

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22835

研究課題名（和文）直腸癌の放射線感受性におけるBMPの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of BMP pathway for sensitivity of radiotherapy of rectal cancer

研究代表者

横山 雄一郎（Yokoayma, Yuichiro）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20880222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、大腸癌で活性化しているBMPシグナルを調べることで大腸癌の放射線抵抗性を予測し、尚且つそれを阻害することで放射線抵抗性を改善させることを目的とした。本研究の結果、大腸癌細胞株にBMPシグナル阻害剤を添加することで、放射線照射による細胞数の減少が僅かに増強されることを示した。また、無血清培養下でBMPシグナル阻害剤を添加すると、大腸癌細胞株にapoptosisが誘導され、放射線耐性にも関わるとされるapoptosis誘導タンパクであるBimタンパクの発現が亢進することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在罹患率・死亡率共に上昇している直腸癌に対しては、術前放射線化学療法（Chemoradiotherapy：CRT）が施行されるようになってきている。しかし、大腸癌の放射線耐性獲得のメカニズムや、放射線感受性を予測する因子については明らかとなっていない。本研究の成果により将来的に、大腸癌におけるBMPシグナルを調べることで直腸癌治療におけるCRTの効果予測が可能になると共に、BMP阻害剤の臨床応用への可能性が高まると考えられる。

研究成果の概要（英文）：BMP signaling has reported to be activated in colorectal cancer. Whether this activated BMP signaling influenced on the radiosensitivity of colorectal cancer has not been elucidated. In this study, we firstly showed that, in vitro, BMP inhibitor, LDN193189, slightly enhanced the growth inhibition caused by radiotherapy in colorectal cancer. Furthermore, LDN193189 induced apoptosis of colorectal cancer cells with upregulation of BH3-only protein, Bim, which has reported to be related to radiosensitivity.

研究分野：外科学、大腸肛門病学

キーワード：直腸癌 BMPシグナル 化学放射線療法

1. 研究開始当初の背景

欧米では依然から直腸癌に対し化学放射線療法 (Chemoradiotherapy : CRT) として 5-FU 等の抗癌剤を併用した放射線療法を術前に行うことで腫瘍を縮小し、局所再発を抑える治療が行われてきた。本邦ではこれまで術前 CRT はあまり普及していなかったが、近年その有用性が認識されるようになり、2019 年の治療ガイドラインで初めて推奨されるに至った。当教室では依然よりこの CRT を日常診療として行うと共に、その放射線の効果をより高める研究を大腸癌細胞の HIF-1、mTOR、autophagy の 3 経路に着目して行ってきた。放射線照射により大腸癌細胞株において、これらの経路が活性化し、それに伴い放射線抵抗性の増強と転移能の亢進が生じること、特異的な阻害剤を用いることで活性化を抑制し得ることを解明してきた。(基盤研究 (C) 課題番号 17K10620、Anticancer Res. 2018 Jun;38(6):3323-3331., Oncol Rep. 2019 Jul;42(1):377-385) しかし、放射線抵抗性や転移能の亢進を起こし得る経路は他にも存在すると考えられ、それらを見出すことは、今後の放射線抵抗性の予測や放射線効果を高める治療の開発に結び付くものと考えられた。

申請者は、これまで大腸癌細胞における Bone Morphogenetic protein (BMP) シグナルについて研究を行い、大腸癌細胞が BMP4 を自己分泌すること、その BMP4 が腫瘍細胞自身の BMP シグナル経路を活性化し、癌細胞自身の生存に寄与すること、そして BMP の阻害剤が腫瘍増殖を抑制することを示してきた。(Cancer Res. 2017 Aug;77(15):4026-4038.) BMP シグナルは種々の癌腫において放射線抵抗性に関わることは報告されているが、大腸癌において BMP シグナルが放射線抵抗性に関与するかどうかについて臨床データも含めて詳細に検討された報告例はなかった。

2. 研究の目的

本研究では BMP シグナルが大腸癌細胞の放射線感受性に影響を与えているという仮説のもと、放射線照射に対する癌細胞の応答における BMP シグナルの機能を解析した。本研究にて大腸癌における BMP シグナルが、放射線感受性や耐性獲得に重要であることが分かれば、下部直腸癌治療における術前放射線化学療法の効果予測が可能になると共に、BMP 阻害剤の臨床応用への可能性が高まると考えられる。

3. 研究の方法

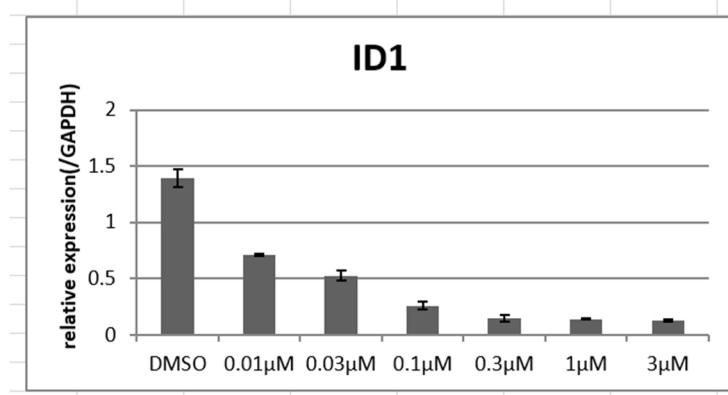
(1) 大腸癌細胞株において内因性 BMP シグナルが活性化していることを RT-PCR、Western blot にて確認し、その上で BMP シグナル阻害剤である LDN193189 にて内因性 BMP シグナルが抑制されることを確認する。

(2) 大腸癌細胞株に放射線照射を行い細胞数の減少をクリスタルバイオレット染色にて確認する。その上、LDN193189 との併用にて細胞数の減少が増強されるかどうかを確認する。

(3) 大腸癌細胞株に LDN193189 を添加することで、大腸癌細胞株に apoptosis が誘導されるかどうかを Western blot にて確認する。また LDN193189 を添加することで、apoptosis 関連タンパクの発現を確認する。

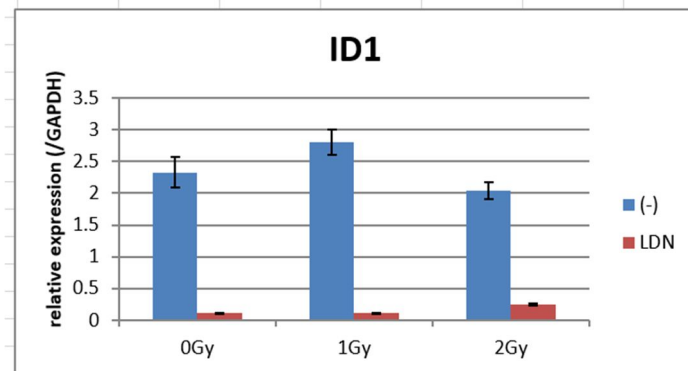
4. 研究成果

(1) LDN193189 が大腸癌細胞株での内因性 BMP シグナルに与える影響。
大腸癌細胞株 DLD-1 に LDN193189 を添加し、BMP シグナルの標的遺伝子である ID1 の発現の変化を RT-PCR にて確認した。濃度依存性に LDN193189 は ID1 の発現を抑制することが分かった。LDN193189 の至適濃度は $0.3 \mu\text{M}$ であると考えられた。



(2) 放射線照射が大腸癌細胞株の内因性 BMP シグナルに与える影響

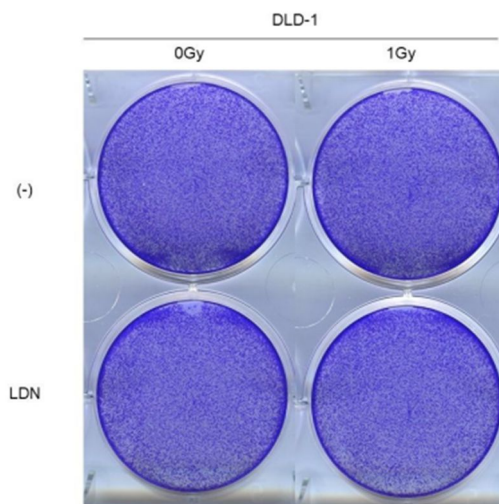
大腸癌細胞株 DLD-1 に放射線照射を行い、BMP シグナルの標的遺伝子である ID1 の発現に変化があるかどうかを確認した。その結果、放射線照射では ID1 の発現は変化しないことから、放射線照射は大腸癌細胞株の内因性の BMP シグナルに影響を与えない事が分かった。



(3) LDN193189 が大腸癌細胞株の放射線耐性に与える影響

DLD-1 細胞株を用いて、放射線照射 0, 1, 2, 4, 8Gy 下で各々 LDN193189 を添加し、非添加群と比較して細胞数の減少を認めるかどうかをクリスタルバオレット染色にて確認した。その結果、1Gy, 2Gy 照射下では、LDN(-)群では、放射線照射により細胞数の減少を認めないものの、LDN 投与群では、放射線照射により僅かに細胞数が減少することが分かった。DLD-1 細胞では再現性をもって、結果が示される事が分かった。しかし、その差は僅かであった。

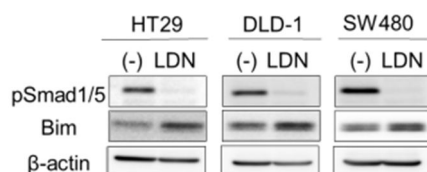
同様に HT29 細胞株を用いて同様の検討を行った。しかし、やはり、1Gy 照射下で LDN 添加群で細胞数の減少を認めたものの、その差は僅かであった。今後は抗癌剤も添加するなど、更なる条件検討が必要と考えられた。



(4) LDN192189 が大腸癌細胞株の生存に与える影響

LDN が大腸癌細胞株に apoptosis をもたらすかどうか、またその際に発現が上昇する apoptosis 関連タンパクの発現について調べた。

Western blot にて、無血清下に HT29, DLD-1, SW480 に LDN193189 を添加すると PARP の cleavage が増強することから apoptosis が誘導されることが分かった。更に、apoptosis 関連蛋白について調べると、BH3-only protein である Bim の発現が亢進することが分かった。Bim は、種々の癌細胞においても放射線感受性に関わる重要な apoptosis 制御因子であり、BMP シグナルが大腸癌細胞株において、放射線耐性に関わっている可能性があることを示す重要なデータであると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|