

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K18436
研究課題名(和文) 合成致死を利用した悪性中皮腫新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Screening of synthetic lethal gene to causative gene of mesothelioma
Screening of synthetic lethal gene to causative gene of mesothelioma

研究代表者

山岸 良多 (yamagishi, ryota)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30793145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は、アスベスト暴露に起因する予後不良の悪性腫瘍である。悪性中皮腫は、原因遺伝子ががん抑制遺伝子に限られることから原因遺伝子を直接の標的とする治療法開発は困難であった。そこで原因遺伝子に対して合成致死性を示す遺伝子を探索し、合成致死に至る分子機構の解明及び新たな治療標的としての可能性を検討した。その結果、主要な原因遺伝子の1つであるLATS2に対して合成致死性を示す遺伝子としてエンドヌクレアーゼSMG6が同定された。また、SMG6とLATS2は、転写活性化因子TAZの活性を介して、悪性中皮腫の発症・進展との関わりが深いHippoシグナル伝達系に依存して合成致死性を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性中皮腫は、アスベスト暴露後20～40年の長期にわたる潜伏期間を経て発症し、現在、日本において新規患者数は年々増加しておりピークとされる2030年頃には年間3,000人に達すると予想されている。悪性中皮腫においては、化学療法、手術療法、放射線療法の併用療法が行われているが、確定診断後の患者の予後は極めて不良であり新たな治療法の開発が求められている。本研究では、悪性中皮腫の原因遺伝子ががん抑制遺伝子に限られるという特徴を踏まえ、原因遺伝子の合成致死遺伝子を分子標的とすることでこれまで有効な治療法がなかった悪性中皮腫に対する新規治療法の開発を目的としている。

研究成果の概要(英文)：Mesothelioma is a poor prognosis cancer caused by asbestos exposure. Although the number of people diagnosed with mesothelioma is increasing, the effective treatment is still to be established. In this study, we are trying to identify synthetic lethal gene to LATS2 and NF2, which are typical causative gene of mesothelioma, and will analyze the molecular mechanism for the synthetic lethal phenotype and verify the possibility as new therapeutic target. Therefore, I performed screening using shRNA library in mesothelioma cells with LATS2 or NF2 mutation. As a result, phenotype of synthetic lethal was observed by knockdown of an endonuclease SMG6 in mesothelioma cell with LATS2 mutation. Although SMG6 is well known as an essential factor in nonsense mediated mRNA decay (NMD), synthetic lethal between LATS2 and SMG6 was independent of NMD. In addition, LATS2 was shown synthetic lethal with SMG6 by TAZ-dependent Hippo signaling pathway.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：悪性中皮腫 合成致死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、アスベストの暴露後 20~40 年の潜伏期間を経て発症する極めて予後の悪い悪性腫瘍であり、日本での新規患者数は年々増加し、2030 年頃には年間 3,000 人に達すると予想されている。現在、化学療法、手術療法、放射線療法の併用療法が行われているが、確定診断後の患者の予後は極めて不良であり新たな治療法の開発が求められている。悪性中皮腫の原因遺伝子については、これまでに BAP1 (BRCA1 associated protein 1)、NF2 (neurofibromin 2)、LATS2 (large tumor suppressor kinase 2)などが知られている。所属研究室においても独自に樹立した新規の悪性中皮腫株において NF2、LATS2 の高頻度の不活化変異を見出し、それらが中皮腫の増殖・進展に関わることを明らかにしている (Sekido et al, Cancer Res. 1995、Murakami et al, Cancer Res. 2011)。この NF2、LATS2 は Hippo 伝達系と呼ばれる腫瘍抑制シグナル系を形成しており、NF2、LATS2 の不活化変異は、下流に存在する転写活性化因子 YAP/TAZ の核移行の促進を介して細胞増殖遺伝子の過度の転写促進・発現増加を引き起こし、中皮腫の発症・進展に大きく関与することが報告されている。しかし、これら悪性中皮腫の原因遺伝子はいずれもがん抑制遺伝子となっており、そのため原因遺伝子を直接のターゲットとした分子標的治療の開発は困難となっている。

2. 研究の目的

発症の原因遺伝子が、がん抑制遺伝子に限られる悪性中皮腫に対して、原因遺伝子と合成致死性を示す遺伝子を探索することで、新たな治療標的としての可能性を検討する。合成致死は、遺伝学用語で「単独の遺伝子変異では細胞や個体に対する致死性を示さず、複数の遺伝子の変異が共存すると致死性を発揮する現象」を指す (図 1)。悪性中皮腫の原因遺伝子に対して合成致死遺伝子を同定し阻害できれば、がん細胞のみを特異的に死滅させることができると考えられる。そこで本研究では、悪性中皮腫の原因遺伝子に対して合成致死性を示す遺伝子の同定及び合成致死に至る分子メカニズムの解明を行う。

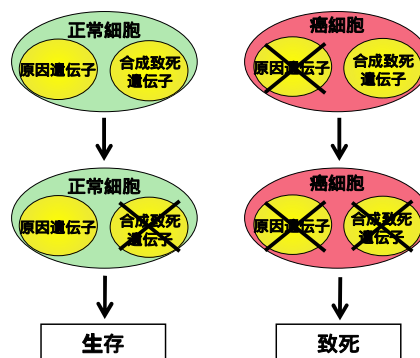


図 1. がん原因遺伝子に対して合成致死性を示す遺伝子を阻害することで癌細胞のみを特異的に死滅させることができる。

3. 研究の方法

(1) 合成致死性表現系を示す遺伝子の同定

悪性中皮腫の主要な原因遺伝子である NF2 及び LATS2 に変異を有する悪性中皮腫細胞株に対して、shRNA ライブラリーを用いて各遺伝子のノックダウンを行い、変異株特異的に致死性を示す遺伝子をスクリーニングする。得られた候補遺伝子について NF2、LATS2 を欠損させた中皮細胞株に対して RNA 干渉を用いたノックダウンを行い、MTT assay によって細胞増殖・生存率の減少が認められる遺伝子を選定する。

(2) 合成致死性を示す分子機構の解析

NF2、LATS2 以外の Hippo 伝達系構成因子との合成致死性を評価することで、これまで明らかにされている悪性中皮腫の発症機構と合成致死性との関連を解析する。同定された合成致死遺伝子の共役因子や活性中心を明らかにすることで、合成致死のメカニズムを明らかにすることに加え、合成致死性遺伝子の特異的な阻害法を探索する。

4. 研究成果

(1) エンドヌクレアーゼ SMG6 は、LATS2 と合成致死性を示す。

NF2 あるいは LATS2 に変異を有する悪性中皮腫細胞株に対して、shRNA ライブラリーを用いた一次スクリーニングを行った結果、LATS2 変異株において合成致死性を示す候補遺伝子群に複数の mRNA 代謝関連因子が含まれていることが確認された。LATS2 の変異は、Hippo 伝達系を介してがん遺伝子やサイトカイン等の炎症関連遺伝子の発現を誘導することで、悪性中皮腫細胞の増殖や生存を促進している。この状況下で、それらの遺伝子の代謝を制御する mRNA 代謝系に何らかの障害が入った場合、細胞の増殖や生存に関わる遺伝子が極度に過剰あるいは不足し、細胞が致死性を示すのではないかと考えられた。そこで、変異を持たない不死化中皮細胞株の LATS2 を欠損させ、RNA 代謝に関わる各遺伝子をノックダウンし、細胞の生存率への影響を解析したところ、エンドヌクレアーゼの 1 つである SMG6 (SMG6, nonsense mediated mRNA decay factor) が LATS2 と合成致死性を示すことが確認された (図 2)。

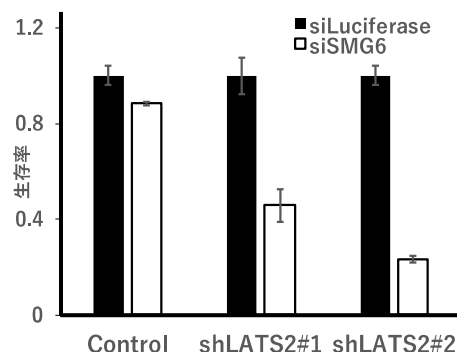


図 2. LATS2 を欠損させた不死化中皮細胞に、SMG6siRNA を transfection し、72 時間後に生存率を測定した。

(2)

SMG6 は細胞内でスプライシングのエラー等によって異常な mRNA を分解する NMD (Nonsense mediated mRNA decay) と呼ばれる RNA の品質管理機構において役割を果たすことが知られている。そこで LATS2 との合成致死性との関連を解析するため、LATS2 欠損株に対して NMD の阻害剤による処理及び、SMG6 と同じく NMD の制御因子である SMG7 についてノックダウンを行い、生存率への影響を解析したところ、いずれも合成致死性は認められなかった。そこで LATS2 の欠損株に SMG6 の野生型あるいはヌクレアーゼ活性の酵素活性変異体を過剰発現させたところ、活性変異体の過剰発現により生存率の低下が認められた。これらのことから、SMG6 が LATS2 と合成致死性を示すには、これまで SMG6 の生理機能としてよく知られていた NMD ではなく、また別の RNA 代謝系路によるものである可能性が示された。

また上述の様に、LATS2 は Hippo シグナル伝達系において、YAP や TAZ といった転写活性化因子のリン酸化を介した活性調節を行っており、これらが悪性中皮腫の発症・進展に大きく関わることが知られている。そこで、不死化中皮細胞株に YAP 及び TAZ の野生型あるいは、活性型変異体である非リン酸化体を過剰発現させ、SMG6 ノックダウンの生存率への影響を解析したところ、TAZ 非リン酸化体の高発現細胞で SMG6 ノックダウンにより生存率の低下が認められた。興味深いことに、YAP は野生型、活性型いずれの高発現株においても、生存率の変化は認められなかった。このことから SMG6 による合成致死性には Hippo シグナル伝達系の中でも LATS2-TAZ 経路が重要であることが明らかとなった。

以上の結果から、LATS2 と SMG6 が合成致死性を示す機構として、Hippo シグナル伝達系内の LATS2-TAZ 系路によって発現誘導されたがん遺伝子やサイトカイン遺伝子が SMG6 の欠損変異によって正常に代謝されず、細胞毒性を生じたのではないかと考えられる。今後 TAZ や SMG6 の共通の標的遺伝子を探索し、悪性中皮腫細胞の増殖・生存への影響を解析していくことで、合成致死のより詳細な分子機構を明らかにできると期待される。

これまでの研究結果から、LATS2 に変異を持つ悪性中皮腫細胞の増殖・生存には SMG6 のヌクレアーゼ活性が重要であることが確認された。また、SMG6 については活性中心の結晶構造がすでに明らかにされている (*Glavan et al*, EMBO J. 2006)。そこで現在コンピュータ上でタンパク質と化合物の結合を予測するインシリコスクリーニングを用いて SMG6 のヌクレアーゼ活性阻害剤の探索を行っている。この結果、今後有用な阻害剤を探索できれば悪性中皮腫の新規治療薬の開発につなげることができると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 浩也、山岸 良多、向井 智美、田部 陽子、三井田 孝、関戸 好孝、村上（渡並） 優子
2. 発表標題 LATS2変異を有した悪性腫瘍における合成致死を基盤とした細胞死誘導機構の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----