を再解析した結果、BMP の各アイソフォームの中で、大腸がん細胞では *BMP4* の発現が亢進していることが判明した。加えて、NCBI の GEO datasets の再解析により、Stage II の大腸がん患者において *BMP4* 発現は独立した予後不良因子であることがわかった。手術検体を用いた免疫組織化学染色でも、付随する正常粘膜組織と比較して大腸がん組織では 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た。さらに大腸がん細胞株を用いた enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)等による *in vitro* の解析でも、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がわかった。

次に、大腸がんにおいて *BMP4* の発現が亢進する機序について調べた。大腸がんでは発がん過程において、adenomatous polyposis coli (*APC*)遺伝子に変異がおき、Wnt/β-catenin シグナルが亢進していることが知られている。大腸がん細胞、膵臓がん細胞において、small interfering RNA (siRNA)を用いて catenin beta 1 (*CTNNB1*、β-catenin)を knockdown すると、*BMP4* の発現、そして BMP-4 タンパクの発現も低下した。逆に膵臓がん細胞に Wnt-3a を添加すると *BMP4* の発現も上昇した。また一部の細胞では Wnt/β-catenin シグナル伝達の重要な転写因子である T cell transcription factor 4 (TCF4)が *BMP4* の enhancer region に結合することが想定されており、この結合の可能性を chromatin immunoprecipitation (ChIP) quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR)にて評価した。この結果、膵臓がん細胞において Wnt-3a の添加により TCF4 の結合が増強し、大腸がん細胞において、*CTNNB1* を knockdown することで TCF4 の結合が減弱した。以上より、大腸がん細胞では活性化した Wnt/β-catenin シグナルにより *BMP4* の発現が直接的に制御されていることが示唆された。

大腸がん細胞が分泌している BMP-4 が、大腸がんの進展に与える影響を調べるために、short hairpin RNA (shRNA)を用いて *BMP4* の knockdown 株を作成した。これを BALB/c *nu/nu* マウスの皮下に移植し腫瘍増殖能を調べたところ、BMP-4 を knockdown した大腸がん細胞では、腫瘍増

殖能が低下した。そこで、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。この作用が apoptosis 誘導に起因するものか、TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL) assay、Western blot により解析した。TUNEL assay では、*BMP4* の knockdown により TUNEL 陽性細胞が増加した。また Western blot では、*BMP4* の knockdown により poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の cleavage が亢進した。以上より、大腸がん細胞が分泌する BMP-4 を介した内因性のシグナルを阻害すると、大腸がん細胞に apoptosis が誘導され、細胞増殖速度が減弱することが示唆された。

次に、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。大腸がん細胞に LDN-193189 を添加すると、Smad1/5 のリン酸化が減弱し、BMP シグナルの標的遺伝子である *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の BMP シグナルを阻害する活性があることが示された。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。また、TUNEL 陽性細胞が増加し、PARP の cleavage も亢進した。以上より、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。なお、これらの結果は、BMP シグナルを特異的に阻害する noggin によっても再現されており、LDN-193189 の非特異的な作用ではなく、BMP シグナル阻害によるものであると想定された。

大腸がん細胞において BMP 阻害剤が apoptosis を誘導する分子メカニズムを解明するために、RNA sequencing にて網羅的な解析を行った。その結果、大腸がん細胞では LDN-193189 投与により発現が上昇する mRNA 群の ontology に“inactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity”が含まれており、その遺伝子の多くが dual specificity phosphatase (DUSP) family 遺伝子であった。その中で特に *DUSP5* の発現が最も高く、かつ LDN-193189 による発現上昇も最も顕著であったため、以降の解析では *DUSP5* に焦点をあてた。DUSP5 は核内の MAPK の phosphatase であり、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (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。すると、p38 MAPK のリン酸化や c-Jun N-terminal kinase (JNK) MAPK のリン酸化は、解析した大腸がん細胞間で一定した変動を認めなかったものの、LDN-193189、noggin の投与により、全ての大腸がん細胞で Erk MAPK のリン酸化が減弱した。以上より、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。

さらに *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。*DUSP5* を knockdown すると無血清下において LDN-193189 による apoptosis の誘導が減弱し、Erk MAPK のリン酸化の減弱も消失した。逆に、lentivirus vector を用いて大腸がん細胞に *DUSP5* を強制発現させると、無血清下で apoptosis が誘導され、Erk MAPK のリン酸化も減弱した。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)阻害剤を添加すると、apoptosis が誘導されることがわかった。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。

以上の結果を踏まえて、BMP 阻害剤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、LDN-193189 を用いて検討した。*Ex vivo* bioassay にて、BALB/c *nu/nu* マウスに腹腔内投与された LDN-193189 が血液中に活性を有する状態で存在していることを確認した上で、LDN-193189 が *in vivo* で大腸がん細胞の腫瘍増殖に与える影響を検討した。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。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。

以上の結果から、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、内因性の BMP シグナルが活性化していることがわかった。大腸がん細胞の生存には、この活性化した内因性の BMP シグナルによる *DUSP5* の発現低下を介した Erk MAPK の活性化が重要であり、これを標的とする LDN-193189 などの BMP 阻害剤は、新たな大腸がんの分子標的薬になり得ると考えられた。