

令和元年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07110

研究課題名(和文) 膵発癌モデルを用いた膵癌の発癌進展におけるBMPシグナルの重要性の検討

研究課題名(英文) Roles of BMP signaling in pancreatic cancer initiation and progression using a genetically-engineered mouse model

研究代表者

伊地知 秀明(Ijichi, Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70463841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：最難治癌である膵癌の病態の理解は重要な課題である。我々は膵臓上皮特異的変異型Kras発現+TGF-beta II型受容体(Tgfbr2)ノックアウト(Kras+Tgfbr2 KO)により、ヒト通常型膵癌をよく模倣する膵発癌モデルを樹立している。一方、Kras+Smad4 KOでは、嚢胞性膵腫瘍が形成される。この表現型の相違がBMPシグナルの相違によるものではないかとの仮説から、Kras+Tgfbr2 KOにBMP II型受容体(Bmpr2)KOを加えたモデルを樹立した。その結果、得られた腫瘍は通常型膵癌に近く、膵癌の発癌進展には必ずしもBmpr2は必要ないことがわかった。予後への寄与を検討中。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の分子生物学的知見に基づく分子標的治療、免疫療法、個別化医療等の目覚ましい進歩に対し、膵癌は依然として5年生存率9%と最難治癌であり、かつ罹患数および癌死数が増加しており、膵癌の病態の理解と予後に寄与する治療の開発は喫緊の課題である。本研究では、臨床像に近い膵発癌モデルを用い、膵癌の発癌進展および生命予後におけるBMPシグナルの寄与を明らかにすることを目的としている。膵発癌モデルでは、ヒトで遺伝子異常の多いSmad4よりも遺伝子異常の稀なTgfbr2のノックアウトの方が通常型膵癌に近い腫瘍が形成され、その理由を含めて膵癌形成の機序を明らかにできる可能性があり、現在腫瘍組織の解析中である。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the most deadly cancers. Understanding the underlying mechanisms of the disease formation is quite important. We have already established a mouse model containing pancreas epithelium-specific mutant Kras expression and TGF-beta type II receptor (Tgfbr2) knockout(Kras+Tgfbr2KO), which can recapitulate human disease very well. Others reported that Smad4 knockout in the same context with Kras activation developed cystic tumors, suggesting that the difference of BMP signaling might result in this phenotypic difference. Thus, we combined the Kras+Tgfbr2 KO with BMP type II receptor (Bmpr2) knockout. The Kras+Tgfbr2KO+Bmpr2KO resulted in non-cystic, pancreatic cancer close to the Kras+Tgfbr2KO, which indicates that Bmpr2 is dispensable for pancreatic cancer formation. The impact on the prognosis is now under investigation.

研究分野：膵癌、消化器内科学

キーワード：膵癌 BMPシグナル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治癌の最たるものであり、その病態の解明・治療法の開発は急務である。現在膵癌は年々増加傾向で、日本人の癌死の第4位となった。その予後は依然として5年生存率7%程度と極めて不良である。米国では2030年には肺癌に次ぐ第2位の癌死の原因となること が最近米国癌学会から報告された。

膵癌の発癌および進展のメカニズムを理解するため、近年、膵臓特異的な遺伝子改変マウスによる、ヒトの膵癌をよく模倣する膵癌モデルが作成されてきた。その中でも、我々が樹立した恒常 活性型 $Kras^{G12D}$ 発現 + TGF- β 型受容体ノックアウト ($Kras+Tgfbr2^{KO}$) という組合せのマウスは、ヒト膵癌と同様の臨床的症候を呈し、かつ著明な間質の増生・線維化 (desmoplasia) を伴う分化型管状腺癌が得られ、既報のモデルで報告されていた肉腫様の未分化腫瘍もみられず、最もヒトの膵癌に似たモデルと考えられる (Ijichi et al., *Genes Dev* 2006)。本モデルでは、生後3週半ほどで PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) 様の前癌病変を呈し、5週で一部浸潤癌の状態となり、6-7週で正常な膵臓の腺房細胞がほぼ消失し、平均生後8週で癌死した。

一方、ヒト膵癌に変異の多い Smad4 のノックアウトと恒常活性型 $Kras^{G12D}$ 発現のマウスモデル ($Kras+Smad4^{KO}$) は嚢胞性膵腫瘍を呈し、PanIN とは異なる前癌病変 IPMN (intraductal papillary mucinous neoplasm) 様のモデルとなり、生存期間も長いことが報告された (Bardeesy et al., *Genes Dev* 2006)。同じ TGF- β -Smad シグナルの中で、 $Tgfbr2^{KO}$ と $Smad4^{KO}$ の違いにより得られる表現型が明らかに異なり、異なる発癌メカニズムが示唆される。Smad4 は TGF- β ファミリーの BMP シグナルでも共有される分子であり、この表現型の相違には BMP シグナルの関与が示唆された。

BMP シグナルは癌に対し促進的に働くのか抑制的に働くのか、いまだ解明されていない点も多い。BMP シグナルが TGF- β 同様に乳癌の骨転移・浸潤を促進したとの報告があり (Katsuno et al., *oncogene* 2008)、逆に BMP シグナルが脳腫瘍において分化誘導し腫瘍抑制的に働くことも報告されている (Caja et al., *FEBS Lett* 2015)。BMP シグナルが Smad4 遺伝子異常により癌抑制から促進に役割を変える (Voorneveld et al., *Gastroenterology* 2014) など、TGF- β シグナル同様に癌抑制と促進両方に働く複雑な調節がなされている可能性もある。また大腸癌で癌幹細胞と BMP の関連が報告され (Whissell et al., *Nat Cell Biol* 2014)、乳癌で肺に転移した休止状態の癌細胞が BMP シグナルを抑制することで活性化するなど (Hua Gao et al., *Cell* 2012)、癌幹細胞に関連する役割も報告されている。膵癌との関連では、近年 BMPR1A 発現低下が 50%程度存在し予後不良因子であるとの報告がなされ (Voorneveld et al., *Br J Cancer* 2013)、特に Smad4 遺伝子異常のない膵癌で予後との関連が示唆された。

我々はこれまでに、 $Kras+Tgfbr2^{KO}$ と $Kras+Smad4^{KO}$ の膵腫瘍の相違が BMP シグナルに依存する、つまり BMP シグナルが Smad4 の異常の有無により阻害されているか ($Kras+Smad4^{KO}$) intact であるか ($Kras+Tgfbr2^{KO}$) の違いにより生じていると仮説し、BMP シグナルの機能を検討してきた。その結果、膵発癌過程の早期に前癌病変 PanIN に先行して出現する acinar to ductal metaplasia (ADM) が BMP シグナルにより増加するという結果を得ている。逆に TGF- β シグナルが ADM を抑制し、 $Tgfbr2^{KO}$ では BMP シグナルが増強しており ADM が促進しているという結果も得ている。すなわち、BMP シグナルは膵発癌早期の腫瘍発生に必要であり、TGF- β シグナルの遮断がさらに発癌促進に作用していることを示唆する結果である。

$Kras+Tgfbr2^{KO}$ マウスの膵組織での BMP シグナルを生後3週から癌死直前の8週までリン酸化 Smad1/5/8 染色にて追跡評価したところ、リン酸化 Smad1/5/8 の核染色は発癌早期から進行期にわたって認められた。また膵特異的変異型 $Kras$ 発現マウスから樹立した膵腫瘍細胞の $Bmp7$ 安定高発現株は、in vitro での増殖能は親株と変わらなかったものの、ヌードマウスに皮下移植したところ、皮下腫瘍の増大が有意に促進された。これらの結果は、BMP が膵癌の発癌進展過程の初期のみでなく進行期にも腫瘍促進的作用を有していることを示唆する結果である。

2. 研究の目的

本研究では、臨床の膵癌像をよく再現する $Kras+Tgfbr2^{KO}$ 膵発癌モデルにおいて $Bmpr2$ をノックアウトすることにより、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を目的とした。これまでの検討から、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、その阻害により $Kras+Tgfbr2^{KO}$ の急速な膵癌形成が劇的に抑制され、通常型の膵癌から $Kras+Smad4^{KO}$ と同様の嚢胞性膵腫瘍へと組織型がシフトするのではないかと仮説を立てた。得られた表現型を組織学的検討を中心に解析し、膵癌の発癌進展における BMP シグナルの寄与について、その表現型に至るメカニズムについても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) $Kras+Tgfbr2^{KO}$ 膵発癌モデルにおいて $Bmpr2$ を同時にノックアウトする元の $Kras+Tgfbr2^{KO}$ 膵発癌モデル (遺伝子型 $Ptf1a^{cre/+}; LSL-Kras^{G12D/+}; Tgfbr2^{flox/flox}$) (以下

PKF)は、遺伝子型 *Ptf1a^{cre/+};Tgfr2^{flx/flx}* (以下PF)と *LSL-Kras^{G12D/+};Tgfr2^{flx/flx}* (以下KF)との交配により1:4の確率で得られ、膵臓上皮特異的に変異型Kras発現とTgfr2ノックアウトを生じ、100%の浸透率で膵癌を発癌し癌死する。この膵発癌モデルにおいて膵臓上皮特異的にBmpr2を同時にノックアウトする遺伝子型

Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfr2^{flx/flx};Bmpr2^{flx/flx}(以下PKFB)を以下の交配により樹立した。

今回PKFと交配した *Bmpr2^{flx/flx}*マウス(Beppu et al., Genesis 2005) (以下B)は、樹立者の別府秀幸博士の許可のもと、国立遺伝研から分与を受けた。

まずBと *Tgfr2^{flx/flx}* (以下F)の交配により *Bmpr2^{flx/flx}*アレルと *Tgfr2^{flx/flx}*アレルが共にヘテロの個体を得られる。次いでこの個体と *Tgfr2^{flx/flx}*の交配により *Tgfr2^{flx/flx}*アレルがホモで *Bmpr2^{flx/flx}*アレルがヘテロの個体および *Tgfr2^{flx/flx}*アレルがヘテロで *Bmpr2^{flx/flx}*アレルがホモの個体を得られる。続いてこれらのinbreedingから *Tgfr2^{flx/flx};Bmpr2^{flx/flx}*(以下FB)が得られる。

さらに、FBとPFの交配で *Bmpr2^{flx/flx}*アレルがヘテロとなったPF、FBとKFの交配で *Bmpr2^{flx/flx}*アレルがヘテロとなったKFが得られ、それぞれに再度FBとの交配を行うことでPFとKFの *Bmpr2^{flx/flx}*アレルがホモとなった個体、PFBとKFBが得られる。PFBとKFBを多数得て維持し、PFBとKFBの交配を行うことで1:4の確率で目的のPKFBが得られることになる。

(2) Kras+Tgfr2^{KO}+Bmpr2^{KO}モデル(PKFB)の表現型を解析する

PKFBの表現型を元のPKFとの比較において、Kaplan-Meier曲線、組織像について解析した。

(3) BMPシグナルにより生じる遺伝子発現プロファイルの変化の網羅的解析

マウス膵前癌細胞をBMP7 50 ng/mLで24時間刺激した際の遺伝子発現プロファイルの変化を、特に細胞接着因子に注目し、RT2 PCR array (Qiagen)にて網羅的に検索し、Selectinについて、Bmpr2をノックダウンした細胞を用いた定量的RT-PCRでの検証を行った。

(4)マウス膵癌細胞、前癌細胞の表現型におけるBmp7、P-Selectinの影響を強制発現とノックダウンにより検討する

マウス膵前癌細胞においてBmp7を強制発現させた細胞K518-Bmp7とコントロールの細胞K518-EVを用いて、P-Selectinをノックダウンし(K518-Bmp7-SelpKDおよびK518-EV-SelpKD)、in vitroでの細胞接着能をP-Selectinがインタクトな細胞と比較した。また、これらの細胞をヌードマウスの腹腔内に注射し腹膜播種の形成を比較した。

4. 研究成果

(1) Kras+Tgfr2^{KO}膵発癌モデルにおけるBmpr2同時ノックアウトの作成

上記のような交配の過程を経て、目的の遺伝子型 *Ptf1a^{cre/+};LSL-Kras^{G12D/+};Tgfr2^{flx/flx};Bmpr2^{flx/flx}* (PKFB)を得ることができた。交配の途中段階では、膵臓上皮特異的なTgfr2とBmpr2のダブルノックアウト (*Ptf1a^{cre/+};Tgfr2^{flx/flx};Bmpr2^{flx/flx}*, PFB)を経ており、この段階で出生率に偏向が生じる可能性もあるかと思われたが、特に交配の進みに問題は生じず、したがって、Bmpr2は膵臓の発生に不可欠ではないことがわかった。また、Tgfr2とBmpr2が両方欠損しても、膵臓の発生や個体の成熟および妊孕性には支障がないことがわかった。

(2) Kras+Tgfr2^{KO}+Bmpr2^{KO}モデル(PKFB)の表現型の解析

PKFBの膵臓では、Tgfr2とBmpr2がノックアウトされており、TGF-βとBMPの両シグナルが収斂するSmad4のノックアウトと同様の表現型が得られるのではないかと推測した。また、これまでの結果から、膵癌の発癌進展過程にBMPシグナルが促進的に働いており、Bmpr2のノックアウトが加わることにより膵癌自体が発癌しなくなる可能性も期待していた。

Kaplan-Meier曲線をPKFと比較し現在解析中である。しかしながら、膵癌自体は形成されており、発癌しなくなるというほどのインパクトはないことがわかった。さらに、一見してPKFと区別できない充実性の腺癌の形成がみられており、Kras+Smad4^{KO}のような嚢胞性腫瘍とは異なっていた。すなわち、PKFB、Tgfr2とBmpr2のダブルノックアウトの組織像は、Smad4ノックアウトの組織像とは明らかに異なっているということがわかった。

今後、生存期間および腫瘍の組織像について、より詳細な検討を行っていく必要がある。

(3) BMPシグナルにより生じる遺伝子発現プロファイルの変化の網羅的解析

これまでの結果から、BMPシグナルが、膵癌細胞・前癌細胞の細胞接着を促進するという結果が得られている。特に、無血清かつコラーゲンなどのコーティングがない、in vitroの細胞にとって厳しい条件下において細胞接着を促進していた。そこで、膵前癌細胞K518(変異型Kras発現あり、Tgfr2はインタクト)に対し、24時間50 ng/mLのBMP7で刺激し、細胞内遺伝子発現プロファイルの変化を特に接着因子に注目して網羅的に解析

した。その結果、BMP7 刺激により P-Selectin の発現が非常に強く誘導された(23.5 倍)。Bmpr2 をノックダウンした細胞 2 種の shRNA にて樹立)を用いた E-, L-, P-各種 Selectin の RT-PCR では、E-Selectin と L-Selectin の発現は有意な変化を示さなかったが、P-Selectin については、コントロール細胞では BMP7 刺激により 40 倍以上に発現上昇し、Bmpr2 ノックダウン細胞ではその発現上昇がキャンセルされる結果が得られ、BMP シグナル依存的であることが検証された。

(4) マウス膵癌細胞、前癌細胞の表現型における Bmp7、P-Selectin の影響を強制発現とノックダウンにより検討する

膵前癌細胞 K518 の in vitro における無血清下・無コーティング下での細胞接着について、Bmp7 の強制発現により接着が亢進し、Bmpr2 のノックダウンにより接着が減弱することを以前示している。K518 に P-Selectin を強制発現させると、やはり細胞接着能が亢進することがわかった。また、上記の K518-EV と K518-Bmp7 において P-Selectin を siRNA にてノックダウンすると、やはり細胞接着能が有意に減弱することが観察された。したがって、BMP シグナルによる細胞接着能の亢進は、P-Selectin 依存的であることが明らかとなった。

一方、K518-EV、K518-Bmp7、K518-Selp(P-Selectin 強制発現)、K518-Bmp7-SelpKD をヌードマウスの腹腔内に注射し腹膜播種の形成を比較したところ、K518-EV に比べて K518-Bmp7、K518-Selp では腹膜播種の volume が大きい傾向が示された。播種結節は、一部腺管構造を示しつつやや未分化な組織像を呈していた。K518-Bmp7-SelpKD については、播種の volume の減少は明らかとは言えず、これは siRNA によるノックダウン効果が持続しなかったためである可能性がある。これら腹膜播種アッセイについては、ここまでの結果では結論を述べることは難しいが、BMP シグナルおよび P-Selectin による細胞接着能の亢進が腹膜播種に促進的に働く可能性を示唆するものかもしれない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

Hideaki Ijichi, Koji Miyabayashi, Ryota Takahashi, Makoto Sano, Keisuke Tateishi, Yasuyuki Morishita, Harold L Moses, Kazuhiko Koike. Crucial Roles of BMP signaling in pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression in a genetically-engineered mouse model. The 12th International BMP Conference, Oct 25, 2018, Tokyo, Japan

伊地知秀明, 宮林弘至, 立石敬介, 多田稔, 小池和彦. Crucial Roles of BMP signaling in pancreatic cancer initiation and progression. 第 75 回日本癌学会学術総会, Oct 7, 2016, 横浜

Hideaki Ijichi. Crucial Roles of BMP signaling in pancreatic cancer initiation and progression. 第 47 回日本膵臓学会大会, 第 20 回国際膵臓学会, Aug 5, 2016, 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊佐山 浩通

ローマ字氏名：Isayama, Hiroyuki

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：70376458

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：宮林 弘至

ローマ字氏名：Miyabayashi, Koji

研究協力者氏名：佐野 誠

ローマ字氏名：Sano, Makoto

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。