

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16809

研究課題名(和文) Hippo経路異常を内包した悪性腫瘍に対する合成致死を基盤とした治療標的の提案

研究課題名(英文) SMG6 regulates DNA damage and cell survival in Hippo pathway kinase LATS2-inactivated malignant mesothelioma

研究代表者

鈴木 浩也 (Suzuki, Koya)

順天堂大学・大学院医学研究科・博士研究員

研究者番号：40788551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は予後不良な腫瘍であり、LATS2(large tumor suppressor kinase2)を含むがん抑制遺伝子の変異が報告されている。一般的にがん抑制遺伝子を活性化させる分子標的薬の開発は困難とされ、合成致死を応用した治療戦略が注目されている。本研究では、LATS2変異を有した悪性中皮腫に対し、新規合成致死標的としてSMG6を見出し、SMG6とTERTが協働して合成致死を誘導することを明らかにした。また、悪性中皮腫の担がんマウスモデルに対してSMG6の発現抑制、TERT阻害剤の投与によって腫瘍細胞の退縮が確認され、悪性中皮腫に対する新たな分子標的としての可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LATS2は、悪性中皮腫だけでなく前立腺がん、腎細胞がん、胆管がんをはじめ複数種のがんにおいて不活性変異が報告されている。本研究では、LATS2変異悪性中皮腫に対する合成致死標的としてSMG6/TERTの阻害によって細胞死の誘導を明らかにした。さらにLATS2変異を有する他臓器のがんに対してSMG6、TERTの阻害によってがん細胞を死滅させることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Many genes responsible for Malignant mesothelioma (MM) have been identified as tumor suppressor genes including in the LATS2, which is one of the kinases in the Hippo pathway, and it is difficult to target these genes directly at a molecular level. Here we showed that knockdown of SMG6 results in synthetic lethality in LATS2-inactivated cells. We found that this synthetic lethality required the nuclear translocation of YAP1 and TAZ. Both are downstream factors of the Hippo pathway. We also demonstrated that this synthetic lethality did not require SMG6 in nonsense-mediated mRNA decay (NMD) but in regulating telomerase reverse transcriptase (TERT) activity with SMG6 interaction. We confirmed the inhibitory effects of LATS2 and SMG6 on cell proliferation in vivo. The result suggests an interaction between the Hippo and TERT signaling pathways. We also propose that SMG6 and TERT are novel molecular target candidates for LATS2-inactivated cancers such as MM.

研究分野：腫瘍学

キーワード：悪性中皮腫 合成致死 LATS2 SMG6 TERT Hippo経路

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は、アスベスト曝露によって惹起される極めて予後不良な悪性腫瘍の一種である。早期から腫瘍細胞が胸膜・腹膜に播種するため根治的な外科手術は難しい。化学療法としてシスプラチンとペメトレキセドの併用が標準化されているが奏功する例は少なく悪性中皮腫に対する新たな治療法の開発は喫緊の課題である。

これまで悪性中皮腫の原因遺伝子として LATS2 (large tumor suppressor kinase2)、NF2、BAP1 などががん抑制遺伝子の変異が報告されている。しかし、がん抑制遺伝子を活性化させる薬剤の開発は困難とされており、悪性中皮腫の新たな治療戦略として合成致死の応用が有効と考えられているが、LATS2 変異を基盤とした悪性中皮腫に対する合成致死についての研究は未だ

発展途上である。合成致死とは、遺伝子 A、B 単独変異では細胞は生存するが A、B 両遺伝子が変異することで初めて細胞死が誘導される表現型のことである (図 1)。合成致死を応用することで正常細胞には影響せず原因遺伝子変異を持つがん細胞特異的な細胞死誘導が期待される。

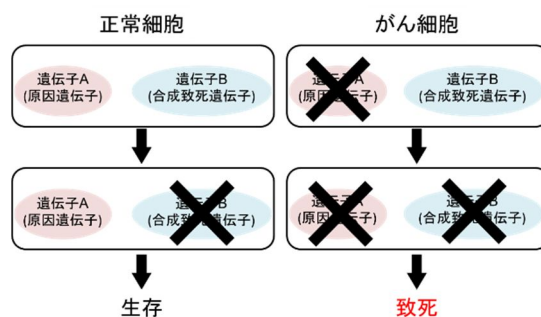


図 1 合成致死表現型

2. 研究の目的

これまでの研究より、LATS2 変異を有する悪性中皮腫の新規合成致死標的候補として SMG6 を見出した。本研究は、LATS2 変異悪性中皮腫に対する合成致死標的 SMG6 の有効性を示し、合成致死を誘導する分子機構を明らかにすることを目的とし、研究当初以下のマイルストーンを設定した。

- (1) LATS2 変異を有した悪性中皮腫に対し、SMG6 発現抑制・阻害によって細胞死を誘導するか解析する。
- (2) 合成致死誘導機構を解明するため、LATS2 と SMG6 の下流因子の相互作用を検討する。
- (3) 悪性中皮腫担がんモデルマウスを作製し、SMG6 発現抑制による合成致死表現型を in vivo でも誘導できるか検討する。

3. 研究の方法

研究目的を遂行するため、マイルストーンに沿って以下の実験を行った。

(1) ヒト悪性中皮腫細胞株 (Y-MESO-12、Y-MESO-27) に SMG6 を siRNA によって発現抑制し、WST (water-soluble tetrazolium salts) 法により細胞生存率を測定した。さらにヒト正常中皮由来細胞 (HOMC-D4、MeT-5A) に、レンチウイルスシステムを用いて導入した shRNA により発現抑制した細胞株 (LATS1/2 KD) および、CRISPR-Cas9 システムを用いて LATS2 を欠損させた細胞株 (LATS2 KO) を樹立し、siRNA によって SMG6 を発現抑制し WST 法により細胞生存率を測定した。

(2) 合成致死誘導機構を明らかにするため LATS2 と SMG6 の下流因子を追跡し細胞死に関与しているシグナル経路の特定を行った。また LATS2 と SMG6 のシグナル経路の下流因子が相互作用しているか VisANT を用いてタンパク質相互作用の解析を行い細胞死の分子機構解明を試みた。

(3) ヒト悪性中皮腫細胞株 Y-MESO-27 および MeT-5A LATS2 KO 細胞にルシフェラーゼを導入した安定細胞株を樹立し、NOG マウス (NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Sug}/ShiJic) の胸腔内に移植し悪性中皮腫がんモデルマウスを作製した。その後、siRNA を用いて SMG6 を発現抑制し、ルシフェリン添加による化学発光を IVIS を用いて測定し、がんの退縮を経時的に解析した。

4. 研究成果

(1) LATS2 変異を有した Y-MESO-27 において、SMG6 を発現抑制することによって細胞生存率の低下が認められ、LATS2 が正常に発現している Y-MESO-12 と比較して有意な差が認められた。また、LATS1/2 KD 及び LATS2 KO 細胞に SMG6 を発現抑制することによっても有意な細胞生存率の低下が認められた。細胞生存

率低下の原因を検討するべく H2AX の染色を行った結果、LATS2 KO 細胞に SMG6 を発現抑制することで H2AX 陽性細胞が増加し、DNA 損傷と細胞死の相関が示された (図

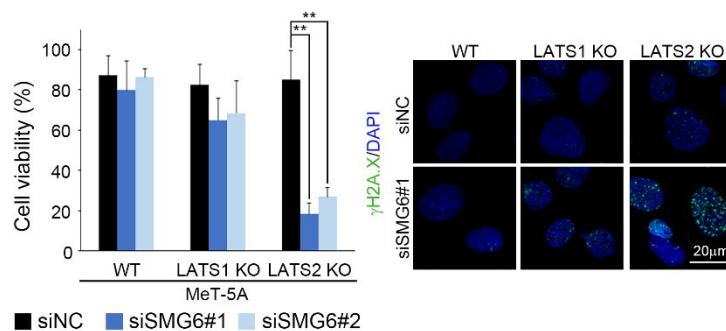


図 2 LATS2 と SMG6 による合成致死

(左) SMG6 KD による細胞生存率の低下 (WST 法)

(右) SMG6 KD における DNA 損傷の増加

2)。さらに TUNEL 染色によるアポトーシスをフローサイトメトリーにより解析した結果、LATS2 KO 細胞に SMG6 を発現抑制することでアポトーシスの有意な増加が認められた。これらの結果より LATS2 と SMG6 が合成致死の関係にあることが認められた。

(2) LATS2 と SMG6 の発現抑制による合成致死機構を解明するため下流のシグナル伝達を追跡した。LATS2 は Hippo 経路の主因子であり、YAP/TAZ をリン酸化することで転写活性を調節する。がん細胞では LATS2 の発現低下により YAP/TAZ が恒常的に非リン酸化状態となり転写活性の亢進から異常増殖が誘導される。そこで YAP/TAZ の非リン酸化変異体(YAP S127A と TAZ S89A)を樹立し合成致死の検討を行った。YAP S127A、TAZ S89A に SMG6 を発現抑制した結果、細胞死が確認され本合成致死に Hippo 経路が重要な役割を担うことが示された。SMG6 は、mRNA の品質を管理する NMD 機構(nonsense mediated mRNA decay)や TERT(telomerase reverse transcriptase) と協働してテロメア伸長を制御することが知られている。そこで、LATS2 KO 細胞に NMD 機構の主因子(SMG5、SMG7、UPF1、UPF2)を発現抑制した結果、LATS2 KO 細胞と野生型細胞の間に差は認められなかった。一方で LATS2 KO 細胞に TERT を発現抑制した結果、細胞生存率の低下が認められ、TERT の阻害剤によっても同様な結果が得られた。さらに TERT の SMG6 結合部位の点変異株においても細胞生存率の低下が確認され、本合成致死に SMG6/TERT が関与していることが示された。TERT/SMG6 の発現抑制に伴い ATM(ataxia telangiectasia mutated)の発現上昇が確認され、Hippo 経路の亢進による p73 の発現上昇が認められアポトーシスとの相関が示された。

(3) ルシフェラーゼを導入した

Y-MESO-27、LATS2 KO 細胞を NOG マウス胸腔に移植したところ生着と腫瘍細胞の肥大が経時的に確認され、悪性中皮腫の担がんモデルマウスを樹立した。そこで LATS2 KO 細胞にあらかじめ

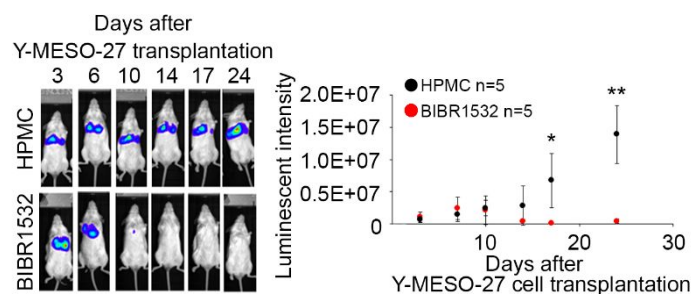


図3 担がんマウスにおける合成致死
担がんマウスのルシフェリンによる化学発光の IVIS 撮
影像(左)と定量化(右)

siRNA による SMG6 の発現抑制を行い NOG マウスに移植したところ、全例で LATS2 KO 細胞の生着が認められなかった。また Y-MESO-27 を移植し、翌日から TERT 阻害剤(BIBR1532)を腹腔内投与したところがん細胞の退縮が認められ(図3)、LATS2 変異と SMG6/TERT の阻害による合成致死が in vivo でも有効であることが認められた。

本研究により、LATS2 と SMG6/TERT が合成致死の関係にあることが認められ、in vivo においても SMG6/TERT が新たな分子標的としての有効性を示した。また LATS2 と SMG6/TERT の発現抑制により DNA 損傷を伴う合成致死誘導機構の一端が明らかにされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Koya, Yamaga Kosuke, Tokumasu Reitaro, Katsuno Tatsuya, Tanaka Hiroo, Chiba Shuhei, Yagi Takeshi, Katayama Ichiro, Tamura Atsushi, Murota Hiroyuki, Tsukita Sachiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Double mutation of claudin 1 and claudin 3 causes alopecia in infant mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.14980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Koya, Tange Masaki, Yamagishi Ryota, Hanada Hiroyuki, Mukai Satomi, Sato Tatsuhiro, Tanaka Takeshi, Akashi Tomohiro, Kadomatsu Kenji, Maeda Tohru, Miida Takashi, Takeuchi Ichiro, Murakami Hiroshi, Sekido Yoshitaka, Murakami-Tonami Yuko	4. 巻 8
2. 論文標題 SMG6 regulates DNA damage and cell survival in Hippo pathway kinase LATS2-inactivated malignant mesothelioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-022-01232-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato K, Matsumoto I, Suzuki Koya, Tamura A, Shiraishi A, Kiyonari H, Kasamatsu J, Yamamoto H, Miyasaka T, Tanno D, Miyahara A, Zong T, Kagesawa T, Oniyama A, Kawamura K, Kitai Y, Umeki A, Kanno E, Tanno H, Ishii K, Tsukita S, Kawakami K	4. 巻 11
2. 論文標題 Deficiency of lung-specific claudin-18 leads to aggravated infection with Cryptococcus deneoformans through dysregulation of the microenvironment in lungs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00708-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito K, Zhang Q, Yang H, Yamatani K, Ai T, Ruvolo V, Baran N, Cai T, Ma H, Jacamo R, Kuruville V, Imoto J, Kinjo S, Ikeo K, Moriya K, Suzuki Koya, Miida T, Kim YM, Vellano CP., Andreeff M, Marszalek JR., Tabe Y, Konopleva M	4. 巻 5
2. 論文標題 Exogenous mitochondrial transfer and endogenous mitochondrial fission facilitate AML resistance to OXPHOS inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 4233 ~ 4255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020003661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamatani Kotoko, Hirayama Satoshi, Seino Utako, Hirayama Akiko, Hori Atsushi, Suzuki Koya, Idei Mayumi, Kitahara Masaki, Miida Takashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Pre 1-high-density lipoprotein metabolism is delayed in patients with chronic kidney disease not on hemodialysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 730 ~ 739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2020.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Hiroshi, Nhung Nguyen Hong, Suzuki Koya, Kimura Yasuaki, Hirokawa Takatsugu, Murakami-Tonami Yuko	4. 巻 100
2. 論文標題 Synthesis and Biological Evaluation of NMD14 Derivatives as Anti-Mesothelioma Agents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 253 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-19-14191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鈴木 浩也、向井 智美、三井田 孝、関戸 好孝、村上 (渡並) 優子
2. 発表標題 LATS2 変異悪性中皮腫に対する新規合成致死遺伝子を標的とした抗腫瘍活性の包括的評価
3. 学会等名 第25回がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丹下 将希、鈴木 浩也、三井田 孝、関戸 好孝、村上 (渡並) 優子
2. 発表標題 BAP1 変異悪性中皮腫細胞株における CHK2 の役割
3. 学会等名 第25回がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 輝星、鈴木 浩也、三井田 孝、関戸 好孝、村上(渡並) 優子
2. 発表標題 悪性中皮腫において BAP1 変異と合成致死表現型を示す遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大石 紫緒里、松本 展希、鈴木 浩也、岡田 知子、今村 亨、村上(渡並) 優子
2. 発表標題 肺がん細胞株 A549 における FGF13 の発現とシスプラチン耐性の関係
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上(渡並) 優子、佐藤 綾人、鈴木 浩也、三井田 孝、村上 浩士、関戸 好孝
2. 発表標題 悪性中皮腫原因遺伝子変異に対する新規合成致死標的の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

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、村上 浩士、関戸 好孝、村上(渡並) 優子
2. 発表標題 LATS2変異を有した悪性中皮腫に対する合成致死誘導機構の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

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変異を有した悪性中皮腫におけるSMG6発現抑制による合成致死誘導機構の検討
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上(渡並) 優子、鈴木 浩也、三井田 孝、阿部 洋、関戸 好孝
2. 発表標題 低分子化合物ライブラリーを用いた悪性中皮腫の新規合成致死標的の探索
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 淳、鈴木 浩也、田中 啓雄、矢野 智樹、仙谷 和弘、大島 正伸、安井 弥、月田 早智子
2. 発表標題 タイトジャンクションの変化はマウス胃腫瘍形成へのシグナルカスケードを活性化する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木浩也、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23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koya Suzuki
2. 発表標題 Deficiency of Stomach-Type Claudin-18 in Mice Induces Gastric Tumor Formation Independent of H.pylori Infection
3. 学会等名 International Conference on Clinical andPharmaceutical Microbiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

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、村上浩士、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年会
4. 発表年 2019年

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、村上 浩士、関戸 好孝、村上(渡並) 優子
2. 発表標題 LATS2変異を有した悪性中皮腫に対する合成致死誘導機構の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 LATS2変異疾患のための分子標的及びその利用	発明者 村上優子、鈴木浩也、三井田孝、関戸好孝、向井里美、山	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、502285457	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------