［課程－２］

審査の結果の要旨

氏名　横山　雄一郎

本研究では、大腸がんが自己分泌する bone morphogenetic protein (BMP)を同定し、その詳細な機能解析を行った上で、大腸がんに対する新たな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ものであり、下記の結果を得ている。

1.　NCI-60 cell line panel の再解析の結果、大腸がんでは種々の BMP リガンドの中で *BMP4* の発現が高いことが示された。また、GEO datasets (GSE14333)の再解析の結果、*BMP4* の発現は Stage II の大腸がんにおいて予後不良因子であった。手術検体を用いた免疫組織学的検討では、正常粘膜と比較し、大腸がん組織では、BMP-4 の発現が亢進しており、Smad1/5 のリン酸化も亢進していた。*In vitro* の解析でも、大腸がん細胞は、BMP-4 を自己分泌していることが示された。

2.　大腸がん細胞、膵臓がん細胞において、β-catenin を knockdown すると、*BMP4* の発現が低下した。また膵臓がん細胞において、Wnt-3a を添加すると、*BMP4* の発現が上昇した。次に、TCF4 の *BMP4* の enhancer region への結合を chromatin immunoprecipitation (ChIP) quantitative real-time reverse transcription PCR にて確認したところ、Wnt-3a の添加で結合が増強し、β-catenin の knockdown にて結合が減弱した。以上より、*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ことが示された。

3.　大腸がん細胞において、BMP4 を knockdown すると、マウスの皮下腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖能が阻害された。*In vitro* で、BMP4 を knockdown すると、無血清下で大腸がん細胞の増殖が抑制された。TdT-mediated dUTP-X nick end labeling (TUNEL) assay、Western blot にて、BMP4 の knockdown は無血清下で大腸がん細胞に apoptosis を誘導することが示された。以上より、大腸がん細胞が自己分泌する BMP-4 は大腸がん細胞の生存に重要であることが示された。

4.　BMP の阻害剤が、BMP4 の knockdown と同様に大腸がん細胞に apoptosis を誘導し得るかどうかを検討した。I 型受容体の阻害剤である LDN-193189 と BMP antagonist の noggin を無血清下で大腸がん細胞に添加すると、大腸がん細胞の apoptosis が誘導された。以上より、BMP 阻害剤は、大腸がん細胞に apoptosis を誘導し、大腸がん治療に有用である可能性が示唆された。

5.　BMP 阻害剤が、大腸がん細胞に apoptosis を誘導する分子メカニズムを解明するため、RNA sequencing を行った。その結果、BMP シグナルによって負に制御される遺伝子として DUSP5 が抽出された。DUSP5 は、extracellular signal-regulated kinase 1/2

(Erk) mitogen-activated protein kinase (MAPK)に特異的な phosphatase である。DUSP5 を knockdown すると、LDN-193189 の大腸がん細胞に対する apoptosis 誘導作用が減弱した。また、その際に Erk のリン酸化の減弱も消失した。逆に DUSP5 を強制発現させると、大腸がん細胞に apoptosis が誘導され、Erk のリン酸化も減弱した。最後に、MEK inhibitor を用いて、Erk MAPK を抑制すると、大腸がん細胞に apoptosis が誘導された。以上より、LDN-193189 によって誘導される apoptosis は、DUSP5 の発現上昇を介した、Erk MAPK の脱リン酸化によってもたらされることが示唆された。

6. LDN-193189 の *in vivo* での抗腫瘍効果を検討するため、マウスの皮下腫瘍モデルにおいて、LDN-193189 を腹腔内投与し、腫瘍増殖能を評価した。その結果、LDN-193189 の投与により腫瘍増殖が抑制された。更には、免疫組織学染色により、LDN-193189 投与群の腫瘍では、腫瘍細胞の Smad1/5 のリン酸化が減弱し、Erk のリン酸化も減弱していることが示された。

以上より、本論文では大腸がん細胞が BMP-4 を自己分泌し、それにより活性化される内因性の BMP シグナルが、大腸がん細胞の生存に重要であることを明らかにした。加えて、BMP 阻害剤により、この内因性の BMP シグナルを阻害すると、DUSP5 の発現上昇を介して Erk が脱リン酸化され、大腸がん細胞に apoptosis が誘導されることが明らかとなった。また *in vivo* においても BMP 阻害剤の抗腫瘍効果を示した。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と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。