

令和元年5月31日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04706

研究課題名(和文) 悪性中皮腫のゲノム情報に基づく新規分子診断・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel molecular diagnostic and therapeutic tools based on genomic information of malignant mesothelioma

研究代表者

関戸 好孝 (SEKIDO, Yoshitaka)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学分野・副所長兼分野長

研究者番号：00311712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は極めて難治性の腫瘍である。その原因遺伝子の変異は主にがん抑制遺伝子でありNF2やBAP1遺伝子の異常が高頻度である。NF2の不活性化はTAZと呼ばれる遺伝子転写に係る分子を活性化し、インターロイキン1Bの発現を亢進させる。インターロイキン1Bを抑えることにより、悪性中皮腫の増殖を阻害すること明らかにした。さらに、BAP1遺伝子異常がある場合、別の遺伝子を不活性化させると細胞死を引き起こすことを見出した。これらの発見は悪性中皮腫に対する新たな治療戦略に応用される可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫はがん遺伝子のドライバー変異が極めて稀であり、キナーゼ阻害剤などの分子標的剤はほとんど奏功しない。がん抑制遺伝子の変異が主体である悪性中皮腫に対しては、全く別の治療戦略の構築が必要と考えられる。今回、NF2-ヒッポシグナル伝達系が不活性化することにより活性化されるシグナル伝達系(インターロイキン1B)を標的とするアプローチ、さらにBAP1遺伝子変異に対して合成致死の表現型を誘導する遺伝子を標的とするアプローチを見出すことができ、両者とも極めて有望な治療戦略であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma (MM) is a very aggressive tumor. The underlying key genetic mutations in MM cells mainly occur in several distinct tumor suppressor genes, which include the NF2 and BAP1 genes. In this project, we found that the inactivation of NF2 activates TAZ transcriptional coactivator, which results in expression of interleukin 1B. We also demonstrated that the suppression of IL1B inhibits MM cell proliferation. Meanwhile, we found that synthetic lethal phenotype is inducible in BAP1-mutated MM cells by targeting the other specific genes. These findings strongly suggested that different molecular approaches may be applied to develop new therapeutic modalities against MM.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：悪性中皮腫 ゲノム異常 シグナル伝達 新規治療戦略 がん抑制遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 悪性中皮腫はアスベスト曝露から 30-40 年の潜伏期を経て発症する極めて難治性の腫瘍である。本邦においてはアスベストの規制が遅れたため、今後、中皮腫の患者数の増加が見込まれ、死亡者数は 2020-2025 年ごろにピークを迎えることが予想されている。
- (2) 悪性中皮腫の原因遺伝子の変異は主にがん抑制遺伝子である。研究代表者は、神経線維腫症 2 型遺伝子 (NF2) の異常が悪性中皮腫において高頻度に認められることを世界に先駆けて明らかにした。さらに研究代表者らは NF2-Hippo シグナル伝達系に係わる LATS2 遺伝子が悪性中皮腫の新規がん抑制遺伝子であることを明らかにした。
- (3) 最近、染色体 3p に局在する BAP1 遺伝子が悪性中皮腫の約 25%において不活性化し、中皮腫におけるがん抑制遺伝子であることが報告された。脱ユビキチン化酵素である BAP1 はヒストン修飾に関わり遺伝子発現調節や DNA 修復に関与していることが示唆されている。
- (4) 現在まで中皮腫において明らかとなった頻度の高い遺伝子変異はすべてがん抑制遺伝子であり、活性型のがん遺伝子のドライバー変異の頻度は極めて低い。このため、既存のチロシナーゼ阻害剤などはほとんど有効性を示さず、中皮腫に対する効果的な分子標的治療法は未だ確立されていない。

## 2. 研究の目的

- (1) 悪性中皮腫において NF2-Hippo シグナル伝達系が高頻度に不活性化し、YAP1/TAZ 転写コアクチベーターが恒常的に活性化 (低リン酸化) している。YAP1 の悪性中皮腫における機能を明らかにしてきたが、YAP1 のホモログである TAZ については明らかになっていない。悪性中皮腫における TAZ の役割を明らかにし、新たな治療戦略を構築することを目的とする。
- (2) 主として腫瘍抑制遺伝子が不活性化し、がん遺伝子のドライバー変異が認められない腫瘍は従来の分子標的治療法の開発が極めて困難である。その場合、新たな戦略として、「合成致死」を利用した治療戦略が有望と考えられている。BAP1、LATS2 の変異を有する悪性中皮腫細胞株を用いて shRNA ライブラリースクリーニングを行い、それぞれの変異と合成致の死表現型を示す候補遺伝子を同定する。同定された遺伝子の分子機構を明らかにするとともに、それぞれの遺伝子が治療標的となりうるかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) 悪性中皮腫細胞株 23 株と不死化中皮細胞株 2 株を用いた。YAP、TAZ の発現量は抗 YAP/TAZ 抗体を用いてウエスタンブロットで評価した。TAZ のリン酸化レベルの測定には Phos-tag gel を使用した。遺伝子導入実験及びノックダウンの実験はレンチウイルスを利用した。In vivo 移植実験では生後 6 週間のヌードマウスを使用し、蛍光実体顕微鏡を用いて評価した。マイクロアレイ解析は SurePrint G3 Human GE 8X60K V2 kit を用いた。細胞運動能、浸潤能はそれぞれ cell culture insert、BD Matrigel TM Invasion chamber を用いて評価した。足場非依存的増殖能は軟寒天培地内のコロニー形成数を測定し評価した。
- (2) 合成致死スクリーニングに用いた細胞株は、BAP1 変異悪性中皮腫細胞株である NCI-H28 株およびコントロールとして NCI-H28 株に BAP1 を過剰発現させた細胞、および不死化中皮細胞株 MeT-5A に LATS1、LATS2 を標的とした shRNA をレンチウイルスで感染させノックダウンをした細胞、およびコントロールとして non-target shRNA を感染させた細胞であった。shRNA ライブラリーは、SIGMA 社の MISSION LentiPlex Human Pooled shRNA library を用いた。このライブラリーは約 16,000 遺伝子に対して 80,000 あまりの shRNA クローンを含んでおり、ほぼゲノムワイドのスクリーニングが可能であった。ライブラリーをそれぞれの細胞株に感染させ、培養後ゲノム DNA を回収し、各細胞に含まれている shRNA 配列を次世代シーケンサー (MiSeq、HiSeq) を用いて定量した。目的の合成致死表現型を示す遺伝子はコントロール株で数が多く変異細胞では優位に少ない shRNA 配列であることを指標とした。得られた候補遺伝子を個別にノックダウンして表現型を確認し、さらに解析する遺伝子を決定した。

## 4. 研究成果

(1) 悪性中皮腫における TAZ 転写コアクチベーターに関する検討

① 悪性中皮腫における YAP/TAZ の発現レベルを検討した。不死化中皮細胞株 2 株では YAP と TAZ の発現レベルはほぼ同程度であったが、悪性中皮腫細胞株 23 株の 61% で YAP に比べ TAZ の発現レベルが高かった。次に TAZ の活性化状態を評価したところ、悪性中皮腫細胞株 23 株の 65% で TAZ が活性化 (低リン酸化) 状態であった。悪性中皮腫細胞株 (Y-MESO-27 と Y-MESO-30) に対し TAZ をノックダウンした細胞 (shTAZ) とコントロール shRNA を導入した細胞 (shScr) を培養したところ、ノックダウン細胞において増殖能、運動能、浸潤能、足場非依存的増殖能の低下を認めた (図 1)。

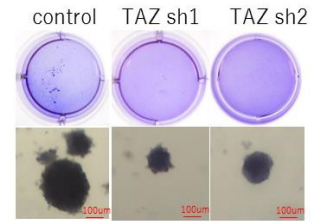


図 1 shTAZ による足場非依存増殖能の抑制。

図 1)。不死化中皮細胞に恒常的活性型 TAZS89A と野生型 TAZwt を導入したところ、TAZS89A において有意に増殖能等の亢進を認めた。GFP を共発現させると共に TAZwt あるいは TAZS89A を導入した HOMO-D4 細胞をヌードマウスの右胸腔内に移植して造腫瘍能を検討した。TAZS89A 発現細胞を導入したマウスの胸壁には GFP 陽性の結節を多数認め、腫瘍の増殖が確認された。

② 恒常的活性型 TAZS89A が中皮細胞を腫瘍化するメカニズムを明らかにするため、TAZS89A と TAZwt をそれぞれ導入した HOMO-D4 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。TAZ の恒常的活性化によって発現が上昇する遺伝子群上位 800 遺伝子を KEGG pathway のデータベースを用いて解析した。その結果、TAZ はサイトカインおよびその受容体をコードする遺伝子の発現を亢進することが明らかとなった。強く発現誘導される遺伝子には、IL1A、IL1B、IL6 が含まれており、どれが重要かを評価するためにそれぞれのサイトカイン遺伝子をノックダウンさせて細胞増殖能を評価した。その結果、IL1B のノックダウンが他と比べ有意に細胞増殖を抑制することを明らかにした (図 2)。TAZ が直接 IL1B 遺伝子の発現に関わるか評価するため、IL1B 遺伝子のプロモーター領域の DNA 断片をクローニングして dual luciferase reporter assay を行ったところ、強いシグナルが誘導された。活性型 TAZS89A は IL1B 遺伝子のプロモーター領域で TEAD 転写因子と結合し IL1B 遺伝子の転写を強く増強させることが明らかとなった。

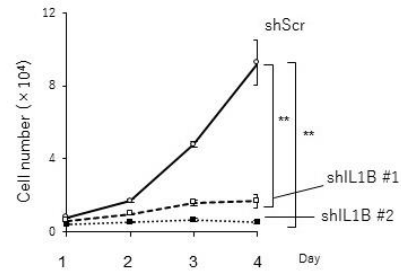


図 2. shIL1B による中皮腫細胞増殖抑制。

③ IL1B mRNA の発現上昇が中皮腫細胞に及ぼす影響を検討した。細胞培養上清を ELISA 法にて解析した結果、TAZS89A 導入の HOMO-D4 細胞株において IL1beta の分泌量の亢進がみられた。さらに、IL-1 antagonist (IL-1RA) を用い、悪性中皮腫細胞に対する抗腫瘍効果について検討した。TAZ が活性している悪性中皮腫細胞株 (Y-MESO-27) に IL-1RA を添加したところ細胞増殖の抑制がみられた。以上より、IL-1RA による IL1 シグナル経路の阻害は TAZ 活性を有する悪性中皮腫細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

(2) 合成致死表現型の解析

ライブラリースクリーニングの結果、BAP1 変異、LATS2 変異ともに 1,500 遺伝子あまりの候補遺伝子が抽出された。その中から、複数の shRNA が検出された遺伝子を優先的に個別にノックダウンして表現型を確認した結果、BAP1 変異に関しては、1) 脱ユビキチン化酵素 A、2) および DNA 損傷修復に関わるキナーゼ B が有力な候補遺伝子として抽出された。

A 遺伝子も B 遺伝子も BAP1 との関連は現在までのところ報告されておらず、これらの遺伝子につ

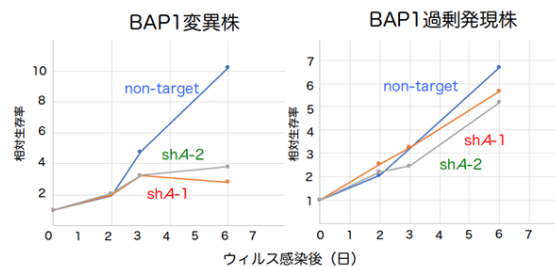


図 3. A 遺伝子は BAP1 と合成致死の表現型を示す。

いて慎重に検討を進めた。A 遺伝子に対しては RNA 干渉法にて検討したところ、合成致死が誘導された (図 3)。さらに、B キナーゼに対しては、阻害剤が入手可能であったため検討したところ、BAP1 変異細胞に対して用量依存的に有意に阻害効果が認められた (図 4)。

一方、LATS2 変異に関しては、RNA 代謝に関連する因子 C が合成致死の有力候補であることが明らかとなった。分子機構解析の過程で、因子 C は RNA 代謝以外にも他の細胞内の制御経路に関与することが知られているが、我々の検討では LATS2 遺伝子変異と合成致死の表現を示す際、因子 C が関与するテロメア制御機構が破綻することが理由であることが明らかとなった。

以上の結果は、悪性中皮腫で主に不活性化している腫瘍抑制遺伝子に対して、合成致死を利用した治療戦略が極めて有望であることを強く示唆した。

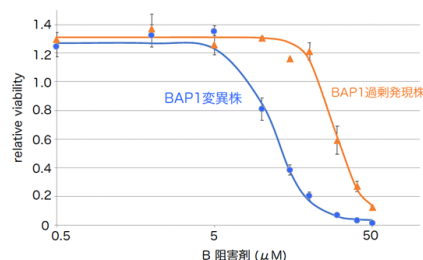


図 4. B 阻害剤は BAP1 変異細胞に合成致死を誘導する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Wu L, Dell'Anno I, Lapidot M, Sekido Y, Chan ML, Kohno M, Serre-Beinier V, Felley-Bosco E, de Perrot M: Progress of malignant mesothelioma research in basic science: A review of the 14th international conference of the international mesothelioma interest group (iMig2018). *Lung Cancer*. 2019;127:138-145. doi: 10.1016/j.lungcan.2018.11.034. Review. 査読有
2. Matsushita A, Sato T, Mukai S, Fujishita T, Mishiro-Sato E, Okuda M, Aoki M, Hasegawa Y, Sekido Y: TAZ activation by Hippo pathway dysregulation induces cytokine gene expression and promotes mesothelial cell transformation. *Oncogene*. 2019;38:1966-1978. doi: 10.1038/s41388-018-0417-7. 査読有
3. Hmeljak J, Sanchez-Vega F, Hoadley KA, Shih J, Stewart C, Heiman D, Tarpey P, Danilova L, Drill E, Gibb EA, Bowlby R, Kanchi R, Osmanbeyoglu HU, Sekido Y, (62 人中 14 番目) Takeshita J, Aburatani H, Robinson BW, Campbell P, Ladanyi M. : Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Discov*. 2018;8:1548-1565. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0804. 査読有
4. Ohara Y, Chew SH, Misawa N, Wang S, Somiya D, Nakamura K, Kajiyama H, Kikkawa F, Tsuyuki Y, Jiang L, Yamashita K, Sekido Y, Lipson KE, Toyokuni S: Connective tissue growth factor-specific monoclonal antibody inhibits growth of malignant mesothelioma in an orthotopic mouse model. *Oncotarget*. 2018 ;9:18494-18509. doi: 10.18632/oncotarget.24892. 査読有
5. Sato T, Sekido Y: NF2/Merlin Inactivation and Potential Therapeutic Targets in Mesothelioma. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 26;19. pii: E988. doi: 10.3390/ijms19040988. Review. 査読有
6. Sekido Y: Targeting the Hippo Pathway Is a New Potential Therapeutic Modality for Malignant Mesothelioma. *Cancers (Basel)*. 2018, 22;10. pii: E90. doi: 10.3390/cancers10040090. Review. 査読有
7. McCambridge AJ, Napolitano A, Mansfield AS, Fennell DA, Sekido Y, Nowak AK, Reungwetwattana T, Mao W, Pass HI, Carbone M, Yang H, Peikert T: Progress in the Management of Malignant Pleural Mesothelioma in 2017. *J Thorac Oncol*. 2018;13:606-623. doi: 10.1016/j.jtho.2018.02.021. Review. 査読有
8. Shigeeda W, Shibazaki M, Yasuhira S, Masuda T, Tanita T, Kaneko Y, Sato T, Sekido Y, Maesawa C: Hyaluronic acid enhances cell migration and invasion via the

- YAP1/TAZ-RHAMM axis in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget*. 2017;8:93729-93740. doi: 10.18632/oncotarget.20750. 査読有
9. Lin KC, Moroishi T, Meng Z, Jeong HS, Plouffe SW, Sekido Y, Han J, Park HW, Guan KL: Regulation of Hippo pathway transcription factor TEAD by p38 MAPK-induced cytoplasmic translocation. *Nat Cell Biol*. 2017;19:996-1002. doi: 10.1038/ncb3581. 査読有
  10. Kato T, Sato T, Yokoi K, Sekido Y: E-cadherin expression is correlated with focal adhesion kinase inhibitor resistance in Merlin-negative malignant mesothelioma cells. *Oncogene*. 2017;36:5522-5531. doi: 10.1038/onc.2017.147. 査読有
  11. Chew SH, Okazaki Y, Akatsuka S, Wang S, Jiang L, Ohara Y, Ito F, Saya H, Sekido Y, Toyokuni S: Rheostatic CD44 isoform expression and its association with oxidative stress in human malignant mesothelioma. *Free Radic Biol Med*. 2017;106:91-99. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.011. 査読有
  12. Tanaka K, Osada H, Murakami-Tonami Y, Horio Y, Hida T, Sekido Y: Statin suppresses Hippo pathway-inactivated malignant mesothelioma cells and blocks the YAP/CD44 growth stimulatory axis. *Cancer Lett*. 2017;385:215-224. doi: 10.1016/j.canlet.2016.10.020. 査読有
  13. Wang S, Jiang L, Han Y, Chew SH, Ohara Y, Akatsuka S, Weng L, Kawaguchi K, Fukui T, Sekido Y, Yokoi K, Toyokuni S: Urokinase-type plasminogen activator receptor promotes proliferation and invasion with reduced cisplatin sensitivity in malignant mesothelioma. *Oncotarget*. 2016;7:69565-69578. doi: 10.18632/oncotarget.11829. 査読有

[学会発表] (計 22 件)

1. 向井智美、松下明弘、佐藤龍洋、藤下晃章、三城恵美、奥田真帆、青木正博、関戸好孝「悪性中皮腫における Hippo 経路の破綻による腫瘍進展機構」 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
2. 村上優子、天野美希、小木曾杏奈、清成信一、紅朋浩、田部陽子、金田典雄、門松健治、三井田孝博、村上浩士、関戸好孝「悪性中皮腫における BAP1 遺伝子変異に対する合成致死遺伝子の網羅的探索」 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年
3. 竹下純平、辰野健二、松本大地、栗林康造、近藤展行、長谷川誠紀、佐藤鮎子、辻村亨、大多茂樹、河上祐、中野孝司、関戸好孝、油谷浩幸 「255 症例の悪性胸膜中皮腫の網羅的遺伝子解析」 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年
4. 村上優子、清成信一、田部陽子、門松健治、三井田孝博、関戸好孝「悪性中皮腫における BAP1 遺伝子変異に対する合成致死遺伝子の網羅的探索」 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年
5. 向井智美、佐藤龍洋、三城 (佐藤) 恵美、青木正博、藪田紀一、関戸好孝「悪性中皮腫において LATS2 は O-GlcNAc 化を抑制する」 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年
6. 佐藤龍洋、向井智美、関戸好孝「悪性中皮腫における Rheb-SmgGDS-mTOR シグナル伝達経路の解析」 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年
7. 向井智美、松下明弘、佐藤龍洋、藤下晃章、青木正博、関戸好孝「IL-1 受容体拮抗薬は Hippo 経路の破綻した悪性中皮腫細胞の進展を抑制する」 第 22 回日本がん分子標的治療学会 2018 年
8. 関戸好孝「TAZ Activation by NF2-Hippo Pathway Dysregulation Induces Cytokine Expression and Provides Growth Advantage to Mesothelioma」 iMig2018 2018 年
9. 関戸好孝「悪性中皮腫の遺伝子異常とその特性」 中皮腫シンポジウム “悪性中皮腫の診断/治療の最前線” 2018 年
10. Sekido Y, Matsushita A, Mukai S, Sato T. 「Transcriptional coactivator TAZ enhances malignant phenotypes of mesothelioma cells」 EMBO ワークショップ 2017 年
11. Sekido Y. 「Mesothelioma: Bench to Bedside」 第 18 回世界肺癌学会議 2017 年

12. Sekido Y. 「New Biological Insights」 第 18 回世界肺癌学会議 2017 年
13. 松下明弘、長谷川好規、関戸好孝 「Transcriptional co-activator TAZ enhances malignant phenotypes of mesothelioma cells」 第 59 回日本肺癌学会学術集会 2017 年
14. 加藤毅人、横井香平、関戸好孝 「Merlin 陰性悪性中皮腫において E-cadherin の発現は VS-4718 の耐性と相関する」 第 59 回日本肺癌学会学術集会 2017 年
15. 佐藤龍洋、加藤毅人、関戸好孝 「Merlin を発現しない中皮腫において、FAK 阻害剤への抵抗性は E-cadherin 発現量と相関する」 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年
16. 向井智美、松下明弘、佐藤龍洋、藤下晃章、青木正博、関戸好孝 「転写共役因子 TAZ は、IL-1beta の転写活性を介して悪性中皮腫の進展を促進する」 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年
17. 竹下純平、山本尚吾、辰野健二、白石友一、大搦泰一郎、栗林康造、近藤展行、長谷川誠紀、佐藤鮎子、辻村亨、中野孝司、関戸好孝、油谷浩幸 「243 症例の悪性胸膜中皮腫の統合的ゲノム解析」 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年
18. 関戸好孝 「悪性中皮腫における遺伝子異常と治療標的の探索」 第 27 回日本サイメトリー学術集会 シンポジウム 2017 年
19. 関戸好孝 「中皮腫発生に関わる遺伝子学的アプローチ」 -中皮腫シンポジウム- 悪性胸膜中皮腫の診断/治療の最前線” 2016 年
20. 竹下純平、関戸好孝、油谷浩幸 (13 名中 12 番目) 「悪性胸膜中皮腫の分子プロファイル」 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年
21. 関戸好孝 「悪性中皮腫における遺伝子異常」 第 7 回 JMIG 研究会 2016 年
22. Yoshitaka Sekido 「Constitutive YAP activation induces malignant phenotypes of immortalized mesothelial cells」 iMig 2016 2016 年

〔図書〕 (計 3 件)

1. 関戸好孝 (分担執筆) 肺癌診療ガイドライン 悪性胸膜中皮腫・胸腺腫瘍含む 2018 年版 金原出版 394 ページ
2. 関戸好孝 (分担執筆) 中皮腫瘍取扱い規約 第 1 版 2018 年 11 月 金原出版、136 ページ
3. 関戸好孝 中皮腫の発がん機構・遺伝子異常-解明されつつある中皮腫のゲノム異常- 「悪性中皮腫 UPDATE」 医学のあゆみ 2017 年 4 月 8 日 医歯薬出版 135-144

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 [http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi\\_shuyo/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi_shuyo/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：村上 (渡並) 優子  
 ローマ字氏名：(MURAKAMI (Tonami), Yuko)  
 所属研究機関名：順天堂大学  
 部局名：医学部  
 職名： 准教授  
 研究者番号 (8 桁)：70405174

※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。