

## 論文の内容の要旨

論文題目 スキルス胃癌の進展における BMP シグナルの機能解析

指導教員 宮園浩平教授

東京大学大学院医学系研究科

平成19年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 白井陽太郎

Bone morphogenetic protein (BMP)は transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、activin、inhibin、nodal などとともに TGF- $\beta$ ファミリーに属するサイトカインのひとつであり、軟骨や骨の形成を誘導する以外にも、歯、腎臓、毛髪などの発生や造血細胞、神経細胞などの分化、鉄代謝や血管形成の制御など、様々な臓器において多彩な生理学的機能を示す。一方、腫瘍抑制因子としてよく知られている TGF- $\beta$ と比較して、BMP の発癌や癌の進展における役割は、明確になっていないものが多い。私も参画した先行研究により、TGF- $\beta$ シグナルが腫瘍血管新生を抑制することで、スキルス胃癌の進展に抑制的に作用していることが判明した。これを受けて、本研究では、BMP とスキルス胃癌の進展との関連性について、特に BMP-2/4 グループの機能に着目して、ヒトスキルス胃癌細胞株を用いて *in vitro*、*in vivo* の両面から解析をすすめ、難治癌であるスキルス胃癌の新たな分子標的の探索を試みた。

まず、ヒトスキルス胃癌細胞株 OCUM-12、HSC-39、OCUM-2MLN において、半定量的 RT-PCR (Reverse transcription polymerase change reaction)により、BMP/TGF- $\beta$ シグナルを伝達するために必要な伝達構成因子である I 型受容体、II 型受容体、Smad の発現が認められた。また、*BMP2* もしくは *BMP4* の少なくともどちらかが発現していることも確認された。OCUM-2MLN 細胞では他の二つの細胞株と比べて一部の BMP シグナル構成因子の発現量が少ない傾向を認めた。

次に、OCUM-12 細胞、HSC-39 細胞、OCUM-2MLN 細胞において、BMP/TGF- $\beta$ 応答性を調べた。BMP サブグループをそれぞれ代表した BMP-4、BMP-6、BMP-9 の刺激により、BMP の特異型 Smad である Smad1、Smad5、Smad8 のリン酸化がすべての細胞で誘導された。一方、BMP の阻害剤である Dorsomorphin (DM)により Smad1/5/8 のリン酸化が抑制された。また TGF- $\beta$ 1により、TGF- $\beta$ の特異型 Smad である Smad2 のリン酸化が誘導され、HSC-39 細胞では Smad1/5/8 のリン酸化も誘導された。しかし、BMP による Smad2 のリン酸化の誘導は殆ど見られず、BMP シグナルと TGF- $\beta$ シグナルとの交絡は殆どないことも確認された。BMP の標的遺伝子である *ID3* (inhibitor of DNA binding 3)の発現を定量的 real-time RT-PCR を用いて評価したところ、BMP-4 により *ID3* の発現が誘導された。一方、*ID3* の発現が DM により抑制された。これらの結果より、スキルス胃癌細胞株では、自己分泌的に BMP-2/4 が産生されており、内因的な BMP シグナルが伝達し、働いている可能性が考えられた。

スキルス胃癌細胞の BMP-2/4 グループのシグナル伝達を破綻させた場合の影響を調べるため、レンチウイルスを用いて、BMP-2/4 の I 型受容体である activin receptor-like kinase (ALK)3 の dominant-negative form (dnALK3)を OCUM-12 細胞と HSC-39 細胞に恒常的に発現させた。コントロールの GFP 発現株と比較して、dnALK3 発現株では、BMP-4 による Smad1/5/8 のリン酸化と *ID3* の発現誘導が強く抑制されることを確認した。dnALK3 の発現により、*in vivo* において GFP 発現株より大きい皮下腫瘍を形成し

た。しかし、dnALK3により線維組織や血管の割合に顕著な変化が生じることはなく、BMPシグナルがスキルス胃癌の腫瘍間質にもたらす影響は強くないと思われた。また、先行研究でTGF- $\beta$ がスキルス胃癌においてTSP-1 (thrombospondin-1)、TIMP2 (tissue inhibitor of metalloproteinase 2)の発現を制御することが示されている。しかし、これらの遺伝子のBMP-4による発現制御は、OCUM-12細胞とHSC-39細胞で共通に観察されなかった。

次に、BMP-4存在下の細胞増殖試験により、OCUM-12細胞、HSC-39細胞がBMP-4刺激により *in vitro* において顕著な増殖抑制を示すことがわかった。BMPは特定の癌細胞のアポトーシスを誘導することが知られている。しかし、BMP-4刺激を行ってもOCUM-12細胞とHSC-39細胞でのPARP (Poly (ADP-ribose) polymerase)のcleavageは誘導されず、またOCUM-12細胞でのDNAが断片化した細胞の割合はBMP-4により増加しなかった。一方で、BMP-4により、OCUM-12細胞とHSC-39細胞のRB (Retinoblastoma protein)のリン酸化が減少していることがわかった。また、BMP-4によりOCUM-12細胞でのKi67陽性細胞数が減少することがわかった。さらに、Flow cytometryにより細胞周期を解析したところ、BMP-4によりOCUM-12細胞のG0/G1期にある細胞の割合が増加し、G2/M期、S期にある細胞の割合が減少することがわかった。以上の結果より、BMP-4はスキルス胃癌細胞のアポトーシスを誘導するのではなく、スキルス胃癌細胞の細胞周期を停止することで、増殖を抑制していることが示唆された。

BMP-4がスキルス胃癌細胞の細胞周期を停止させるメカニズムを調べるため、細胞周期の進行を司るCyclin dependent kinases (CDK)アクチベーターもしくはインヒビターの発現量の変化を定量的real-time RT-PCRを用いて評価した。そのなかで、OCUM-12細胞とHSC-39細胞の両方の細胞に共通して、BMP-4によりCDKN1Aの発現が誘導されていた。TGF- $\beta$ 1もこれらのスキルス胃癌細胞ではCDKN1Aの発現誘導

を認め、一部のスキルス胃癌細胞では、TGF- $\beta$ だけではなく BMP-4 も *CDKN1A* の転写を誘導し、細胞周期を停止させるという仮説を持つに至った。

次に、スキルス胃癌細胞における BMP-4 による p21 の発現制御機構を調べた。BMP は様々な種類の細胞で、mitogen-activated protein kinase (MAPK) や phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の活性を調節する non-Smad pathway の関与が報告されている。しかし、これらの阻害剤により BMP-4 による OCUM-12 細胞の *CDKN1A* の発現誘導が消失することはなかった。一方で、内因性の Smad4 がノックダウンされた OCUM-12 細胞では、BMP-4 による *CDKN1A* mRNA の発現誘導ならびに p21 タンパクの発現誘導が抑制されていた。これらの結果より、スキルス胃癌細胞において BMP-4 は non-Smad pathway ではなく、Smad pathway を介して p21 の発現を誘導することが示唆された。さらに、タンパク合成阻害剤である cycloheximide (CHX) を添加し、新規のタンパクの合成が阻害された条件では、HSC-39 細胞において、BMP-4 による *CDKN1A* の発現誘導が部分的な抑制を受けることが確認された。一部のスキルス胃癌細胞においては、新規合成タンパクを介して BMP-4 は *CDKN1A* の発現を制御していると考えられた。ただし、一方では、*CDKN1A* の発現が、BMP-4 刺激後 1 時間という早期相から誘導され、スキルス胃癌細胞では *CDKN1A* が BMP-4 により直接的な発現制御も受けていると想定された。

次に、p21 を標的とする short hairpin RNA (shRNA) を OCUM-12 細胞と HSC-39 細胞に安定的に導入し、p21 発現を恒常的にノックダウンした。p21 のノックダウンにより、BMP-4 による RB のリン酸化の減少が見られなくなり、また BMP-4 による細胞増殖抑制が減弱された。以上の結果より、スキルス胃癌細胞において、p21 の発現誘導を介することで、BMP-4 が細胞増殖を抑制することが示唆された。

最後に、BMP-2/4 による ALK3 シグナルの活性によって、*in vivo* でのスキルス胃癌細胞の腫瘍形成が抑制される可能性について検討した。まず、テトラサイクリン誘導

により ALK3 の constitutively active form (caALK3)を恒常的に発現する HSC-39 細胞を作成した。これらの細胞では、Doxycycline により caALK3 が誘導され、HSC-39 細胞の増殖が非常に強く抑制された。また、BMP に対する反応性が低いと想定された OCUM-2MLN 細胞でも caALK3 恒常発現株を作成した。GFP 発現株と比較して、caALK3 発現株では、OCUM-2MLN 細胞の皮下腫瘍の形成が有意に抑制されることが観察された。これらの結果により、恒常的な ALK3 の活性化により、スキルス胃癌細胞の増殖・進展が *in vitro*、*in vivo* の両面において抑制されることがわかった。

以上の結果より、BMP-2/4 がスキルス胃癌細胞に p21 の発現を誘導し、スキルス胃癌の有力な腫瘍抑制因子として *in vivo* において機能する可能性が示唆された。