

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830072

研究課題名(和文)膵癌におけるBMPシグナルの作用機構の検討

研究課題名(英文)A role of BMP signaling on pancreatic cancer

研究代表者

宮林 弘至 (Miyabayashi, Koji)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50634961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 400,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌ではSmad4の遺伝子異常が約半数に認められるが、Kras活性化+Smad4ノックアウトマウスは嚢胞を伴う腺癌を呈し、我々が樹立したKras活性化+TGF-beta II型受容体ノックアウトマウスは著明な間質の増生・線維化を伴うヒト膵癌組織と近似した管状腺癌を呈した。この結果から膵発癌・進展にBone morphogenetic proteins (BMPs)が重要な役割を果たしている可能性を考えた。膵発癌に重要なADMにおいてBMPが促進的に作用することを示し、さらに癌進展にも促進的な影響を与えることを示し、BMPsが治療標的となる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：TGF-beta signaling has a crucial role in pancreatic tumorigenesis and progression, and almost all of pancreatic cancers carry at least one genetic alteration of TGF-beta related genes. However, the role of BMP signaling in pancreatic cancer remains unclear. We examined the effect of BMP signaling on the tumorigenesis of PDAC using mouse model. The immunohistochemistry of murine pancreas tissues demonstrated BMP signaling was activated in ADM and PanIN lesions and more strongly phosphorylated in PDAC lesion. In ADM assay, Bmp4 and Bmp7 increased the ADM and Tgf beta decreased the ADM. Further, the deletion of Tgfbr2 increased ADM formation and DMH1, BMPR inhibitor decreased the ADM. These results suggest that BMP signaling plays an important role on the initiation of pancreatic cancer.

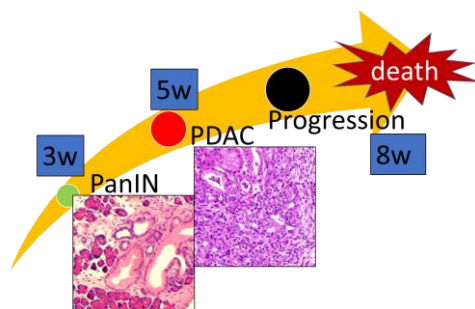
研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 動物モデル BMP

1. 研究開始当初の背景

膵癌は依然として最難治癌であり、様々な治療法に強い抵抗性を示す。膵癌の病態の理解に基づいた、より有効な治療法の開発は急務といえる。近年、膵癌に重要な遺伝子異常をマウスモデルに導入する遺伝子改変マウスモデルは著明な進歩を遂げ、ヒト膵癌に似た組織を呈するモデルが報告されてきた。膵癌では発癌の過程で TGF-beta シグナルに重要な Smad4 の遺伝子異常が約半数に認められるが、これまで恒常活性化型 KrasG12D 発現と Smad4 ノックアウトマウスが報告されたが (Bardeesy et al., Gene Dev 2006, Izeradjene et al., 2007)、生存中央値は 8-9 か月で、その組織は膵管内乳頭状粘液性腫瘍、粘液性嚢胞腫瘍由来に近似する嚢胞を伴う腺癌だった。我々は Ptf1a-cre を用いた膵臓上皮特異的な Kras 活性化+TGF-beta II 型受容体ノックアウトというマウスモデルを既に樹立し報告しており (Ijichi et al., Genes Dev 2006)、このモデルでは未分化な腫瘍の混在のない分化型管状腺癌を呈すると共に、著明な間質の増生・線維化 (desmoplasia) も伴っており、ヒト膵癌の組織型を最もよく近似するモデルであった。TGF-beta ファミリーの一つである Bone morphogenetic proteins (BMPs) は TGF-beta シグナル同様 Smad4 を介したシグナル伝達をするため、マウスモデルにおける表現型の違いに BMP シグナルが関与している可能性がある。BMP シグナルは TGF-beta シグナル同様、癌浸潤・転移に促進的、抑制的ともに働く可能性のある分子であり、近年特に消化器癌で報告されており、Smad4 遺伝子異常で BMP が癌抑制から癌促進に役割を変える (Voorneveld PW et al., 2014) など、TGF-beta シグナル同様に癌抑制と促進両方の役割を果たす複雑な調節がなされている可能性がある。また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という肺転移と BMP シグナルの関連が報告されるなど (Hua Gao et al., 2012)、癌幹細胞における役割も報告され、注目を集めている興味深い分子である。膵癌における BMP の役割は未だ不明な点が多く、BMP の発癌、癌浸潤・転移における作用機序を解明することによって、新たな分子標的療法の開発や診断・予後の判定のための基礎的知見を得られると考えられる。

図 1 膵癌モデルの経過



2. 研究の目的

膵癌の発癌進展における BMPs の役割及び転移機序の一端を明らかにし、さらに BMPs を標的とした治療可能性について検討する。

3. 研究の方法

BMP は、膵癌の発癌早期から進行期までを通じて重要な役割を果たしていると考えられ、膵癌の発癌機序の根幹にかかわっている可能性があると共に、治療標的である可能性がある。

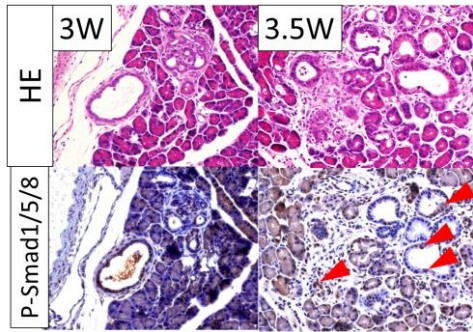
(1) まず膵発癌における BMP の役割を検討するため、PanIN の前段階である Acinar to ductal metaplasia (ADM) 形成に対する影響を検討した。In vitro で膵発癌を評価する手法で分離した膵腺房細胞を調整培養液で培養し腺管形成を検討する ADM assay があり、BMPs と TGF-beta の ADM 形成への影響を評価した。また TGF-beta シグナルと BMP シグナルが相互作用することが既報より示唆されるので TGFBR2 ノックアウトマウスより分離した膵腺房細胞とコントロールを比較して、TGFBR2 ノックアウトの ADM 形成能、BMP シグナルへの影響とそのメカニズムを解析した。In vivo では膵発癌モデルに BMP 阻害剤を早期投与して ADM 形成、PanIN 形成への影響を検討した。

(2) 次に、マウスの膵癌細胞と PanIN 細胞において BMP の発現状態を確認した。PanIN 細胞株で BMPR2 のノックダウンと BMP7 の恒常発現株を作製し、BMP 発現の変化による主要な細胞内シグナル伝達系の変化、また細胞生物学的な表現型の変化 (増殖能、形態変化、浸潤能、in vivo 造腫瘍能等) を検討した。In vivo ではヌードマウスへの皮下腫瘍モデルを用いて BMPR2 ノックダウン細胞株とコントロール株を比較。また BMP7 強制発現株とコントロール株を比較した。

4. 研究成果

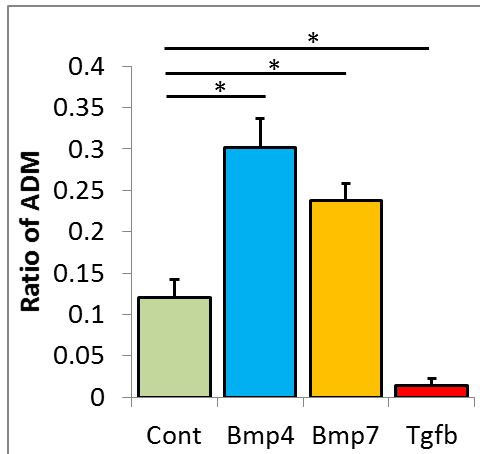
膵発癌マウスの組織の経時的な免疫染色で、PanIN が形成される 3 週から膵癌の形成される 5 週、膵癌が膵全体を置換して死に至る 8 週 (図 1) と BMP シグナルの下流の Smad1/5/8 のリン酸化を評価すると、PanIN、癌ともに Smad1/5/8 が活性化され、また PanIN、癌周囲の間質細胞でも Smad1/5/8 が活性化していた。発癌、癌進展、腫瘍・間質相互作用に BMP シグナルが活性化している可能性が示唆された。膵癌マウスモデルで ADM、PanIN が生じる 3 週での Smad1/5/8 のリン酸化を評価すると、局所的ではあるが、Smad1/5/8 のリン酸化が認められ、膵発癌、ADM 形成における BMP シグナルの関与が示唆された (図 2)

図2 膵癌マウスの P-Smad1/5/8 免疫染色



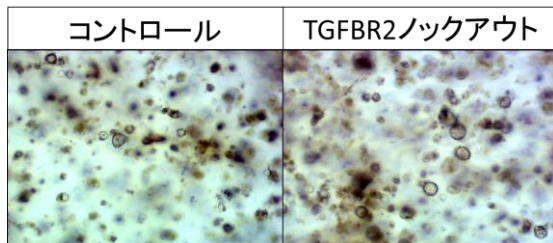
(1)まず膵発癌における BMP の役割を検討するため ADM assay を行ったところ、C57BL/6 より分離した膵腺房細胞を用いた ADM assay では BMP が ADM 形成を亢進し、TGF-beta が阻害した(図3)。

図3 BMPs と TGF-beta の ADM 形成への影響



また TGFBR2 ノックアウトマウスより分離した膵腺房細胞と TGFBR2 正常の腺房細胞を比較すると、TGFBR2 ノックアウトにより ADM 形成が亢進した。そのメカニズムとして、TGFBR2 ノックアウトで BMP シグナルが亢進することが分かった(図4)。

図4 TGFBR2 ノックアウトで ADM 亢進



In vivo では膵発癌モデルに BMP 阻害剤を早期投与して ADM 形成、PanIN 形成への影響を検討したが、有意な差は認めなかった。また PanIN マウス (Ptf1acre/+; LSL-KrasG12D/+) へのセルレイン投与で ADM・PanIN 形成を誘導するセルレイン誘発性 ADM で BMP シグナルについて検討したところ、セルレイン誘発性 ADM では、定量 PCR で BMP リガンドの発現が増加してお

り、またウェスタンブロットで Smad1/5/8 のリン酸化亢進を認めた。また BMP 阻害剤の投与でセルレイン誘発性 ADM の形成への影響を評価したが、BMP 阻害剤で ADM 形成に影響を与えなかった。In vivo で BMP 阻害剤の影響が出なかったが、BMP 阻害剤の投与量や投与経路、半減期の長さの問題もあると考えられた。

(2)PanIN マウスモデルから樹立した PanIN 細胞において BMPR2 をノックダウン、BMP7 を恒常発現し、in vitro、in vivo における細胞の表現型の相違、細胞内の主要なシグナル伝達系への影響を検討した。In vitro では血清のある状態では表現型に差が出なかったが、血清のない状態では BMP 投与で接着能が亢進し、BMP7 強制発現株でも同様に接着能が亢進、ノックダウンでは接着能が低下した。In vivo ではヌードマウスへの皮下腫瘍モデルで BMPR2 ノックダウン細胞株がコントロールに比較して腫瘍が縮小し(図5)、BMP7 強制発現株がコントロールに比較して腫瘍が増大した(図6)。

図5 皮下腫瘍モデルで BMPR2 ノックダウンで腫瘍縮小

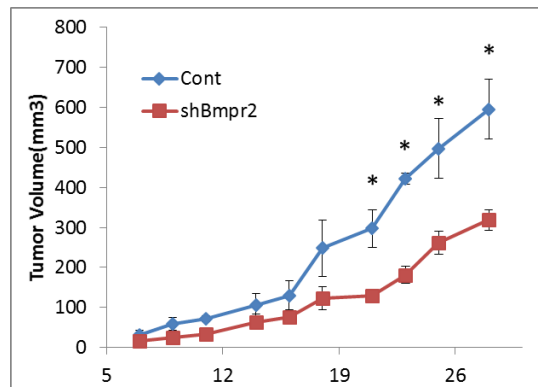
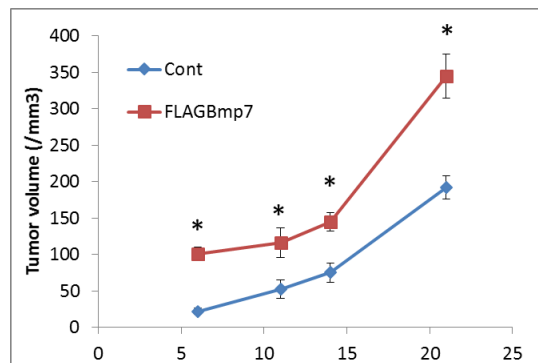


図6 皮下腫瘍モデルで BMP7 強制発現で腫瘍増大



我々の樹立した膵発癌マウスは、ヒト膵癌の臨床像・組織像をよく近似するモデルであり、そこから得られた結果と既報とを併せると BMP はまさに膵癌の自然史全般に寄与する重要な分子であることが示唆される。このような多面的な機能を持つ分子の機能解析を臨床に近いモデルを用いて検討を加えるこ

とで、その結果は、臨床応用に向けて大きなインパクトを持つものとなり、最難治癌である膵癌の発癌進展機序の解明、および治療につながるものとなる。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 宮林弘至 膵癌における BMP シグナルの役割の検討 第 25 回消化器癌発生学会総会 2014 年 11 月 14 日 福岡

② Koji Miyabayashi A role of BMP signaling in pancreatic cancer. BMP Berlin 2014, Berlin, Germany, September16-20 2014

③ Koji Miyabayashi A role of BMP signaling in pancreatic cancer. An AACR Special Conference Pancreatic Cancer, New Orleans, LA, May18-21 2014

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮林弘至 (MIYABAYASHI, Koji)

東京大学医学部付属病院特任臨床医

研究者番号 : 50634961

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :