

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592788

研究課題名(和文) 癌増殖での Hippo pathway の働きと間質造成における作用

研究課題名(英文) Hippo signaling pathway regulates proliferation and ECM production in cancer cells

研究代表者

藤井 万紀子 (Fujii, Makiko)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・主任研究員

研究者番号：70406031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo pathway によってリン酸化制御を受けるYes-associated protein (YAP)は、細胞の増殖期において核内移行し、標的遺伝子を活性化する。我々はTGF- β シグナルの伝達物質Smad3と結合し、connective tissue growth factor (CTGF)発現を調節することを見出した。YAPがTGF- β シグナルと協調的に働くことにより、CTGFのプロモーター上にYAP/TEAD4/Smad3/p300の複合体が形成されてCTGFの転写活性を促進し、がん細胞の増殖を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hippo signaling pathway inhibits the transcriptional coactivation activity of Yes-associated protein (YAP) by inducing phosphorylation and cytoplasmic retention of YAP. In this study, we have found a functional interaction between the Hippo and TGF- β pathways in regulating connective tissue growth factor (CTGF). Expression of CTGF in malignant tumor cells was induced by the formation of a YAP/TEAD4/Smad3/p300 complex on the CTGF promoter. Our data suggest that CTGF is an important modulator of tumor cell growth.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 病態科学系歯科・歯科放射線学

キーワード：YAP TGF- β Hippo signal CTGF

1. 研究開始当初の背景

最近新たな oncogene として注目を集めることになった YAP は、癌抑制遺伝子 NF2 によって活性化される Hippo pathway が負に機能調節する転写コアクチベーターであり、器官形成時にサイズを決める因子として最初にショウジョウバエで Yki として同定された。Yki はその後、Wts キナーゼ蛋白質により直接リン酸化をうけ機能を抑制されることがわかった。ショウジョウバエでの Hippo pathway の構成因子は哺乳類で高度に保存されており、YAP は Wts のホモログであり癌抑制遺伝子 Lats から直接リン酸化され、核内に保持される。YAP が、増殖促進作用を持つことが示唆する報告が数多くなされている。YAP を過剰発現させるとショウジョウバエの器官が大きくなり、マウス由来線維芽細胞である NIH-3T3 細胞の細胞密度を上げたシャーレの中で細胞培養を行うと、増殖中では YAP が核の中に認められるが、confluent になり contact inhibition が起こると核外に移行し増殖が止まる。NF2 が Mst、Lats を始めとする Hippo pathway を活性化し、Lats が YAP をリン酸化することによって YAP を核外に放出する。

いくつかのヒト癌細胞において YAP の核内での局在が明らかにされた。YAP は乳癌をはじめとする様々な癌において核内での発現が認められているが、必ずしもこれらのすべての癌で NF2 や Hippo pathway の構成因子の欠失が認められているわけではない。これらのことから、YAP は oncogene としての機能を持つことが示唆され、口腔領域の悪性腫瘍で、YAP がどのような発現パターンや機能を示すかを調べるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は悪性腫瘍の増殖とその増殖を補助する周囲間質組織との相互作用のメカニズムを解明し、早期の有効な治療法開発に結び付けることを目的としている。その一つのアプローチとして最近注目を集めている新たな oncogene の一つである YAP とその上流で YAP の局在を制御する Hippo pathway について腫瘍細胞そのものと、周囲の間質細胞双方での働きを検討する。YAP が直接転写に関わっているたんぱく質としては connective tissue growth factor (CTGF) が知られている。繊維芽細胞での YAP の働きは TGF- β シグナルのそれと似通った部分があり、CTGF が変化の中心的役割を担っていることも考えられる。本研究では扁平上皮癌細胞、骨肉腫細胞を

中心とする口腔がん、線維芽細胞双方での YAP の働きを検討する。

3. 研究の方法

分子標的治療は、癌患者での治療の体力的負担を減らし尚且つ有効な手段として、種々の癌で実際に行われ、良好な治療成績をおさめるものも出てきている。しかしながら癌は由来の器官などによりその性質は多岐にとんでおり、それぞれの癌種におけるきめ細やかな検討が必要であると考えられる。最近新たに oncogene として発見された YAP および Hippo pathway は口腔領域の腫瘍においても重要な働きをすることが示唆されている。申請者らの現在までの研究により、YAP が細胞増殖において強力な作用を持つことは明白である。本研究では、口腔がん細胞のみならず増殖に強い影響を及ぼす周囲間質細胞にも着目し、癌組織全体での発現や制御を行うことで、新たな分子標的遺伝子としての YAP の役割を検討した。

口腔がんとして、扁平上皮癌細胞や、骨肉腫細胞における YAP や、YAP に発現の制御をうけ、間質造成に影響を及ぼす CTGF たんぱく質の発現をそれぞれ調べた。また、YAP と協調的に CTGF の発現を上昇させるサイトカインである TGF- β 処理を行い、がん細胞内のシグナルの伝達を確認する。更に YAP や CTGF を過剰発現させ、口腔がんの細胞増殖に与える影響を *in vitro* で検討した。YAP、NF2 をレンチウイルスベクターに組み込み、癌細胞に感染させる。更に short hairpin YAP を組み込んだレンチウイルスベクターを感染させ YAP たんぱく質の発現を阻害し、両者の細胞増殖に対する影響を MTT 法で検討する。細胞内に NF2 が存在すると Lats がリン酸化を受け、YAP を核外に移行させ転写活性を抑制する。更にこれらの経路に影響を受ける遺伝子の包括的な変化を検討する。

4. 研究成果

TGF- β は、上皮由来細胞では増殖抑制に働くが、非上皮由来細胞では増殖を促進する。我々はヒト胎児腎細胞由来 293 細胞と悪性中皮腫細胞を用いて TGF- β シグナルと YAP の機能上のクロストークについて調べたところ、YAP と TGF- β 双方によって転写制御される遺伝子が CTGF (Connective Tissue Growth Factor) や endothelin-1 など、少数の遺伝子であることを見出した。この CTGF のプロモーター領域を調べた結果、TGF- β のシグナル伝達因子 Smad2/3 の DNA 結合サイトと、TEAD 結合サイトが隣合わせに存在し、CTGF の発現を、TGF- β 刺激と YAP が協調的に促進する

可能性がることがわかった。この結果をもとに、更に解析を進めたところ Smad3、YAP と、転写のコアクチベーターである P300、更に DNA 結合領域を持ち、YAP と結合してその転写活性を促進させる TEAD の 4 つのタンパク質が複合体形成の際に互いの存在により結合を強めることをみだした (図 1)。

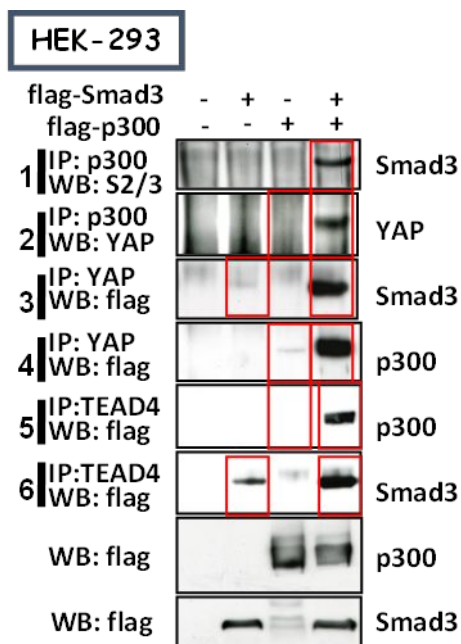


図1. TEADとP300はそれぞれYAPとSmad3の結合を強め、安定化させる (Fujii M et al. J Exp Med 2012)

更にレポーターアッセイや CHIP アッセイなどの結果により、プロモーター上で複合体を形成した Smad/YAP/TEAD/P300 が CTGF の転写活性を促進することがわかった (図 2)。

TGF-β は、上皮由来細胞では増殖抑制に働くが、非上皮由来細胞では増殖を促進する。口腔領域のがんとしては、扁平上皮癌が圧倒的多数を占めているが、非上皮由来細胞に起因するがんも珍しくない。上皮由来がんである扁平上皮癌では TGF-β により、悪性度が低い段階では増殖が抑制されることがわかっているので、一貫して TGF-β により促進作用を受けると考えられる非上皮由来骨肉腫細胞株を用いてまず実験を行ってみた。

TGF-β の口腔領域での非上皮由来がん細胞における増殖促進作用に関わる因子に興味を持ち、骨肉腫細胞である 143B 細胞、HOS 細胞を使用して実験を行った。これらの細胞では、TGF-β 処理を行うと Smad2 がリン酸化され、CTGF の発現の上昇が認められた。TGF-β 受容体の阻害剤を加えると、細胞増殖の低下が認められ、増殖が抑制された。骨肉腫細胞では、Hippo タンパク質の発現異常は特に認

められていないが、増殖期には核内での YAP の発現を認めた。143B 細胞、HOS 細胞を YAP、CTGF それぞれのタンパク質発現を siRNA で抑制すると、細胞増殖は抑制された。従って、悪性中皮腫のみならず、骨肉腫細胞においても、TGF-β、YAP、CTGF は、それぞれ細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが考えられた。

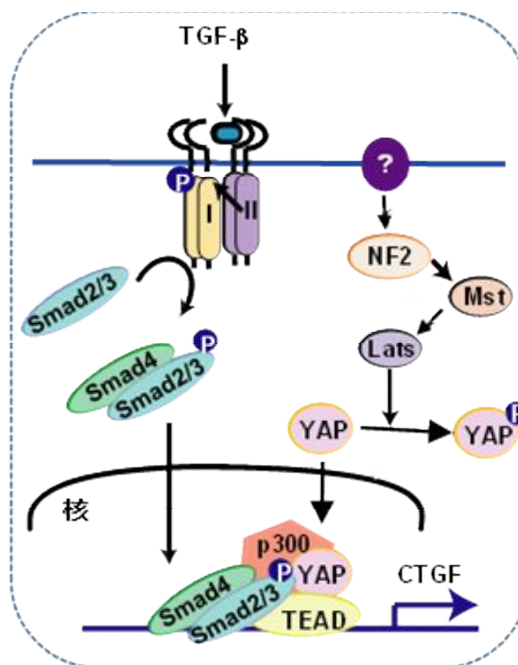


図2. TGF-β と Hippo signaling cascade のクロストーク

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 20 件)

1. Kim TA, Kang JM, Hyun JS, Lee B, Kim SJ, Yang ES, Hong S, Lee HJ, Fujii M, Niederhuber JE, Kim SJ. Smad7-Skp2 complex orchestrates c-Myc stability, impacting on the cytostatic effect of TGF-β. **J Cell Sci** 82:24-30 (2013)
2. Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y. A LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. **Oncogene** 2013 (accepted)
3. Jeon HS, Choi YY, Fukuoka J, Fujii M, Lyakh LA, Song SH, Travis WD, Park JY, Jen J. High expression of SNIP1 correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer and SNIP1

- interferes with the recruitment of HDAC1 to RB. **in vitro.Lung Cancer.** 82:24-30. (2013)
4. Okamoto Y, Shinjo k, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis Virus Infection Affects DNA Methylation in Mice with Humanized Livers. **Gastroenterology** 146: 562-72 (2013)
 5. Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa T, Mitsudomi T, Osada H, Hata Y, Sekido Y. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. **Lung Cancer** 83:23-9 (2014)
 6. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Taniguchi T, Yokoi K, Osada H, Sekido Y. Membranous expression of activated leukocyte cell adhesion molecule contributes to poor prognosis and malignant phenotypes of non-small-cell lung cancer. **J Surg Res.** 179:24-32 (2013)
 7. Fujii M, Nakanishi H, Toyoda T, Tanaka I, Kondo Y, Osada H, Sekido Y. Convergent signaling in the regulation of the connective tissue growth factor in malignant mesothelioma: TGF- β signaling and defects in the Hippo signaling cascade. **Cell Cycle.** Extra-view 11: 1-7 (2012)
 8. Fujii M: Exploration of a new drug that targets YAP **J Biochem.** Commentary 152: 209-11 (2012)
 9. Katsushima K, Shinjo K, Natsume A, Ohka F, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Kondo Y: Contribution of MicroRNA-1275 to Claudin11 Protein Suppression via a Polycomb-mediated Silencing Mechanism in Human Glioma Stem-like Cells. **J Biol Chem.** 287:27396-406 (2012)
 10. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: Activated Leukocyte Cell-Adhesion Molecule (ALCAM) Promotes Malignant Phenotypes of Malignant Mesothelioma. **J Thorac Oncol.** 7:890-9 (2012)
 11. Shinjo K, Okamoto Y, An B, Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido Y, Kondo Y: Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical character of lung adenocarcinoma. **Carcinogenesis.** 33:1277-85 (2012)
 12. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y: TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. **J. Exp. Med.** 209:479-94 (2012)
 13. Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E, Nakanishi H: Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK3 β /snail signaling pathway. **Br. J. Cancer** 106:1196-204 (2012)
 14. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii M, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) Promotes Malignant Phenotypes of Malignant Mesothelioma. **J Thorac Oncol.** 7:890-9 (2012)
 15. Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle promoting genes. **Oncogene.** 31:5117-22 (2012)
 16. Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumor. **Gut.** 61:392-401 (2012)
 17. Antonov AS, Antonova GN, Fujii M, ten Dijke P, Handa V, Catravas JD, Verin AD. Regulation of endothelial barrier function by TGF- β type I receptor ALK5: potential role of contractile mechanisms and heat shock protein 90. **J Cell Physiol.** 227:759-71 (2012)
 18. Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T: Epithelial to mesenchymal transition

in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. **J Thorac Oncol.** 6:1152-61 (2011)

19. Ju HX, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Kanemitsu Y, Komori K, Hirai T, Shimizu Y, Sano T, Sawaki A, Tajika M, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Ito H, Takeuchi I, Sekido Y, Kondo Y: Distinct Profiles of Epigenetic Evolution between Colorectal Cancers with and without Metastasis. **Am J Pathol.** 178:1835-46 (2011)
20. Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y: LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. **Cancer Res.** 71:873-83 (2011)

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 藤井万紀子, 田中一大, 近藤豊, 長田啓隆, 関戸好孝 非上皮由来がん細胞における TGF- β による腫瘍増殖促進作用 第 72 回 日本癌学会学術総会 横浜 2013.10.5
2. 深津明日樹, 田中一大, 新城恵子, 近藤豊, 藤井万紀子, 長谷川好規, 富沢健二, 光富徹哉, 長田啓隆, 畑裕, 関戸好孝 非小細胞肺癌における RASSF3 の発現解析 第 72 回 日本癌学会学術総会 横浜 2013.10.5
3. 田中一大, 長田啓隆, 藤井万紀子, 深津明日樹, 樋田豊明, 佐藤鮎子, 長谷川好規, 辻村亨, 関戸好孝 LIM ドメインを持つ AJUBA 蛋白質は, Hippo シグナル経路を介して悪性中皮腫細胞の増殖を抑制する 第 72 回 日本癌学会学術総会 横浜 2013.10.5
4. Fujii M, Nakanishi H, Toyoda T, Tanaka I, Kondo Y, Osada H, Sekido Y. Convergent signaling in the regulation of malignant mesothelioma growth through CTGF: TGF- β signaling and defects in the Hippo signaling pathway. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. Hawaii 2013.02.24
5. 勝島啓佑, 新城恵子, 大岡史治, 藤井万紀子, 長田啓隆, 関戸好孝, 夏目敦至, 近藤豊 Large intergenic non-coding RNA associated with stemness feature of glioma stem-like cell 平成 24 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 2013.02.0
6. Fujii M, Nakanishi H, Toyoda T, Tanaka I, Kondo Y, Osada H, Sekido Y. Convergent signaling in the regulation of malignant mesothelioma growth: TGF- β signaling and defects in the Hippo signaling pathway 2nd JSPS International TGF- β Symposium. 東京 2012.10.2
7. 田中一大, 長田啓隆, 藤井万紀子, 関戸好孝 A LIM-domain protein Ajuba suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. Global COE 第 4 回国際シンポジウム名古屋 2012.11.15
8. 勝島啓佑, 新城恵子, 大岡史治, 藤井万紀子, 長田啓隆, 関戸好孝, 夏目敦至, 柴田龍弘, 近藤豊 脳腫瘍幹細胞の分化に関わる lincRNA の網羅的解析及びその生化学的解析第 71 回 日本癌学会学術総会 札幌 2012.9.20
9. 大岡史治, 夏目敦至, 若林俊彦, 勝島啓佑, 新城恵子, 藤井万紀子, 長田啓隆, 関戸好孝, 近藤豊 膠芽腫マウスモデルを用いた p53, Nf1 欠失から引き起こされるエピジェネティクス異常の解析 第 71 回 日本癌学会学術総会 札幌 2012.9.20
10. 藤井万紀子, 豊田武士, 中西速夫, 近藤豊, 長田啓隆, 関戸好孝 悪性中皮腫における Hippo シグナリングの欠失と TGF- β の協調による CTGF の発現調節 第 71 回 日本癌学会学術総会 札幌 2012.9.20
11. 藤井万紀子 悪性中皮腫細胞の増殖における Connective Tissue Growth Factor (CTGF) の役割について 第 7 回肺癌分子病態研究会 東京 2012. 9.15
12. Sekido Y, Tanaka I, Osada H, Fujii M Hippo signaling pathway inactivation in malignant mesothelioma cells. iMig (international Mesothelioma interest group) 2012 Boston 2012.09.13
13. Katsushima K, Shinjo K, Natsume A, Ohka F, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Kondo Y. Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 suppression via polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program 2012 札幌 2012.09.01
14. 勝島啓佑, 新城恵子, 夏目敦至, 大岡史治, 藤井万紀子, 長田啓隆, 関戸好孝, 近藤豊 Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 suppression via polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. 第 6 回 日本エピジェネティクス研究会年会 東京 2012.05.14
15. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Hida T, Tsujimura T, Osada

- H, Sekido Y. TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway by inducing CTGF expression. American Association Cancer Research Annual Meeting 2012 Cicago 2012.4.2
16. Shinjo K, Okamoto Y, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Ito H, Hida T, Sekido Y, Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. American Association Cancer Research Annual Meeting 2012 Cicago 2012.4.2
17. Katsushima K, Shinjo K, Ohka F, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Natsume A, Kondo Y. Epigenetic regulation of miR-1275 through histone H3 lysine 27 trimethylation during human glioma stem-like cell differentiation. American Association Cancer Research Annual Meeting 2012 Cicago 2012.4.2
18. 藤井万紀子, 豊田武士, 中西速夫, 谷田部恭, 佐藤鮎子, 村上秀樹, 近藤豊, 近藤栄作, 樋田豊明, 辻村亨, 長田啓隆, 関戸好孝 悪性中皮腫細胞の増殖における TGF- β シグナルと hippo pathway の役割 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011.10.05
19. 新城恵子, 近藤豊, 岡本泰幸, 横山俊彦, 宇佐美範泰, 藤本伸一, 岸本卓巳, 樋田豊明, 藤井万紀子, 村上秀樹, 長田啓隆, 関戸好孝 肺腺癌の生物学的特性に関わる DNA メチル化異常の網羅的解析 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011.10.05
20. 勝島啓佑, 新城恵子, 藤井万紀子, 長田啓隆, 関戸好孝, 夏目敦至, 近藤豊 脳腫瘍幹細胞の分化に関わる miR-1275 に関する研究 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011.10.05
21. 水野鉄也, 村上秀樹, 藤井万紀子, 石黒太志, 近藤豊, 赤塚慎也, 豊國伸哉, 横井香平, 長田啓隆, 関戸好孝 ヒト悪性中皮腫細胞における YAP transcriptional coactivator の CCND1 を介した増殖機構の解析 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011.10.05
22. 石黒太志, 村上秀樹, 水野鉄也, 藤井万紀子, 近藤豊, 宇佐美範泰, 横井香平, 長田啓隆, 関戸好孝 悪性中皮腫における ALCAM/CD166 発現の解析 第 70 回日本癌学会学術総会 名古屋 2011.10.05
23. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y. TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human

malignant mesothelioma growth by inducing CTGF expression. FASEB SUMMER RESEARCH CONFERENCES: The TGF- β Superfamily ; Signaling in Development and Disease イタリア 2011.08.22

24. 藤井万紀子, 豊田武士, 長田啓隆, 谷田部恭, 松平康枝, 村上秀樹, 近藤豊, 樋田豊明, 関戸好孝 悪性中皮腫細胞の増殖における CTGF (connective tissue growth factor)の役割について 日本組織培養学会第 84 回大会 東京 2011.05.28

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 万紀子 (FUJII MAKIKO)

愛知県がんセンター(研究所)

分子腫瘍学部・主任研究員

研究者番号：70406031