

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07888

研究課題名(和文)膵発癌マウスモデルを用いた膵発癌・進展におけるBMPシグナルの役割の検討

研究課題名(英文) Role of BMP signaling in tumor progression in pancreatic cancer using genetically engineered mouse model

研究代表者

宮林 弘至 (Miyabayashi, Koji)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50634961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：難治癌である膵癌におけるBMPシグナルの役割の解明のため、遺伝子改変モデルであるKRAS変異+Tgfbr2ノックアウト+Bmpr2ノックアウト(PKFB)の解析を行なった。PKFBマウスでKRAS変異+Tgfbr2ノックアウト(PKF)と比べて生存期間が延長し、間質のマクロファージの関連を考えていた。メカニズム解明のため網羅的な解析を用いて、BMPシグナルがインターロイキンなどの炎症性サイトカインを介して、間質リモデリングに関連している可能性が示唆され、BMPシグナルの膵癌腫瘍・間質相互作用における重要性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は難治癌であり、克服のためには早期診断法や有効な治療戦略が必要で、そのために複雑な病態の理解が重要である。本研究では膵癌におけるBMPシグナルの果たす役割を検討したところ、BMPシグナルが炎症性サイトカインを介して膵癌における腫瘍間質相互作用に影響を与えていることが示された。これら病態の理解から、早期診断法や治療戦略の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of BMP signaling in pancreatic cancer, we conducted an analysis using a genetically modified mouse model, designated as PKFB, which combines KRAS mutation with Tgfbr2 knockout and Bmpr2 knockout. Compared to mice with KRAS mutation plus Tgfbr2 knockout (PKF), PKFB mice exhibited prolonged survival, prompting consideration of the involvement of macrophages in the stroma. To decipher the underlying mechanisms, we employed comprehensive analyses, which suggested that BMP signaling may be associated with stromal remodeling via inflammatory cytokines such as interleukin. These findings underscore the importance of BMP signaling in the tumor-stroma interaction of pancreatic cancer.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 BMPシグナル 遺伝子改変マウスモデル 腫瘍間質相互作用

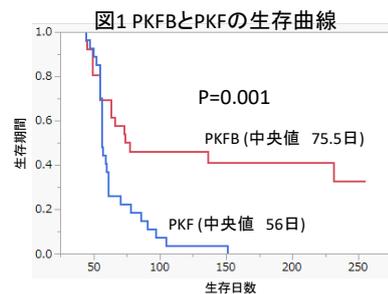
1. 研究開始当初の背景

膵癌は日本人の癌死の第4位を占めるに至り、その予後は5年生存率9%程度と依然として難治癌である。膵癌の病態の解明と予後改善につながる治療法の開発は急務である。

従来より癌の微小環境の重要性が注目されているが(Mueller and Fusenig, Nat Rev Cancer 2004)、特に間質が非常に豊富な膵癌では、腫瘍間質相互作用の理解が特に重要で、近年進歩してきたマルチオミクスによる癌細胞の病態理解に加え、それと関連する間質細胞のサブタイプや免疫細胞の関与など、腫瘍間質相互作用の重要性、複雑さが再認識されている。

遺伝子改変マウスモデルは移植モデルよりも癌の微小環境をより臨床像に忠実に再現すると考えられ、病態の理解に有用だけでなく、ヒトの臨床試験の生存効果もよりよく反映するため、治療モデルとしても有用である(Olive et al., Science 2009)。我々が樹立した恒常活性型 *Kras*^{G12D} 発現と TGF-beta II 型受容体(*Tgfr2*)KO モデル(PKF)は豊富な間質を伴う分化型管状腺癌を呈し(Ijichi 他, Genes Dev 2006)、他のマウスモデルで報告されていたヒトでは稀な肉腫様の腫瘍がみられないという点で、最もヒト膵癌に近いモデルといえる。我々は膵癌の微小環境に着目し、本モデルを用いて腫瘍間質相互作用における CXC ケモカインシグナルやプロドメイン蛋白の病態への関与とそれを標的とした治療の有効性を明らかにしてきた(Ijichi 他, J Clin Invest 2011; Yamamoto 他, Oncotarget 2016, Sano 他, Oncogenesis 2019)。一方、ヒト膵癌に多いとされる *Smad4*KO と恒常活性型 *Kras*^{G12D} 発現のマウスモデルは嚢胞性膵癌の組織像を呈するため(Bardeesy 他, Genes Dev 2006)、その組織像の違いに *Smad4* を共有する TGF-b ファミリーの BMP シグナルが関連する可能性があるため、我々は *Kras*+*Tgfr2*KO+*Bmpr2*KO モデル(PKFB)を作成した。*Kras*+*Tgfr2*KO 膵発癌モデル(PKF)と *Kras*+*Tgfr2*KO+*Bmpr2*KO モデル(PKFB)の表現型の比較において、Kaplan-Meier 曲線を比較すると、PKFB では PKF に対して有意に生存期間が延長したものの(図1)、組織学的には *Kras*+*Smad4*KO のような嚢胞性腫瘍とは異なっていた。PKFB における生存期間の延長が発癌の抑制にあるのか、癌の進展抑制にあるのか、また、*Kras*+*Tgfr2*KO+*Bmpr2*KO モデルにおいて *Kras*+*Smad4*KO と異なる組織を呈した原因は何かを解明するため、詳細な検討が必要である。

TGF-b は上皮系細胞に対しては強力な増殖抑制作用を示すことから、癌抑制因子と考えられる一方で、癌浸潤に重要な上皮間葉移行(epithelial mesenchymal transition; EMT)で中心的な役割を果たすなど癌促進因子とも考えられてきた。膵臓癌においては、従来より TGF-b の下流である *SMAD4* の変異が約半数に認められ、TGF-b シグナルからの逸脱が癌化の要因の一つと考えられていたが、近年 *SMAD4* 野生型が *KRAS* 増幅と共に予後不良因子であることも報告され、さらに、TGF-b が線維芽細胞サブタイプ、細胞外マトリクスの蓄積、血管新生、免疫抑制に影響することも明らかとなりつつあり、TGF-b-SMAD シグナルの再考が必要となってきた。BMP シグナルも同様に癌浸潤・転移に促進的、抑制的な作用の両方が報告されており、膵臓癌においても *BMPR1A* 発現低下が予後不良因子となる報告や(Voorneveld PW 他, Br J Cancer 2013)、BMP が浸潤に関連するという報告もあり(Kleeff J 他, Gastroenterology 1999, Gordon KL 他, Carcinogenesis 2009)、膵臓癌における BMP の役割は未だ不明な点が多い。BMP の発癌・癌浸潤・癌転移における作用機序を解明することは新たな分子標的療法の開発や診断・予後の判定のために重要である。



2. 研究の目的

本研究では、臨床の膵癌像をよく再現する *Kras*+*Tgfr2*KO 膵発癌モデル(PKF)において *Bmpr2* をノックアウトした *Kras*+*Tgfr2*KO+*Bmpr2*KO モデル(PKFB)を作成し、膵癌の発癌進展における BMP シグナルの寄与を明らかにすることが目的である。これまでの *in vitro* の検討から、膵癌の発癌早期の ADM~PanIN 形成に BMP シグナルが促進的に作用していることが示唆されており、*in vivo* では、その阻害により *Kras*+*Tgfr2*KO の急速な膵癌形成が抑制され、間質に浸潤するマクロファージの減少が認められた。これらの結果における BMP の作用のメカニズムを明らかにし、難治癌である膵癌に対する新規バイオマーカー、治療戦略の開発が目的である。

3. 研究の方法

本研究では *Kras*+*Tgfr2*KO 膵発癌モデル(PKF)と *Kras*+*Tgfr2*KO+*Bmpr2*KO モデル(PKFB)の表現型の比較において、BMP シグナルが膵癌の発癌および進展に与える影響を検討する。

① BMP の膵発癌への影響を検討するため、恒常活性型 *Kras*^{G12D} 発現 (PanIN) マウスでは PanIN が 3 週間より形成されるが、セルレインで膵炎を誘発すると ADM・PanIN 形成が促進されるモデル

が報告されており、セルレイン誘発性 ADM における BMP シグナルの関与を免疫染色で SMAD1/5/8 リン酸化を評価する。

- ② BMP の膵癌進展への影響を検討するため、PKF と PKFB から樹立した細胞を同所移植し腫瘍形成能や組織を比較する。PKF と PKFB で ERK リン酸化、YAP と SMAD1/5/8 リン酸化、SMAD1 リンカー部リン酸化を評価する。
- ③ BMP の膵癌間質への影響を調べるため、PKF と PKFB から樹立された細胞株において、分泌されるケモカイン、その細胞上清が線維芽細胞へ与える影響などを比較するため、RNA シークエンスを用いて網羅的に検討する。

4. 研究成果

- ① BMP の膵発癌への影響を検討するため、恒常活性型 *Kras*^{G12D} 発現 (PanIN) マウスにおいてセルレインで膵炎を誘発すると ADM は亢進し、免疫染色で SMAD1/5/8 リン酸化が亢進する傾向であった。RNA シークエンスのデータ解析から *Kras*^{G12D} 発現 (PanIN) マウスにおいて BMP 関連分子の発現が亢進しており、*Kras*^{G12D} 発現 (PanIN) マウスにセルレインを投与することで、さらに BMP 関連分子の発現が亢進することがわかり、ADM において BMP シグナルが重要であることを示した。
- ② ③ BMP の膵癌進展への影響を検討するため、PKF と PKFB から樹立したオルガノイド細胞を同所移植し腫瘍形成能や組織を比較したところ、PKF に比較して PKFB では腫瘍の縮小を認め、BMP シグナルがマウス膵癌細胞において腫瘍生成に重要であることを示した。
- ③ BMP の膵癌間質への影響を調べるため、PKF と PKFB から樹立されたオルガノイド細胞株において、分泌されるケモカイン、その細胞上清が線維芽細胞へ与える影響などを比較するため、RNA シークエンスを用いて網羅的に検討したところ、PKF において炎症性サイトカインの上昇を認め、PKFB で低下していたことから、これらサイトカインによる間質への影響が示唆された。

これらの実験から、BMP シグナル自体が膵発癌・進展に重要だが、癌細胞から発現する分子を介した間質のリモデリングも重要である可能性が示唆され、今後膵癌の治療や診断に役立つ可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊地知 秀明 (Ijichi Hideaki) (70463841)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関