

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16360

研究課題名（和文）TMEPAIファミリーによるYAP抑制機構の解明：悪性中皮腫根治を目指して

研究課題名（英文）Elucidation of TMEPAI family-mediated inhibitory mechanism for YAP activity

研究代表者

中野 なおこ（Nakano, Naoko）

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：50733218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：悪性中皮腫において活性化が報告されているYAPとTGF-シグナルをTMEPAIファミリー分子（特にC18ORF1）によって抑制できる結果を得ていたことから、その抑制メカニズムを明らかにすることを目的として検討を行ったが、詳細な分子機構の解明までは至らなかった。しかしながら、YAPの活性化が報告されている悪性中皮腫細胞にC18ORF1を高発現させると細胞増殖能や軟寒天培地によるコロニー形成能を抑制できるなどの結果が得られたことから、TMEPAIファミリーが悪性中皮腫の腫瘍形成能を抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫細胞にC18ORF1を高発現させると、細胞増殖能が抑制された。また、軟寒天培地を用いたコロニー形成アッセイにおいてもC18ORF1を高発現させることによって悪性中皮腫細胞によるコロニー形成能が抑制された。これらの結果は、C18ORF1によって悪性中皮腫細胞の進展を抑制できる可能性を示唆している。したがって、C18ORF1によるYAP活性抑制メカニズムを明らかにできれば、YAPの活性化が報告されている悪性中皮腫だけでなく、他のYAPの活性化が原因となっている疾患に対する新規治療薬の開発の礎となる。

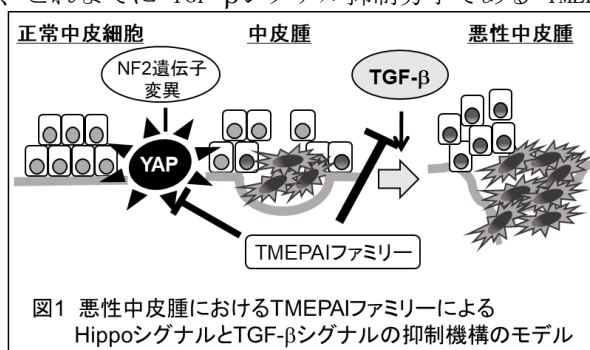
研究成果の概要（英文）：We have already got the results that both YAP and TGF- signals can be inhibited by TMEPAI family (particularly C18ORF1). In this study, we focused on how TMEPAI family inhibits YAP signal in detail. As results, the overexpression of C18ORF1 in mesothelioma cells exhibited inhibition of cell proliferation and colony formation. Therefore, we showed that TMEPAI family including C18ORF1 is capable of suppressing tumorigenicity of malignant mesothelioma cells although we could not address TMEPAI family-mediated inhibitory mechanism for YAP signal in detail.

研究分野：TGF-シグナルとがん

キーワード：TMEPAIファミリー TMEPAI C18ORF1 YAP 悪性中皮腫

1. 研究開始当初の背景

YAP の恒常的な活性化は、様々ながんで報告されている。本研究では、がん遺伝子として知られ、転写コアクチベーターである YAP の活性を抑制する分子機構の解明を目的とする。本研究が遂行されれば、YAP の異常な活性化が原因とされているがんの治療法開発の基盤研究となる。特に申請者は、日本で近年増加傾向である悪性中皮腫に着目している。現在までに、悪性中皮腫細胞の約半数の症例で、Hippo シグナル経路内に存在する NF2 遺伝子の不活性化に伴う、YAP の恒常的な活性化が報告されている。加えて、TGF- β シグナルも悪性中皮腫細胞の細胞増殖促進に働いていることが見出されている。申請者は、これまでに TGF- β シグナル抑制分子である TMEPAI ファミリー (特に C18ORF1) によって YAP の活性が抑制される結果を得ている。そこで、TMEPAI ファミリーが悪性中皮腫において YAP 及び TGF- β シグナルを抑制する分子機構を解明することで、悪性中皮腫の進展を抑制することを目指しており、① TMEPAI ファミリーによる YAP 活性の抑制分子機構を明らかにすること、さらに、② 実際に、TMEPAI ファミリーによって悪性中皮腫細胞の増殖や腫瘍形成能を抑制することができることを明らかにする (図 1)。



2. 研究の目的

TGF- β シグナル抑制分子である TMEPAI ファミリーによって、YAP の機能を抑制できる可能性が示唆されたため、その分子抑制機構を明らかにするとともに、実際に TMEPAI ファミリーによって悪性中皮腫の進展を抑制できることを *in vitro*、*in vivo* で検討する。

3. 研究の方法

TMEPAI ファミリー (C18ORF1) による YAP シグナル抑制分子メカニズム

- ① 既に C18ORF1 によって YAP のユビキチン化が促進される結果を得ていたため、C18ORF1 と協調して YAP のユビキチン化を促進する E3 ユビキチンリガーゼを見出すために、候補分子と C18ORF1 が協調作用し、YAP のユビキチン化を促進するかを免疫沈降法により検討した。
- ② 悪性中皮腫細胞およびイヌ腎臓尿細管上皮細胞を用いて、C18ORF1 ならびにその変異体発現細胞株を樹立し、YAP の細胞質・核間での局在変動や YAP タンパク質 (及びリン酸化 YAP) 発現量の影響を検討した。また、TGF- β シグナル伝達分子である Smad2 のリン酸化への影響も確認した。
- ③ ②で樹立した細胞を用いて、YAP 標的遺伝子の発現への影響を検討し、C18ORF1 によって内在性の YAP の活性を抑制できるかを検討した。

TMEPAI ファミリーによる悪性中皮腫進展に対する検討

- ④ ②で樹立した悪性中皮腫細胞に C18ORF1 を高発現させた細胞を用いて細胞増殖能および軟寒天培地コロニー形成アッセイによりコロニー形成能を検討し、C18ORF1 により悪性中皮腫細胞の腫瘍形成能が抑制できるかを検討した。
- ⑤ C18ORF1 のノックアウトした悪性中皮腫細胞を Crisper/Cas9 により樹立し、④と同様な実験を行った。
- ⑥ ルシフェラーゼ遺伝子を導入した悪性中皮腫細胞を樹立し、C18ORF1 を高発現させた細胞を作製した。コントロール細胞または C18ORF1 高発現悪性中皮腫細胞をヌードマウスの胸腔内に移植して、腫瘍形成能への C18ORF1 による影響を *in vivo* イメージングにより観察した。

4. 研究成果

- ① C18ORF1 によって YAP のユビキチン化が促進される結果を得ていたが、C18ORF1 にはユビキチンリガーゼ活性はないことから、C18ORF1 が他の分子と協調して YAP をユビキチン化していると推測し数種類の候補分子について検討したが、C18ORF1 との協調作用は認められなかった。次に、C18ORF1 に結合する分子を網羅的に探索するために、プロテインアレイを用いて、C18ORF1 に結合する候補分子が得られたため、今後これら分子について検討を行う。
- ② コントロール細胞と C18ORF1 高発現悪性中皮腫細胞における内在性の YAP タンパク質発現量および YAP のリン酸化状態を比較すると、YAP タンパク質発現量は同程度であったが、コントロール細胞と比較して、C18ORF1 高発現悪性中皮腫細胞における YAP のリン酸化状態が亢進する結果が得られた。また、TGF- β シグナル伝達分子である Smad2 のリン酸化はコントロールと比較して抑制されていた。一方で、イヌ腎臓尿管上皮細胞 MDCK 細胞に C18ORF1 を高発現させた細胞を樹立し、YAP の細胞内局在への C18ORF1 による影響を検討すると、コントロール細胞と比較して、C18ORF1 高発現細胞において YAP の核移行が抑制されている結果が得られた。
- ③ ②で樹立した細胞を用いて YAP 標的遺伝子の発現への C18ORF1 による影響を検討したが、C18ORF1 による YAP 標的遺伝子発現に対する明らかな抑制は認められなかった。
- ④ ②で樹立した細胞を用いて細胞増殖能や軟寒天培地コロニー形成アッセイを検討した結果、コントロール細胞と比較して、C18ORF1 高発現悪性中皮腫細胞では、細胞増殖能および軟寒天培地を用いたコロニー形成能が抑制された。
- ⑤ Crisper/Cas9 を用いて悪性中皮腫細胞の内在性の C18ORF1 を欠損させた細胞を樹立し細胞増殖能や軟寒天培地コロニー形成アッセイを検討したが、コントロールと比較して細胞増殖やコロニー形成能が促進されるという結果は得られなかった。
- ⑥ ルシフェラーゼ遺伝子を導入した悪性中皮腫細胞を樹立し、C18ORF1 を高発現させた細胞を作製した。コントロール細胞または C18ORF1 高発現悪性中皮腫細胞をヌードマウスの胸腔内に移植して、腫瘍形成能への C18ORF1 による影響を *in vivo* イメージングにより観察した結果、C18ORF1 による有意な腫瘍形成抑制能は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawamoto R, Nakano N, Ishikawa H, Tashiro E, Nagano W, Sano K, Irie M, Ikuta M, Kishi F, Nakane T, Naito M, Itoh S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Narciclasine is a novel YAP inhibitor that disturbs interaction between YAP and TEAD4.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BBA advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbadv.2021.100008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野なおこ、田代悦、永野和果、内藤幹彦、伊東進
2. 発表標題 YAPシグナルを標的とした新規抗がん剤の開発
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永野和果、内藤幹彦、伊東進、中野なおこ、田代悦
2. 発表標題 中皮腫進展抑制を目指したSNIPER化合物の開発
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野なおこ、正田卓司、内藤幹彦、伊東進
2. 発表標題 がん遺伝子YAPタンパク質を分解する抗がん剤開発
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野なおこ、内藤幹彦、伊東進
2. 発表標題 YAPシグナルを標的とした新規抗がん剤の開発
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永野和果、河本理恵、福田和男、正田卓司、山崎龍、中根孝久、岡本巖、内藤幹彦、中野なおこ、伊東進
2. 発表標題 YAPを標的としたプロテインノックダウン法による中皮腫進展抑制
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山浦瑞貴、堤優、中原千絵、川島理沙、中野なおこ、伊東進
2. 発表標題 TMEPAIファミリーによる中皮腫悪性化抑制
3. 学会等名 2019年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永野和果、河本理恵、福田和男、正田卓司、山崎龍、中根孝久、岡本巖、内藤幹彦、中野なおこ、伊東進
2. 発表標題 YAPを標的としたプロテインノックダウン法の確立
3. 学会等名 2019年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野なおこ、正田卓司、内藤幹彦、伊東進
2. 発表標題 プロテインノックダウン法 (SNIPER) を用いた新規YAP阻害剤の開発
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------