

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460482

研究課題名(和文) 癌遺伝子YAP/TAZのタンパク質相互作用ネットワーク解析と腫瘍形成における役割

研究課題名(英文) Molecular and functional analysis of YAP/TAZ protein complex

研究代表者

村上 秀樹 (Murakami, Hideki)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90303619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：類上皮血管内皮腫において検出されるTAZ/CAMTA1, YAP/TFE3融合遺伝子の機能を明らかにするために、不死化した血管内皮細胞に融合蛋白を発現させの局在、細胞増殖、結合するタンパクについて解析を行った。TAZ, YAPの局在は主に細胞質にみられるのに対し、融合タンパクは核への局在を示す傾向にあった。TAZ/CAMTA1の発現により軽度の増殖および運動能の増加がみられた。質量分析解析を行い共沈してくる蛋白の同定を行いERG, SIR7, AHNKなどのタンパクが同定された。今後これらの同定された分子の機能解析を進めていくことで、腫瘍形成の分子機構が明らかになるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The TAZ/CAMTA1 or YAP/TFE3 fusion genes have been identified in epithelioid hemangioendothelioma (EHE). However, the detailed function of TAZ/CAMTA1 and YAP/TFE3 on cell growth or motility remains unclear. To investigate the biological roles of these fusion proteins in EHE, we generated lentivirus mediated TAZ/CAMTA1 or YAP/TFE3 expression system in HMEC1 cells, and analyzed the changes in cell growth, motility, and the interacting proteins with fusion protein using a tandem affinity purification with LC-MS/MS. Fusion proteins were localized in the nucleus, whereas TAZ and YAP proteins preferentially found in the cytoplasm. Expression of TAZ/CAMTA1 modestly increased cell proliferation and motility. Using tandem affinity purification coupled with LC-MS/MS, we identified several TAZ/CAMTA-associated proteins, such as ERG, SIR7, AHNK. Our results will provide new insights into development of EHE, and give some clues to developing a new molecular target therapy for EHE.

研究分野：腫瘍

キーワード：がん遺伝子 転座

1. 研究開始当初の背景

癌遺伝子 *YAP*(Yes-associated protein)および相同性を有する *TAZ*(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)は腫瘍抑制経路 Hippo 経路のエフェクター分子として働き、Hippo 経路の不活性化により転写のコアクチベーターとしての機能が亢進し、癌化につながると考えられている。*YAP* 遺伝子は染色体 11q22 に局在し、この領域は膀胱癌、悪性中皮腫など多くの癌で増幅している。*TAZ* の遺伝子増幅については明らかされていないが、乳癌、肺癌で過剰発現しており、特に乳癌では組織学的な悪性度との相関が示され、上皮間葉転換 (EMT) 誘導し癌幹細胞様の性質獲得に重要であることが示されている。近年血管系の悪性腫瘍である類上皮血管内皮腫 (Epithelioid hemangioendothelioma: EHE)において *TAZ*, *YAP*(*TAZ/CAMTA1*, *YAP/TFE3*) 遺伝子の転座が検出されることが報告された。

YAP/TAZ は転写因子である TEAD, TTF-1 などに結合し様々な遺伝子の発現に関与するが、EHE において検出される融合タンパクの腫瘍形成およびタンパク質相互作用ネットワークは十分には明らかにされていない。

2. 研究の目的

EHE で検出される融合タンパクの機能解析を行い腫瘍形成の分子メカニズムを明らかにする。また結合するタンパク質を同定し、細胞の増殖・運動能に及ぼす影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) EHEおよび血管系腫瘍における融合遺伝子の発現の解析：類上皮血管内皮腫症例および血管系腫瘍における融合遺伝子の発現および転座の有無について検討する。

(2) 細胞株における融合タンパクの発現局在についての解析：不死化した血管内皮細胞に融合遺伝子を発現させ融合タンパクの局在を解析する。細胞増殖、運動能に与える影響を調べる。増殖能の評価は MTT アッセイ、

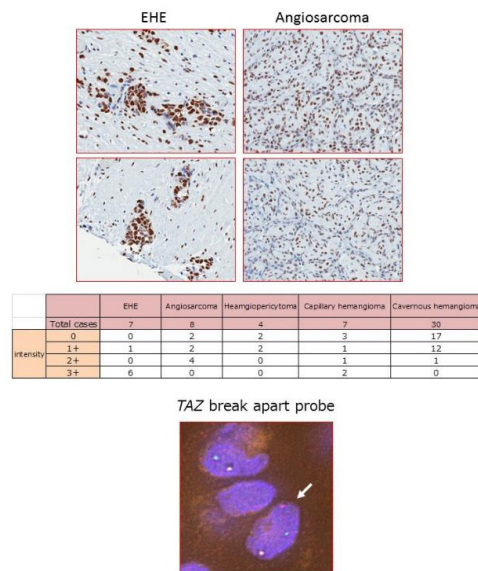
浸潤運動能についてはトランスウェル、マトリゲルを用いた方法で評価を行う。

(3) 融合タンパク質複合体の同定と機能解析：融合タンパクと結合するタンパク質を質量分析法で同定する。複合体形成の変化および *YAP* と *TAZ* における複合体形成の相違について iTRAQ 試薬を用いて網羅的に同定・定量解析する。これら複合体の *YAP/TAZ* の活性に与える影響を明らかにする。

4. 研究成果

(1) EHEおよび血管系腫瘍における融合遺伝子の発現の解析：EHE7例を含む血管系腫瘍(56症例)において転座相手である *CAMTA1*, *TFE3* の発現を免疫組織化学染色により調べた。EHEでは *CAMTA1* の核での強い発現が7例中6例で認められた。血管肉腫 (Angiosarcoma) においても核に陽性像が認められたが、中等度の染色強度であった。少数例ではあるが良性の血管腫でも核に強い発現が認められた。*TFE3* の陽性例は認められなかった。*CAMTA1* の発現のみられた2症例のパラフィン切片より RNA を抽出し融合遺伝子の同定を試み *TAZ/CAMTA1* の融合遺伝子を検出した。また FISH法で *TAZ* の break a part signalが確認された。

図1：EHE および血管系腫瘍における *CAMTA1* の発現と *TAZ* 領域の FISH 解析

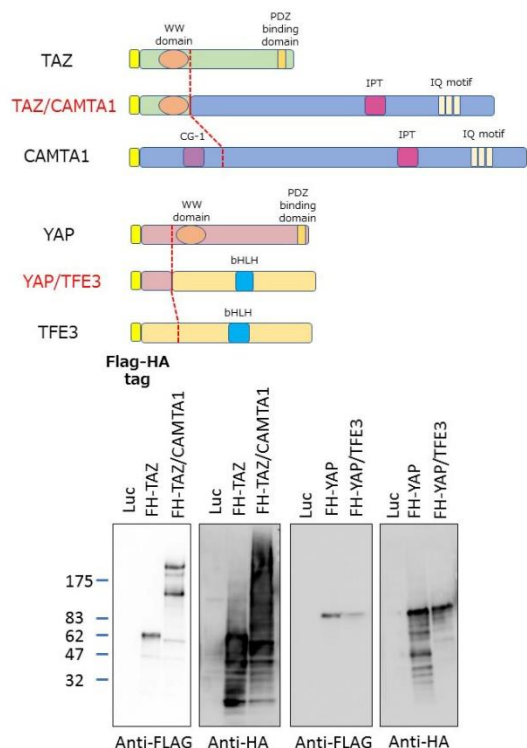


転座の有無についてはFISH法、RT-PCRによる融合遺伝子の確認が必要であるが、CAMTA1の免疫組織化学染色は転座の補助的なスクリーニング方法として有用であると考えられた。

(2) 細胞株における融合蛋白の局在、細胞増殖に与える影響についての解析。

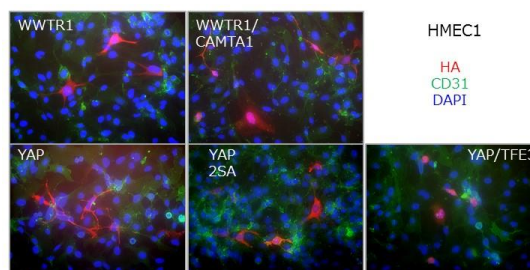
EHE で検出される融合遺伝子を発現するコンストラクトを作製し(図2)、不死化したヒト血管内皮細胞 HMEC-1 に発現させた。

図2: TAZ/CAMTA1、YAP/TFE3 融合遺伝子

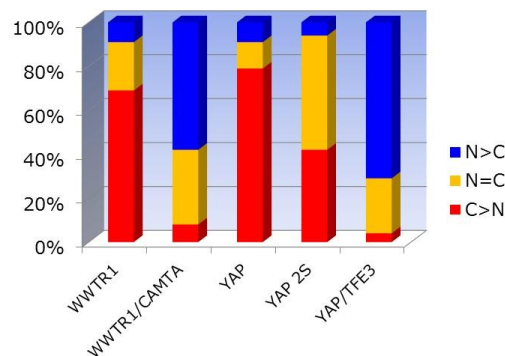


Immunocytochemistry 解析により TAZ/CAMTA、YAP/TFE3 の細胞内局在を検討した。HMEC-1 細胞では YAP、TAZ 蛋白は細胞質内に優位に局在した。LATS1/2 によりリン酸化される部位の YAP 変異体 (YAP 2S) では核、細胞質に局在していた。一方、TAZ/CAMTA、YAP/TFE3 および CAMTA1 蛋白は核内優位の局在を示していた。YAP/TAZ の細胞内局在は Hippo 経路の活性化などにより制御されるが、融合タンパクでは核内に蓄積されることが明らかとなった。(図3)。

図3: TAZ/CAMTA1、YAP/TFE3 融合タンパクの局在



Percentages of subcellular localization



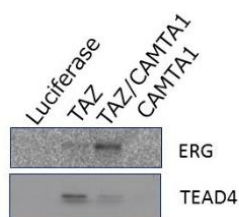
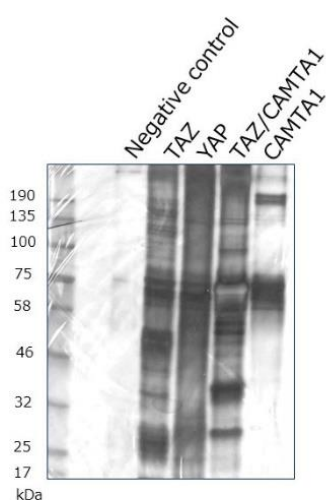
レンチウイルスの系を用いて融合遺伝子を発現させ、細胞増殖に与える影響を調べた。WWTR1/CAMTA 1 の発現により、コントロール (luciferase) を発現する細胞と比較して 40%程度の細胞増殖能の増加がみられた。TAZ, YAP, YAPS94A (TEAD との結合部位の変異体) では増殖能の明らかな増加はみられなかった。YAP2S, YAP/TFE3 の発現では細胞増殖能の軽度の低下 (20%程度) が観察された。足場非依存性のコロニー形成能を観察したが融合遺伝子、TAZ, YAP の発現でコロニー形成は認められなかった。トランスウェルを用いた解析では融合遺伝子、YAP, TAZ いずれもコントロールと比較して運動能の増加がみられたが、軽度 (20~30%) であった。

(3) TAZ/CAMTA1融合タンパク質複合体の同定と機能解析: 融合遺伝子と結合するタンパク質を質量分析法で同定するために、Flag-HA tagによる tandem affinity purificationを行った。複合体の抽出には8M Ureaを使用した。抽出物を LC-MS/MS 解析を施行した。

TAZ/CAMTA1と複合体を形成する候補分子としてTEAD4, ERG, SIR7, AHNK, UBR4などが同定された。抽出物中のERG有無をウエスタンブロット法により確認したところ、TAZ, TAZ/CAMTA1のアフィニティ精製検体においてバンドが観察された(図4)。複合体形成の変化およびYAPとTAZにおける複合体形成の相違についてiTRAQ試薬を用いて網羅的に同定・定量解析を進めているが、安定した結果を得ることができず、条件設定を行っている。

図4 : tandem affinity purification による結合蛋白の同定。

Tandem affinity purification (silver staining)



以上より TAZ/CAMTA1, YAP/TFE3 融合遺伝子は核に局在することにより機能すると考えられ、運動能の増加に寄与しているものと考えられた。増殖能に関しては WWTR1/CAMTA1 は軽度の増加がみられたが、YAP/TFE3 ではやや低下していた。TAZ/CAMTA1 と複合体を形成する候補分子として ERG, SIR7, AHNK, UBR4 が同定された。現在までに YAP/TAZ の転写因子 TEAD を介する遺伝子発現が腫瘍形成に重要であることが示されてきているが、血管系腫

瘍では他の分子も腫瘍形成に関与している可能性が示唆される。今後これらの LC-MS/MS により同定された分子の機能解析を進めていくことで、腫瘍形成の分子機構が明らかになるものと考えられる。

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4件)

1. Iwasaki K, Matsushita H, Murakami H, Watanabe K, Wakatsuki A. Meigs Syndrome Superimposed on Gorlin Syndrome in a 14-Year-Old Girl. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 29(5):75-77 (2016). doi:

10.1016/j.jpap.2016.03.010

(査読有)

2. Hakiri S, Osada H, Ishiguro F, Murakami H, Murakami-Tonami Y, Yokoi K, Sekido Y. Functional differences between wild-type and mutant-type BRCA1-associated protein 1 tumor suppressor against malignant mesothelioma cells. *Cancer Sci.*

106(8):990-999 (2015). doi:

10.1111/cas.12698.

(査読有)

3. Kominami A, Fujino M, Murakami H, Ito M. β -catenin mutation in ovarian solid pseudopapillary neoplasm. *Pathol Int.*

64(9):460-464 (2013). doi:

10.1111/pin.12194. (査読有)

4. Inaguma S, Riku M, Hashimoto M, Murakami H, Saga S, Ikeda H, Kasai K. GLI1 interferes with the DNA mismatch repair system in pancreatic cancer through BHLHE41-mediated suppression of MLH1.

Cancer Res. 73(24):7313-7323 (2013). (査読有)

[学会発表] (計1件)

1. 川井 久美, 山田 徳香, 村上 秀樹, 佐賀 信介, 高橋 雅英: キナーゼ阻害剤バンデタニブとスニチニブによる甲状腺

腺髄様癌細胞阻害効果の解析 (In vivo inhibition of Medullary thyroid carcinoma cells by kinase inhibitors Sunitinib and Vandetanib)。

第73回癌学会総会 2014年9月25日 横浜

2.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 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 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

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

村上 秀樹 (Murakami Hideki)

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90303619

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()