

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590421
 研究課題名(和文) 悪性中皮腫における神経線維腫症2型遺伝子産物マーリンの腫瘍抑制機構の解明
 研究課題名(英文) Molecular analysis of the NF2 tumor suppressor gene in malignant mesothelioma
 研究代表者
 村上 秀樹 (MURAKAMI HIDEKI)
 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：90303619

研究成果の概要：悪性中皮腫においてNF2 遺伝子産物マーリンの腫瘍抑制機構を解明するためにマーリンの関与する細胞内情報伝達経路、結合蛋白および発現の制御される遺伝子群の同定を行った。NF2 遺伝子の機能失活型変異を有する細胞株にマーリンを発現させることにより、Hippo 経路、AKT の活性化に影響を及ぼすことを明らかにした。マーリンの発現により細胞の増殖能の低下がみられ、アポトーシスが誘導されることを見出した。また発現解析を行い幾つかのマーリンにより発現の制御される遺伝子を同定した。本研究成果は悪性中皮腫の新規治療法や診断マーカーの開発への可能性があるものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露に関連しており、今後患者数の急速な増加が予測され社会問題となっている。悪性中皮腫の治療としては主に抗がん剤治療が行われているがその効果は低く、現在のところ有効な治療法は確立されていない。悪性中皮腫の発症にはアスベスト曝露より20～50年の長い期間かかるとされており、幾つかの遺伝子異常が蓄積されるこ

とにより発症するものと考えられている。細胞遺伝学的には染色体9番短腕(9p21)に存在するp14^{ARF}、p16^{INK4a}遺伝子領域のホモ接合性の欠失が高頻度(約85%)に認められる。次いで神経線維腫症2型(NF2)遺伝子の遺伝子異常が高頻度(40～50%)に認められ、ホモ接合性の欠失、点突然変異などが検出される。我々の解析では遺伝子異常の認められない中皮腫細胞株でもNF2遺伝子産物マーリンの発現

が低下していることを見出している。さらにNF2遺伝子に異常がみられる中皮腫細胞株に野生型のマーリンを発現させると増殖能の低下（コロニーフォーメーションの抑制）きたすことを確認している。p14^{ARF}, p16^{INK4a}の欠損とともに、マーリンの機能の失活が悪性胸膜中皮腫の発生・進展に重要であると考えられ、マーリンの関わる特異的な細胞内情報伝達経路が悪性中皮腫発症に関与していることが示唆されている。

2. 研究の目的

近年マーリンの活性化の機構と関与する細胞内情報伝達経路について明らかにされてきたが、悪性中皮腫においてマーリンの腫瘍抑制機構および関与する細胞内情報伝達経路についての詳細な検討に関する報告は少ない。悪性中皮腫においてマーリンの関与する細胞内情報伝達経路を明らかにし、中皮腫の発症、進展に寄与する分子および細胞内情報伝達経路を同定することは、新たな有効な治療および診断につながると考えられる。悪性中皮腫におけるマーリンを介する細胞内情報伝達経路の同定とマーリンを介する細胞内情報伝達経路により発現の制御される遺伝子の同定を行い悪性中皮腫の発症メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 悪性中皮腫におけるマーリンの関与する腫瘍形成に特異的な細胞内情報伝達経路の同定

マーリンの518番目のセリン残基はセリン・スレオニンキナーゼであるPAK1によりリン酸化され不活性化される。反対に活性型のマーリン(リン酸化されていない)はSmall GTP binding protein, RAC-PAK経路の活性に抑制的に働き、下流のJNK経路の活性を制御していると考えられている。また近年ショウジョウバエにおいてマーリンがHippo経路の活性を制御し、細胞の増殖に負に働くことが示された。哺乳類にも同様の経路に関わる分子が保存されていることからこの経路の活性にも関与していることが示唆されている。悪性中皮腫細胞株における各細胞内情報伝達経路の活性化について解析を行いさらに細胞増殖・運動能への影響について調べる。

(2) NF2 遺伝子産物マーリン結合蛋白の同定

マーリンはCD44, Paxillin, PAK など様々な分子と結合することが報告されているが、その結合の生物学的活性および悪性中皮腫の発生・進展への関与についてはまだ十分に明らかになっていない。悪性中皮腫においてマーリンの細胞内機能および関与する細胞内情報伝達経路を明らかにするために、悪性中皮腫においてマーリンに結合する候補分子を同定する。

(3) 悪性中皮腫細胞株におけるマーリンにより制御される遺伝子の検索

NF2遺伝子に異常を有する悪性中皮腫細胞株に野生型のマーリンを発現させると造腫瘍能の顕著な低下がみられるが、その腫瘍抑制機構は明らかになっていない。腫瘍抑制メカニズムの一つとしてマーリンを介する細胞内情報伝達経路による遺伝子の発現制御が寄与している可能性が考えられる。しかしながら現在までにマーリンを介する細胞内情報伝達経路により制御される腫瘍抑制に関わる遺伝子の発現についての報告はない。NF2遺伝子のホモ接合性の欠失がみられる悪性中皮腫細胞株を用いて野生型マーリンにより発現の誘導もしくは抑制される遺伝子の検索を行う

4. 研究成果

(1) 悪性中皮腫におけるマーリンの関与する腫瘍形成に特異的な細胞内情報伝達経路の同定

マーリンの関与する細胞内情報伝達経路を同定するために、NF2 遺伝子がホモ欠失している中皮腫細胞株 NCI-H290 にレンチウイルスシステムを用いて野生型のマーリンおよび変異型マーリン (FERMドメインのみを発現する) を発現させ、細胞内シグナルにおよぼす影響について調べた。野生型マーリンの発現により増殖能の低下がみられ、細胞周期解析ではG0/G1 期の増加とともにアポトーシスの誘導が観察された。MAPK, PI3-kinase 経路、Hippo 経路の活性化についてリン酸化特異的 MAPK, AKT, YAP 抗体を用いてウェスタンブロット法にて検出したところ、マーリンの発現により Hippo 経路の活性化の著明な上昇がみられることが判明し

た。一方 AKT, MAPK については活性化の低下がみられた (図 1)。JNK のリン酸化には影響がみられなかった。中皮腫において MAPK および PI3-kinase-AKT 経路の役割を明らかにするために、MEK の阻害剤である PD98059, PI3-kinase の阻害剤である LY294002 処理による細胞の増殖能に与える影響について MTT アッセイおよびマトリゲルを用いた浸潤アッセイにて検討した。LY294002 処理により増殖の著明な抑制がみられたが、PD98059 処理では増殖抑制は軽度であった。また LY294002 処理では運動能の低下もみられた (図 2)。Hippo 経路の増殖における役割を調べるために、YAP1 のノックダウンを行ったところ増殖の抑制が観察された。以上よりマーリンは様々なシグナル伝達経路の制御に関与していること、特に PI3-kinase-AKT 経路および Hippo 経路が中皮腫の増殖に重要な役割を果たしていることが示唆された。

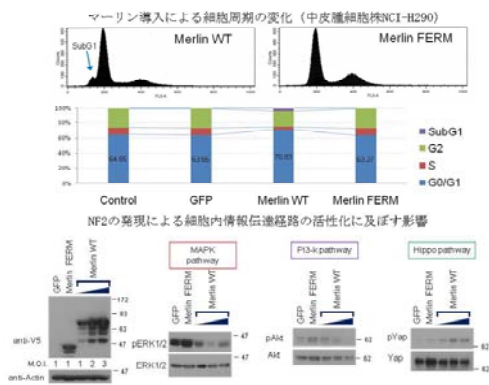


図 1. NF2 遺伝子導入による中皮腫細胞の増殖抑制と細胞内シグナルに与える影響

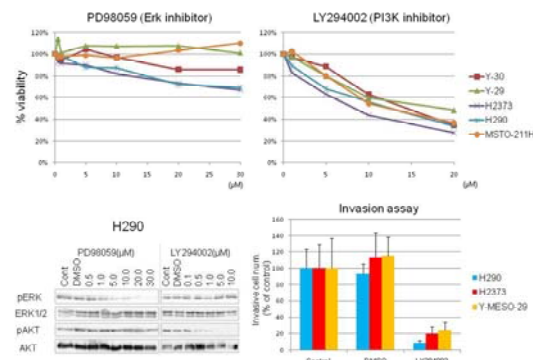


図 2. PI3-kinase 阻害剤処理による中皮腫細胞の増殖および浸潤抑制

(2) NF2 遺伝子産物マーリン結合蛋白の同定

マーリンによる Hippo 経路の活性化についてはショウジョウバエの系で詳細な解析が行われてきており、ヒトの系ではその活性化機構については十分明らかになっていない。中皮腫細胞株において NF2 および YAP1 を外来性に導入し免疫沈降法により両者の結合を確認したところ、NF2 と YAP1 が複合体を形成することが確認された。しかし in vitro で合成した蛋白での結合実験では明確な結合はみられなかった。さらに Hippo 経路に関与する分子との結合を in vitro の系で調べたところ SAV1 (Salvador homolog 1) との結合が確認された (図 3)。このことはマーリンと YAP1 との複合体形成は直接の結合するのではなく、他の分子 (SAV1) を介して複合体を形成し YAP1 をリン酸化、不活性化すると考えられた。

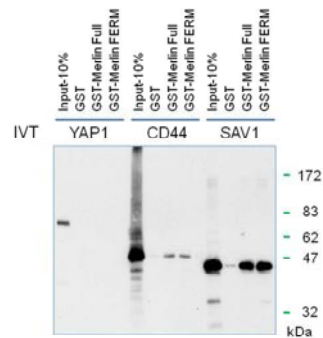


図 3. マーリンと SAV1 との in vitro での結合

(3) 悪性中皮腫細胞株におけるマーリンにより制御される遺伝子の検索

マーリン導入により G0/G1 期の増加とアポトーシスの誘導が検出された。そこでマーリン導入により発現の変化する遺伝子群の網羅的な同定を行った。マーリンを発現させた細胞より mRNA を抽出し、変異型マーリンと発現の異なる遺伝子の網羅的検索を行ったところ、約 80 の有意に発現の異なる遺伝子が検出された。これらの幾つかについては発現の変化がリアルタイム PCR 法にて確認された。さらに NF2 遺伝子に不活性型変異を有する 4 細胞株においてもマーリン発現によるこれらの遺伝子の発現の変化について解析したところ、細胞特異的な遺伝子が幾つか存在したが、PRKCE (Protein kinase C, epsilon), PSG (Pregnancy Specific beta-1 Glycoprotein) 遺伝子群はいずれの細胞においても発現の変化が確認された。PRKCE, PSG 遺伝子は NF2 遺伝子の導入により発現の低下する遺伝子であり、17 細胞株にてこれらの遺伝子の発現を調べたところ、NF2 遺伝子に不活性型変異を有する細胞株において発現の

高い傾向がみられた(図4)。NF2 遺伝子に変異を有する中皮腫においてこれらの遺伝子が中皮腫の増殖に関与している可能性が示唆された。

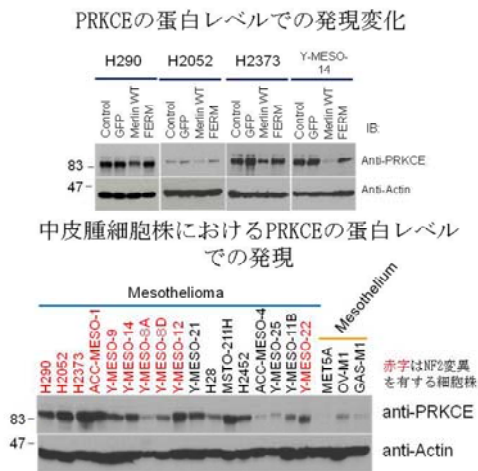


図4. マーリン導入によるPRKCE蛋白の発現抑制と中皮腫細胞株におけるPRKCE蛋白の発現

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 3件)

Kawaguchi K, Murakami H, Taniguchi T, Fujii M, Kawata S, Fukui T, Kondo Y, Osada H, Usami N, Yokoi K, Ueda Y, Yatabe Y, Ito M, Horio Y, Hida T, Sekido Y: Combined inhibition of MET and EGFR suppresses proliferation of malignant mesothelioma cells. *Carcinogenesis* (in press) (査読有)

Suzuki Y, Murakami H, Kawaguchi K, Taniguchi T, Fujii M, Shinjo K, Kondo Y, Osada H, Shimokata K, Horio Y, Hasegawa Y, Hida T, Sekido Y: Activation of the PI3K-AKT pathway in human malignant cells. *Mol. Med. Rep.* 2:181-188, 2009 (査読有)

Yokoyama T, Osada H, Murakami H, Tatematsu Y, Taniguchi T, Kondo Y, Yatabe Y, Hasegawa Y, Shimokata K, Horio Y, Hida T, Sekido Y: YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. *Carcinogenesis* 29: 2139-2146, 2008 (査読有)

[学会発表] (計 12件)

川口晃司、村上秀樹、谷口哲郎、藤井万紀子、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝：悪性胸膜中皮腫におけるMETの活性化 第67回日本癌学会

総会 2008年10月11日 名古屋

藤井万紀子、谷口哲郎、村上秀樹、長田啓隆、関戸好孝：悪性胸膜中皮腫に対するTGF-betaシグナルの影響 第67回日本癌学会総会 2008年10月11日 名古屋

村上秀樹、谷口哲郎、川口晃司、藤井万紀子、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝：中皮腫細胞株における遺伝子発現プロファイリング 第67回日本癌学会総会 2008年10月11日 名古屋

Taniguchi T, Murakami H, Fujii M, Usami N, Yokoi K, Sekido Y: Establishment and characterization of new malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. The 9th International conference of the International mesothelioma interest group. 2008年9月26日 Amsterdam, Netherlands

Suzuki Y, Murakami H, Kawaguchi K, Taniguchi T, Hasegawa Y, Shimokata K, Sekido Y: Activation of PI3K/AKT signaling pathway in malignant pleural mesothelioma cells. AACR 2008年4月14日 San Diego, USA

Kawaguchi K, Murakami H, Suzuki Y, Taniguchi T, Yokoi K, Sekido Y: Activation of receptor tyrosine kinase c-Met in malignant mesothelioma cells. AACR 2008年4月15日 San Diego, USA

川口晃司、村上秀樹、鈴木裕太郎、谷口哲郎、横井香平、関戸好孝：悪性中皮腫におけるHGF/METの発現と活性化の解析。第48回日本肺癌学会総会 2007年11月8日 名古屋

谷口哲郎、村上秀樹、川口晃司、鈴木裕太郎、横井香平、関戸好孝：日本人悪性胸膜中皮腫患者由来の新しい中皮腫細胞株の樹立と解析。第48回日本肺癌学会総会 2007年11月8日 名古屋

横山俊彦、長田啓隆、村上秀樹、立松義朗、谷口哲郎、近藤豊、樋田豊明、長谷川好規、下方薫、関戸好孝：YAP1は悪性中皮腫の増殖を促進し、NF2腫瘍抑制遺伝子で機能阻害される。第48回日本肺癌学会総会 2007年11月8日 名古屋

鈴木裕太郎、村上秀樹、川口晃司、谷口哲郎、長谷川好規、下方薫、関戸好孝：悪性胸膜中皮腫におけるPI3K/AKT経路、PTEN遺伝子変異の検討。第48回日本肺癌学会総会 2007年11月8日 名古屋

横山俊彦、長田啓隆、村上秀樹、立松義朗、谷口哲郎、近藤豊、樋田豊明、長谷川好規、下方薫、関戸好孝：がん遺伝子YAP1は悪性中皮腫の増殖に関与し、がん抑制遺伝子NF2で機能阻害される。第66回日本癌学会総会 2007年10月5日 横浜

村上秀樹、谷口哲郎、川口晃司、鈴木裕太郎、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝：Ectopic Merlin expression inhibits the growth of NF2-deficient cells with the distinct change of gene expression pattern. 第66回日本癌学会総会 2007年10月5日 横浜

〔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

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/400/420/421/421-03.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 秀樹 (MURAKAMI HIDEKI)

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：90303619

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者