

平成30年 5月18日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08393

研究課題名(和文) BMP阻害剤を応用した新規大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文) BMP-4 as a new therapeutic target in colorectal cancer

研究代表者

江幡 正悟 (Ehata, Shogo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授

研究者番号：90506726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞では高頻度にWnt/beta-cateninシグナルが亢進し、これによりBMP4遺伝子の転写が亢進しており、この機能解析を行った。その結果、BMP1型受容体キナーゼ阻害剤によりこのシグナルを阻害すると、癌細胞にアポトーシスが誘導され、腫瘍形成が抑制された。またRNA-seqから、BMP-4は脱リン酸化酵素DUSP5の発現を減少させ、Erkを活性化することでアポトーシス耐性を生じさせていることが判明した。本研究ではBMP-4シグナルを介した大腸癌細胞のアポトーシス制御の分子メカニズムを解明し、BMP阻害剤を用いた分子標的治療の可能性を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Poor prognoses for colorectal cancer patients with metastatic lesions have driven demand for the development of novel targeted therapies. Here we demonstrate that expression of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) is universally upregulated in human colorectal cancer cells and tissues, resulting in activated BMP signaling. Inhibition of endogenous BMP signaling by the BMP type I receptor inhibitor LDN-193189 elevated expression of the phosphatase DUSP5 in colorectal cancer cells, inducing apoptosis via dephosphorylation of Erk MAPK. Administering LDN-193189 to mice diminished tumor formation of colorectal cancer cells. Our findings suggest inhibition of autocrine BMP-4 as a candidate treatment strategy for colorectal cancer.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Colorectal cancer Apoptosis BMP-4 Erk MAPK DUSP5

### 1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor-beta (TGF-beta) ファミリーは TGF-beta、Bone morphogenetic protein (BMP)、Activin など、33 種類のメンバーから構成されるサイトカイン群である。1980 年代初頭に TGF-beta の形質転換作用が発見されて以来、現在までに多様な TGF-beta の生物学的作用が明らかにされてきた。特に最近では進行癌における TGF-beta の腫瘍促進作用が注目されているが、研究代表者自身も TGF-beta シグナルを阻害することで、乳癌細胞などの転移が抑制されることを見出しており、癌治療における TGF-beta 阻害剤の有用性が着目されている。ところが、同じ TGF-beta ファミリーメンバーである BMP に関しては、TGF-beta と同様に多様な生物学的作用が明らかにされていながら、癌の進展における BMP の役割が明確になっていない。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では大腸癌の進展における BMP シグナルの機能解析を行った。研究代表者自身による予備的な検討から、大腸癌細胞は自己分泌的に BMP-4 を産生していることがわかっている。そこで、この BMP-4 を介したシグナル伝達が、大腸癌治療における新規分子標的として有用であるかどうか検証を行った。

また、近年では特異性の高い BMP 阻害剤の開発がすすみ、進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia ossificans progressive; FOP) など、一部の BMP 関連疾患の治療への応用が検討されており、これらの薬剤の大腸癌治療への有用性に関しても言及した。特にこれらの阻害剤であれば、完全なる新規の薬剤ではなく、他疾患で実績のある既存の阻害剤をリポジショニングすることになり、臨床試験に進めやすいとも期待される。

### 3. 研究の方法

以下の 3 項目の検討をおこない、BMP-4 シグナルが大腸癌治療における新規分子標的になるの proof of concept を検証した。

(1) 大腸癌における BMP-Smad シグナルの可視化：ヒト大腸癌症例における BMP-4 発現量やリン酸化 Smad の発現量が、大腸癌症例の予後や各種治療効果に相関しているか、臨床情報との照合を行い、解析を行った。解析には抗 BMP-4 抗体、抗リン酸化 Smad 抗体による免疫組織化学染色を用いた。

(2) 大腸癌における BMP シグナルの pro-oncogenic 作用とその分子メカニズムの解明：BMP-4 が大腸癌細胞にアポトーシス耐性を獲得させる分子メカニズムを解明した。具体的には RNA シーケンシング解析から、BMP-Smad の標的遺伝子を網羅的に探索した。さらに探索された標的遺伝子のうち、

アポトーシス耐性など、細胞の生存の制御に関わると予想されるものを抽出し、その関与を検証した。

(3) 大腸癌治療における BMP 阻害剤の有用性：BMP 阻害剤が BMP-Smad シグナルを効果的に阻害するか検証するために、大腸癌細胞における BMP 標的遺伝子の発現誘導に対する阻害効果、BMP 応答性レポーター活性に対する阻害効果、アポトーシス誘導活性を検討し、スクリーニングをおこなった。さらにマウスに対する大腸癌移植モデルにおいて、腫瘍増大や転移形成に対する阻害効果を評価した。BMP 阻害剤としては LDN-193189 を使用した。またシグナル阻害の特異性を検証するために、既存 BMP アンタゴニストである Noggin を利用した。

### 4. 研究成果

(1) 予備的検討からヒト大腸癌細胞株では BMP-4 が自己分泌されていることがわかっている。そこで、まず BMP-4 発現亢進が、Smad シグナル伝達を活性化させているか、ヒトの臨床検体を用いて検討を行った。ヒト大腸癌症例の原発腫瘍組織に用いて、BMP-4 やリン酸化 Smad1/5 に対する抗体による免疫組織化学染色を行ったところ、正常大腸上皮細胞に比べ、大腸癌細胞では BMP-4 発現が亢進し、これによって内在的に Smad1/5 シグナル伝達が活性化していることがわかった (図 1)。また、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Gene Expression Omnibus (GEO) 等にアクセスし、複数の public database を用いた解析からも上記の傾向が再現された。さらに各病期の大腸癌症例の予後と BMP4 mRNA 発現量の相関性しらべたところ、少なくとも stage II の大腸癌症例では、BMP4 mRNA 発現量が独立した予後規定因子であることがわかった。

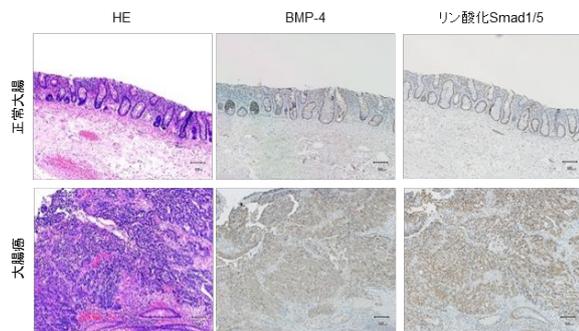


図1. 大腸の正常・癌組織におけるBMP-4発現とリン酸化Smad

(2) 次に、大腸癌細胞における BMP-4 発現亢進の分子メカニズムの解明を行った。既知の報告に基づき、siRNA 等を使用した生化学実験を行ったところ、BMP4 遺伝子の発現は、大腸癌細胞において高頻度に亢進している Wnt/beta-catenin シグナルの異常によるものであることが示唆された。特にクロマチン

免疫沈降-PCR 解析の結果から、Wnt/beta-catenin シグナル伝達に重要な転写因子 transcription factor 4 (TCF4) が *BMP4* の locus に直接的に結合していることがわかり、Wnt/beta-catenin シグナル亢進が *BMP4* 転写亢進に重要であることが示唆された。

(3)また *BMP-4* を標的とした siRNA や shRNA を用いた検討を行った。この結果、*BMP-4* の発現をノックダウンすると、大腸癌細胞にアポトーシスが誘導され、in vivo での腫瘍形成能が低下することがわかった。さらに、*BMP* 受容体キナーゼ活性阻害作用を有する低分子化合物 LDN-193189 を添加すると大腸癌細胞にアポトーシスが誘導された(図2)。

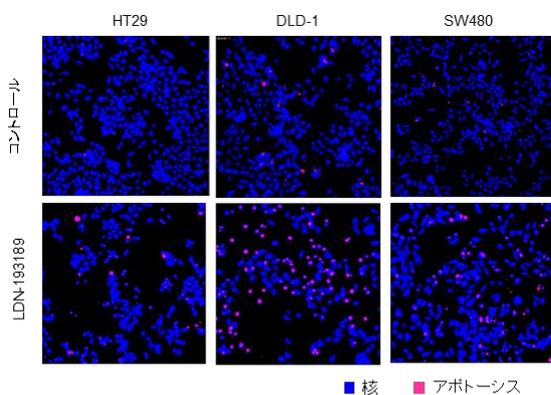


図2. LDN-193189による大腸癌細胞のアポトーシス

さらに LDN-193189 はマウスに投与すると、移植された大腸癌細胞の腫瘍形成を有意に抑制する作用を有していることがわかった(図3)。

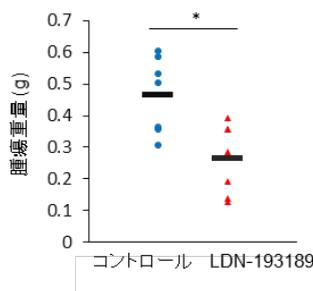


図3. LDN-193189による大腸癌細胞の腫瘍抑制効果

(4)最後に、大腸癌細胞のアポトーシス制御に重要な *BMP-4* 標的遺伝子の同定を試みた。特に大腸癌細胞の生存には extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase (Erk MAPK) を介したシグナル伝達が深く関わっていることから、RNA シーケンシング解析を用いたスクリーニングを行い、大腸癌細胞での Erk のリン酸化を制御する遺伝子を重点的に搜索した。この結果、*BMP-4* は Erk の脱リン酸化酵素のひとつである dual specificity phosphatase 5 (DUSP5) の発現を減少させ、これによって

Erk MAPK の活性を高めることで、大腸癌細胞にアポトーシス耐性を生じさせていることが判明した。

(5)これまでの研究成果から、大腸癌細胞では高頻度に Wnt/beta-catenin シグナルが亢進しているが、これにより TCF4 が *BMP4* の locus に直接的に結合することで *BMP4* 遺伝子の転写が亢進していることが明らかになった。またこれによって自己分泌的に活性化している *BMP-4*-Smad シグナルを、LDN-193189 をはじめとした *BMP* I 型受容体キナーゼ阻害剤によって減弱させることで、大腸癌細胞にはアポトーシスが誘導され、結果として腫瘍形成が減弱されることがわかった(図4)。

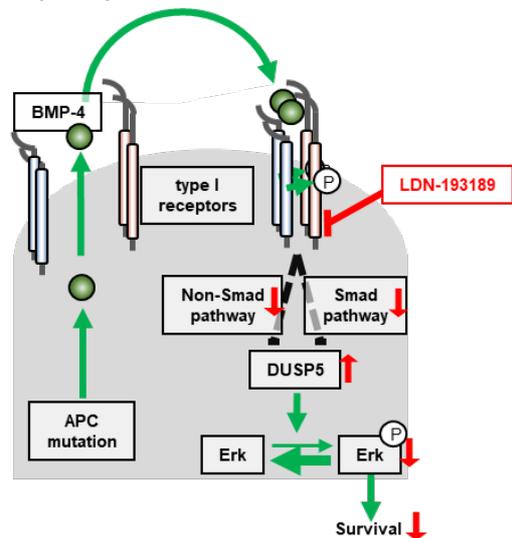


図4. BMP-4を介した大腸癌細胞の生存シグナル

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Yokoyama Y, Watanabe T, Tamura Y, Hashizume Y, Miyazono K, Ehata S, Autocrine BMP-4 signaling is a therapeutic target in colorectal cancer、Cancer Research、査読有、77巻、2017、4026-4038 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0112.

〔学会発表〕(計8件)

横山雄一郎、江幡正悟、宮園浩平、大腸癌細胞は *BMP-4* を自己分泌し Bim タンパクの分解を促進することでアポトーシスを抑制する、第19回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015年6月12日

横山雄一郎、江幡正悟、渡邊聡明、宮園浩平、Autocrine *BMP-4* protects colorectal cancer cells from apoptosis through down-regulation of Bim、平成27年度がん

若手研究者ワークショップ、2015年9月3日

Yokoyama Y, Ehata S, Watanabe T, Miyazono K, Autocrine BMP-4 accelerates proteasomal degradation of Bim and protects colorectal cancer cells from apoptosis、第74回日本癌学会総会、2015年10月9日

Yokoyama Y, Ehata S, Morishita Y, Watanabe T, Miyazono K、Autocrine BMP-4 is a novel therapeutic target for colorectal cancer、10th AACR-JCA Joint Conference、2016年2月18日

Yokoyama Y, Ehata S, Watanabe T, Miyazono K, Autocrine BMP-4 accelerates proteasomal degradation of Bim and protects colorectal cancer cells from apoptosis、第75回日本癌学会総会、2016年10月6日

江幡正悟、横山雄一郎、宮園浩平、BMP阻害剤を応用した大腸がんの分子標的治療、第21回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017年6月15日

Ehata S, Yokoyama Y, Watanabe T, Tamura Y, Hashizume Y, Miyazono K、Autocrine bone morphogenetic protein 4 signaling in colorectal cancer as a target for treatment、FASEB “The TGF-beta Superfamily: Signaling in Development and Disease”、2017年7月10・11日

Yokoyama Y, Watanabe T, Tamura Y, Hashizume Y, Miyazono K, Ehata S、Autocrine BMP-4 signaling in colorectal cancer as a target for treatment、第76回日本癌学会総会、2017年9月29日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)  
該当なし

○取得状況(計0件)  
該当なし

〔その他〕

研究室ホームページ  
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  
<http://beta-lab.umin.ac.jp/>

本研究課題で行ったRNAシーケンシング解析結果の生データデポジトリ

NCBI, GEO  
GSE96914, "Autocrine BMP-4 signaling promotes survival of colorectal cancer cells."  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE96914>

大学院による研究紹介特集ページ  
UTokyo Research  
「大腸がんの新たな治療法の創出に向けて、大腸がん細胞の生存に重要なシグナル伝達機構を同定」  
<https://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/exploring-new-treatments-targeting-colorectal-cancer.html>

雑誌によるハイライト  
Highlights from Recent Cancer Literature, "Targeting Autocrine BMP-4 Signaling in Colorectal Cancer"  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/77/17/4543>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江幡 正悟 (EHATA, Shogo)  
東京大学・大学院医学系研究科・特任准教授  
研究者番号：90506726

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

横山 雄一郎 (Yokoyama, Yuichiro)  
東京大学・大学院医学系研究科・特任研究員