

令和元年6月21日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07050

研究課題名（和文）肺癌/中皮腫に於けるPITX2を介したYAP経路によるレドックス制御の解明

研究課題名（英文）The axis of KEAP1/NRF2-PITX2-YAP contributes to the development of malignant mesothelioma

研究代表者

重枝 弥（Shigeeda, Wataru）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：00802828

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：胸膜中皮腫/肺癌において，KEAP1/NRF2-PITX2-YAP axisの異常が，ROS産生性抗がん薬に対する薬剤抵抗性の形成に関与しているか検討した。関連分子の発現パネルならびにPITX2遺伝子のプロモーター領域のhypermethylationについて検討した。PITX2のプロモーター領域にhypermethylationの生じていた細胞株では，KEAP1/NRF2系の活性化がみられた。PITX2-inducible cloneでは，抗がん薬感受性が回復することを確認した。これらのROS除去機構が，抗がん薬の感受性低下の原因になっていることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は，希少癌である胸悪性膜中皮腫の治療に際し，その抗がん薬感受性が左右非対称性の経路を決定づけるホメオボックス遺伝子PITX2のプロモーター領域の過メチル化に影響を受ける事を明らかにしたものである。難治性悪性胸膜中皮腫の開発にあたって，抗がん薬感受性低下の原因を明らかにした事は，新たな分子標的治療法の開発に有意義である。

研究成果の概要（英文）：In pleural mesothelioma/lung cancer, we examined whether KEAP1/NRF2-PITX2-YAP axis abnormality is involved in the formation of drug resistance to ROS-producing anticancer drugs. We examined expression panels of related molecules and hypermethylation of the promoter region of PITX2 gene. In cell lines where hypermethylation had occurred in the promoter region of PITX2, activation of the KEAP1 / NRF2 system was observed. With PITX2-inducible clone, it was confirmed that the sensitivity to the anti-cancer drug is restored. It was speculated that these ROS removal mechanisms are responsible for the reduced sensitivity of anti-cancer drugs.

研究分野：胸部外科

キーワード：悪性胸膜中皮腫 NRF2 PITX2 KEAP1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がん死亡原因の第一位は肺癌であり、また欧米よりアスベスト使用禁止の遅れた本邦では、難治性希少癌がんの代表である悪性胸膜中皮腫死亡の発生も依然として多く、肺がん治療に係るキャンサーボードの重要性は広く認知されているところである。近年、チロシンキナーゼ阻害薬や免疫チェックポイント阻害薬など各種分子標的治療薬の導入により、治療法の選択肢が増加し一定の成果を挙げてきた。しかし、薬剤耐性の獲得や免疫不全状態に関連した副作用が多発するなどの問題があり、安全かつ効果的な新たな治療法の開発は未だ熱望されている。

我々は悪性胸膜中皮腫に於いて高頻度に不活化の生じている Hippo 経路 (NF2, LATS-1/2) が、転写因子 YAP1/TAZ の核内移行を誘導し、ヒアルロン酸レセプターの一つである receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) の発現レベルを上昇させることを明らかにした (1)。また、過剰発現した RHAMM が腫瘍細胞の遊走・浸潤、転移能獲得に寄与し、この高浸潤・転移能をスタチン製剤の Rho シグナル抑制作用で低下させる事が可能であることを示したものである。胸膜悪性中皮腫に於いて Hippo-YAP 経路に治療標的分子が存在する事は明らかである。さらに、非小細胞肺癌に於いても、YAP やそのパラログである TAZ の高発現や核への局在の亢進が報告されており (60%)、変異型 RAS が YAP/TAZ の活性化を誘導する事も報告されており、非小細胞肺癌に於いても Hippo-YAP 経路は治療標的経路なる可能性が示唆されている (2)。

一方、器官サイズ決定シグナルである Hippo 経路は心筋再生にも重要であり、Hippo 経路欠損マウスにおいては、成熟個体でも心筋再生が発生期と同様に起こることが以前から報告されていた。Tao らは、Hippo 経路欠損心再生マウスモデルを用いて、心筋梗塞後の心筋再生時に、KEAP1/NRF2 系によって誘導される左シグナリング経路決定に関与する bicoid 型ホメオボックス遺伝子 PITX2 が、YAP 経路とクロストークし Redox 関連分子の発現誘導に重要な役割を担っている事を明らかにした (3)。中皮腫では、約半数の症例で NF2, LATS-1/2 に異常を認める (1)。さらに、非小細胞肺癌では YAP の核内移行を誘導する RAS の活性化 (30%) を認める (3)。また、非小細胞肺癌では頻度は少ないものの、KEAP1 の変異がみられる (3)。加えて、PITX2 の脱メチル化の生じていた非小細胞肺は、有意に予後不良であった。

以上の自験データと文献的考察は、Hippo-YAP/TAZ の活性化の認められる、中皮腫ならびに非小細胞肺癌では PITX2 とのクロストークを介して ROS 産生性抗がん薬 (e.g. CDDP, cyclophosphamide) に抵抗性を示すという仮説が成り立つ。本研究では、胸膜悪性中皮腫ならびに小細胞肺癌細胞株を用いて、KEAP1/NRF2-PITX2-YAP axis の異常が、ROS 産生性抗がん薬に対する薬剤抵抗性の形成に関与しているか検討した。

## 2. 研究の目的

近年 左右非対称性の決定において左シグナリング経路決定に関与する bicoid 型ホメオボックス遺伝子 PITX2 が、レドックスマスター転写因子である NRF2 と協調して、Hippo-YAP 経路とクロストークしている事が明らかとなった。本研究では、約半数の症例で Hippo-YAP 経路の活性化が認められる肺癌および中皮腫に於いて、ROS (reactive oxygen species) 産生性抗がん薬に対する薬剤抵抗性の形成に、KEAP1/NRF2-PITX2-YAP axis の異常がどのように関与しているか明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株

当教室で保有し、遺伝異常の網羅的解析の終了している非小細胞肺癌 18 株、悪性中皮腫 10 細胞株を用いた。非小細胞肺癌の遺伝子変異に関しては、COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) のデータベースを参照した (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)。

### (2) 関連分子の発現解析

mRNA ならびに蛋白質の発現解析は、microarray/ real-time PCR 法及び western blot 法を用いて解析を行った (1, 4)。KEAP1/NRF2-PITX2-YAP に関する抗体と反応条件は以下の通りである。一次抗体 (# 14074, 1:100, 免疫蛍光法 (IHC); 1:1000, ウェスタンブロットティング (WB), Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, p-YAP (# 13008, 1:1000, WB, Cell Signaling Technology), TAZ (560235, 1:500, WB; BD Phamigen, NJ, USA),  $\alpha$ -tubulin (T5168, 1:4000 WB; Sigma)。Construct の発現解析に FlagM2 (F3156, 1:100, Sigma)。DAPI 溶液 (核染色用に D532, 1:1000, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を使用した。

Real-time PCR 法は、Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) および TaqMan Gene Expression MasterMix および TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

免疫染色は、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 30 分間固定し、ブロッキング後抗体処理し、共焦点顕微鏡 (C1 および EZ-C1, Nikon, 東京, 日本) を使用して観察した。

### (3) ROS 産生性抗がん薬の感受性試験

抗がん薬の感受性試験は ATP assay で実施した。抗がん薬はアルキル化剤 (cyclophosphamide, ifosfamide, cisplatin), アントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質 (doxorubicin, daunorubicin), その他の抗腫瘍抗生物質 (bleomycin, mitomycin), podophyllum 誘導体 (etoposide, teniposide) について行った。

### (4) 遺伝子工学的手法による感受性変化の検証

遺伝子 knockdown は, small-interfering RNA transfection system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を使った。over expression construct の作成には pCMV-flag plasmid (Deposited by Dr. Guan K. Lab, #27371), ならびに Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific)を使用した。ROS の産生状況については DCFDA- Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Abcam)を用いて flow cytometer (BD)で計測した。

(5) プロモーター解析および脱メチル化処理

PITX2 の CpG island のメチル化状態は Schmitt らの方法によって決定した(5)。5-aza-2-deoxycytidin (1 μM) 処理により, PITX2 のプロモーター領域の脱メチル化クローンを取得した。

4. 研究成果

(1) PITX2 の遺伝子変異と DNA プロモーター領域のメチル化

対象とした関連分子 PITX2 の coding region には, いずれの細胞株にも変異を認めなかった。悪性中皮腫 10 株中 3 株で PITX2 のプロモーター領域の DNA hypermethylation が確認された(3/10, 30%)。これらの細胞株では, PITX2 の mRNA/蛋白質の発現低下が確認された。非小細胞肺癌では 1/18 株(5%)でしか確認出来なかった。

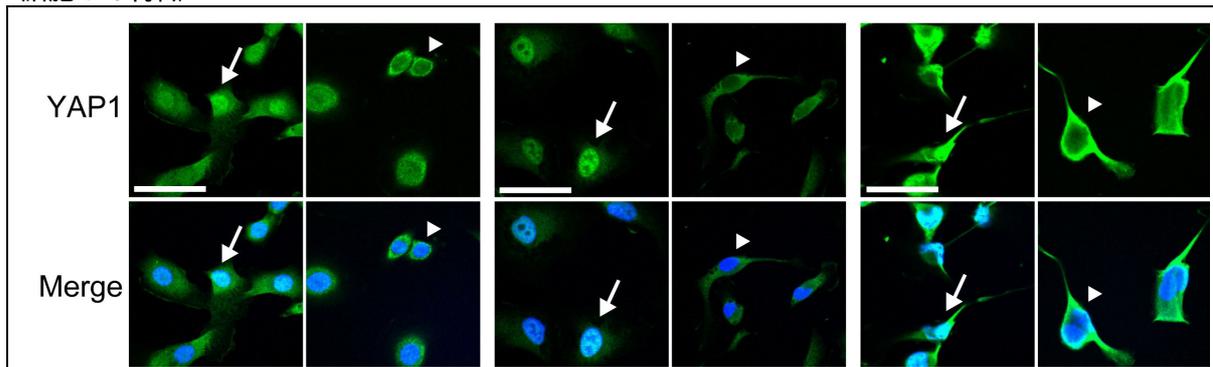
(2) PITX2 発現減弱細胞株 4 株での KEAP1/NRF2-PITX2-YAP 関連分子の遺伝子変異, ならびに蛋白質の発現状況。

PITX2 hypermethylation による蛋白発現減弱細胞株では, KEAP1/NRF2 遺伝子変異による Redox 機構活性化は生じていなかった。一方で, 悪性中皮腫一株に於いて, NRF2 の核内移行が確認された。この株の NRF2 活性化機構の原因について検討したが, 特定の原因を特定出来なかった。非小細胞肺癌では NRF2 の核移行は確認されなかった。これらの細胞株のうち中皮腫の 1 株で LATS2 活性化による YAP の核内移行が確認された。結論をサマリーすると下表のような分類となった。

表 1 PITX 発現減弱細胞株に於ける KEAP1/NRF2, YAP 経路の状態。  
(細胞株名に関しては, 論文発表前につき未公表)

細胞株		PITX2	KEAP1/NRF2	YAP
中皮腫	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	+	+
非小細胞肺癌	D	-	-	-

細胞 C の特徴



YAP-positive の細胞 C によって核内移行を検討した。

(3)細胞株 C の脱メチル化処理による PITX2 の発現回復と抗がん薬感受性の変化

細胞株 C に於いて, 脱メチル化処理(5-AZA-C)を行い, 5-Aza-C-C cell を樹立した。5-Aza-C-C cell では, PITX2 の過剰発現が認められた。PITX2 の核内移行が確認された一方で, NRF2 の核内移行には影響を与えなかった。5-Aza-C-C cell は PITX2/NRF2/YAP トリプルポジティブの細胞である。

5-Aza-C-C cell は親株である C 細胞に比較して, アントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質 (doxorubicin, daunorubicin) 対しての感受性が低下していた。他の薬剤に対しては劇的な変化は認められなかった。5-Aza-C-C cell の YAP siRNA 処理, PITX2 siRNA 処理, NRF2 siRNA 処理は, いずれも DCFDA- Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay による ROS の検出値を上昇させた。これらの細胞では, アントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質 (doxorubicin, daunorubicin) 対しての感受性が増加していた。

細胞株 A, B に於いては脱メチル化処理で PITX2 の発現がみとめられるようになった場合でもその薬剤感受性に変化は認められなかった (5-Aza-C-A cell, 5-Aza-C-B cell)。

#### (4) 遺伝子導入による PITX2 の過剰発現と抗がん薬感受性の変化

5-Aza-C-C cell と同様の形質を有する細胞株の樹立を目的に、細胞株 C に PITX2 の遺伝子導入を行い、過剰発現細胞 PITX2-C cell を作成した。PITX2-C cell では、5-Aza-C-C cell と同様に PITX2 の過剰発現が認められた。PITX2 の核内移行が確認された一方で、NRF2 の核内移行には影響を与えなかった。5-Aza-C-C cell は PITX2/NRF2/YAP トリプルポジティブの細胞株の形質を示した。

親株である C 細胞に比較して、アントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質 (doxorubicin, daunorubicin) 対しての感受性が低下していた。他の薬剤に対しては劇的な変化は認められなかった。YAP, PITX2, NRF2 siRNA 処理は、いずれも DCFDA- Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay による ROS の検出値を上昇させ、アントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質 (doxorubicin, daunorubicin) 対しての感受性が増加していた。

現在、細胞株 A/B から YAP の constitutive active である YAP 5SA plasmid 発現ウイルスベクターを用いた安定発現株を作成している。

#### (5) PITX2 の conditional 発現系による抗がん薬感受性の変化

(4) の作成に先行して、A 細胞で PITX2-inducible clone を作成した。この細胞株では PITX2 の発現が上昇したものの、NRF2/YAP negative でありシングルポジティブの細胞株となっている。YAP の活性を欠いているためと思われるが、アントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質 (doxorubicin, daunorubicin) の感受性に変化は現れなかった。

さらに、YAP 5SA plasmid 発現ウイルスベクター導入実験を企画している。

以上の解析結果より、PITX2 の発現は、KEAP1/NRF2-PITX2-YAP axis はアントラサイクリン系抗腫瘍抗生物質 (doxorubicin, daunorubicin) の感受性に大きな影響を持つことが明らかとなった。特に、YAP 活性化が半数の症例で認められる胸膜悪性中皮腫においてその意義は大きいものと考えられる。本研究成果は、有効な治療法の確立されていない希少癌である胸膜悪性中皮腫の治療法確立のための新しい糸口になると考えられた。

#### 引用文献

- (1) 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 Sep 8;8(55):93729-93740. doi: 10.18632/oncotarget.20750.
- (2) Chapman AM, Sun KY, Ruestow P, Cowan DM, Madl AK. Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. *Lung Cancer*. 2016 Dec;102:122-134. doi: 10.1016/j.lungcan.
- (3) Tao G, Kahr PC, Morikawa Y, Zhang M, Rahmani M, Heallen TR, Li L, Sun Z, Olson EN, Amendt BA, Martin JF. Pitx2 promotes heart repair by activating the antioxidant response after cardiac injury. *Nature*. 2016 Jun 2;534(7605):119-23. doi: 10.1038/nature17959.

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計3件)

Shigeeda W, Deguchi H, Tomoyasu M, Kaneko Y, Kanno H, Tanita T, Saito H. The utility of the Stapler with PGA sheet for pulmonary wedge resection: a propensity score-matched analysis. *J Thorac Dis.* (査読有り) 2019 Apr;11(4):1546-1553. doi:10.21037/jtd.2019.03.05.

Deguchi H, Tomoyasu M, Shigeeda W, Kaneko Y, Kanno H, Saito H. Influence of prophylactic antibiotic duration on postoperative pneumonia following pulmonary lobectomy for non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis.* (査読有り) 2019 Apr;11(4):1155-1164. doi: 10.21037/jtd.2019.04.43.

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.* (査読有り) 2017 Sep 8;8(55):93729-93740. doi: 10.18632/oncotarget.20750

##### 〔学会発表〕(計0件)

##### 〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等:なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

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。