

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 17日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22300338

研究課題名（和文）悪性中皮腫の遺伝子異常の同定と新規分子診断法の開発

研究課題名（英文）Identification of genetic alterations in malignant mesothelioma and the development of new molecular diagnostic tools

研究代表者

関戸 好孝 (Sekido Yoshitaka)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・部長

研究者番号：00311712

研究成果の概要（和文）：

LATS2 遺伝子が悪性中皮腫の新規がん抑制遺伝子であり、中皮腫の約 20%において不活性化していることを明らかにした。中皮腫細胞で NF2 遺伝子や LATS2 遺伝子に変異することにより、細胞内の腫瘍抑制シグナル系である Hippo 経路の不活性化が引き起こされる。その結果、YAP 分子の活性化を引き起こし、サイクリン D や結合組織成長因子などの転写促進を誘導し、中皮腫の悪性形質の増強を引き起こしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We identified that the LATS2 gene is a novel tumor suppressor gene of malignant mesothelioma (MM) and that LATS2 is inactivated in around 20% of MM cases. Inactivation of NF2 and/or LATS2 results in dysregulation of the Hippo tumor suppressive signaling cascade in MM cells. We found that Hippo pathway inactivation causes YAP activation and enhances transcription of the cyclin D and CTGF genes, which induces a more malignant phenotype of MM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：腫瘍学分野

科研費の分科・細目：腫瘍診断学

キーワード：中皮腫、がん抑制遺伝子、がん遺伝子、ゲノム異常、シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベスト曝露から 30-40 年の潜伏期を経て発症する極めて難治性の腫瘍である。本邦においてはアスベストの規制が遅れたため、今後、中皮腫の患者数の増加が見込まれ、2020-2025 年ごろをピークに現在の 4-5 倍の死者数が予想されている。他の頻度の高い腫瘍では分子標的治療法が

奏功し、その主たる要因は活性型のがん遺伝子産物を標的とした戦略が有効であったと考えられているが、中皮腫においては CDKN2A, NF2 といったがん抑制遺伝子の異常の存在は報告されていたものの、その他の遺伝子異常・ゲノム異常の本態は未だ不明であった。

## 2. 研究の目的

悪性中皮腫の発生に関わる、がん遺伝子、がん抑制遺伝子の詳細は明らかではなく、新規分子診断法や分子標的療法の開発への大きな支障となっている。我々が樹立した中皮腫細胞株を用いた 244K アレイ comparative genomic hybridization (CGH) 解析データベースを利用し、中皮腫における新規がん関連遺伝子の同定を目的とする。特に染色体 13q12 領域におけるホモザイガス欠失領域に着目し、その標的遺伝子を明らかにする。同定された遺伝子の中皮腫における細胞生物学的な役割を明らかにするとともに、中皮腫臨床検体での変異・発現異常の頻度、臨床病理学的指標との関連について検討し、悪性中皮腫に対する新規分子診断法への応用を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 染色体 13q12 ホモザイガス欠失領域に存在する遺伝子について PCR 法やシーケンシング法、ウエスタンブロット法等による変異・発現解析を行い、標的遺伝子を同定する。

(2) 同定された遺伝子、LATS2 について臨床検体を用いた遺伝子変異解析および発現解析を行う。

(3) LATS2 遺伝子に関する野生型および機能不活型 LATS2 のプラスミド発現ベクター (pCDNA3.1-V5/His)、レンチウイルス発現ベクター (pLentiLox3.7) を構築し、翻訳産物の発現誘導ができるかどうか、ウエスタンブロット法や Immunocytochemistry 等で検討する。これらの発現ベクターをもちい、LATS2 欠失細胞株に対する腫瘍抑制効果を MTT アッセイやコロニーフォーメーションアッセイにて検討する。また足場非依存性増殖に与える影響をソフトアガロース培養法にて検討する。

(4) LATS2 が関与する Hippo シグナル伝達系について検討を行い、LATS2 がリン酸化を触媒する YAP 分子 (転写コアクチベーター) の活性化状態、YAP が転写する遺伝子群の解析を行い、中皮腫の悪性化の原因となる機構の解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) LATS2 遺伝子が悪性中皮腫の新規がん抑制遺伝子であることの同定

染色体 13q12.11 領域における LATS2 遺伝子の変異解析を進め、中皮腫細胞株合計 20 株中 4 株にホモザイガス欠失を、3 株にナンセンス変異あるいは小欠失を同定した (表 1)。LATS2 発現プラスミド、レンチウイルスベクターを構築し、LATS2 欠損中皮腫細胞株にトランスフェクションしたところ、増殖能および足場非依存性増殖能の低下を明らかにした。さらにボーイデンチャンバー法にて浸

潤能の低下を明らかにした。25 症例の臨床腫瘍検体からゲノム DNA を抽出し、アレイ CGH 解析あるいはシーケンシングを施行し 3 例において不活性型ゲノム異常を同定した。さらに 45 症例で抗 LATS2 抗体を用いて免疫組織染色を施行したところ、13 例 (29%) で発現の減弱を認めた。

表 1. 中皮腫細胞株 7 株において同定された LATS2 遺伝子変異

細胞株	LATS2 遺伝子変異
Y-MESO-14	ホモザイガス欠失
Y-MESO-26B	ナンセンス変異
NCI-H2052	ホモザイガス欠失
Y-MESO-21	ホモザイガス欠失
Y-MESO-27	ホモザイガス欠失
Y-MESO-30	61 個アミノ酸欠失
MSTO-211H	14 個アミノ酸欠失

さらに 1 株 (Y-MESO-28) において SAV1 遺伝子のホモザイガス欠失が同定されたが、他の細胞株では遺伝子異常は検出されなかった。

(2) LATS2 不活性化により引き起こされる YAP がん遺伝子産物の恒常的活性化と中皮腫細胞に与える悪性形質の解明

Merlin (NF2 遺伝子産物)-Hippo シグナル伝達系は NF2 が 40-50%、LATS2 が ~20%、さらに SAV1 が 5% 未満で変異していることが明らかとなったため、LATS2 が制御する YAP がん遺伝子産物について解析を進めた。(図 1)

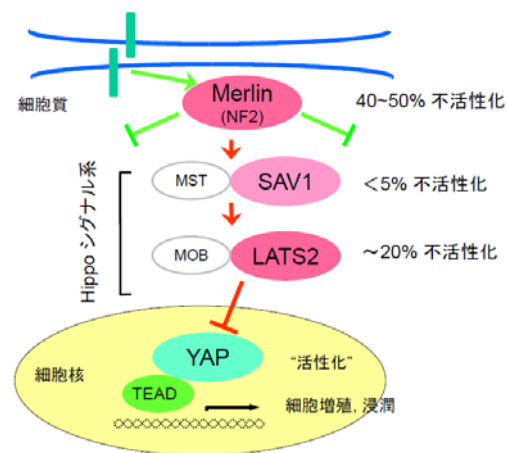


図 1. 中皮腫細胞における Merlin (NF2 遺伝子産物)-Hippo シグナル伝達系異常

LATS2 が不活性化している細胞株に野生型 LATS2 遺伝子をトランスフェクションしたところ、YAP がリン酸化され転写コアクチベーターとして不活性化されることを明らかに

した。さらに、免疫組織染色にて悪性中皮腫 45 例中 36 例にて YAP の発現を確認し、33 例において細胞核での強陽性所見を認め、多くの中皮腫組織において YAP が恒常的に活性化（転写コアクチベータとして活性化）していることを明らかにした。

YAP が恒常的に活性化している 3 株の中皮腫細胞株を用い、RNA 干渉法を用いてノックダウンし発現が低下する遺伝子群を網羅的な発現解析（DNA マイクロアレイ法）を用いて検討した。228 遺伝子が 3 株に共通して発現抑制され、特にサイクリン D1 や FOXM1 などの細胞周期を正に制御する遺伝子群が YAP により転写が制御されていることが明らかとなった。サイクリン D1、FOXM1 のプロモーター領域に YAP および転写因子 TEAD が結合することをクロマチン免疫沈降法、転写レベルが増強することをルシフェラーゼリポーターアッセイによって明らかにした。これらの遺伝子のノックダウンにより中皮腫細胞の増殖が抑えられた。

### （3）CTGF の発現亢進

YAP により結合組織増殖因子（CTGF）遺伝子の転写も亢進され、*in vivo* において腫瘍間質の造成に関与していることを明らかにした。さらに、CTGF の転写促進には TGF- $\beta$  シグナル伝達系の活性化が関与していることも明らかとなった。CTGF をノックダウンした中皮腫細胞株をヌードマウスに移植したところ、コントロールに比べマウスの生存が延長し、CTGF が *in vivo* において腫瘍の悪性化に関与していることが明らかとなった。すなわち、中皮腫細胞では Hippo シグナル伝達系の不活性化のみならず TGF- $\beta$  系の活性化が協調して CTGF の発現亢進を引き起こし、中皮腫の悪性形質の獲得に係わっていることが明らかとなった。

### （4）NF2-Hippo シグナル伝達系に関わるその他の分子の異常

悪性中皮腫における Merlin (NF2 遺伝子産物)-Hippo 腫瘍抑制シグナル伝達系に係わるコンポーネントについて中皮腫細胞株 24 株を用いてさらに詳細に検討し、NF2、LATS2、SAV1 遺伝子の不活性化の他に LATS1、AJUBA、KIBRA 遺伝子の不活性化異常の存在を新たに明らかにした。LATS1 は LATS2 とホモログ（リン酸化酵素）であるが、LATS1 分子も上流の Hippo シグナルを受けて YAP がん遺伝子産物（転写コアクチベーター）のリン酸化（不活性化）に関与していることが示唆された。LATS1 の不活性化は 24 細胞株中 5 株において認められ、その内 3 株は LATS2 の不活性化が共に認められた。LATS2 遺伝子が不活性化している中皮細胞（24 株中 6 株）では LATS1 遺伝子が共に不活性化した場合、YAP の恒常的

な活性化（低リン酸化状態）がさらに増強されることが明らかとなった。一方、中皮腫細胞において YAP の抑制（リン酸化）は LATS1 よりも LATS2 がドミナントに作用することが示唆された。

### 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 14 件）

1. Satoh M, Takemura Y, Hamada H, Sekido Y, Kubota S: EGCG induces human mesothelioma cell death by inducing reactive oxygen species and autophagy. **Cancer Cell Int** 13:19, 2013. DOI: 10.1186/1475-2867-13-19.
2. Horio M, Sato M, Takeyama Y, Elshazley M, Yamashita R, Hase T, Yoshida K, Usami N, Yokoi K, Sekido Y, Kondo M, Toyokuni S, Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y: Transient but not stable ZEB1 knockdown dramatically inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. **Ann Surg Oncol** 19 Suppl3:S634-45, 2012. DOI:10.1245/s10434-011-2142-0.
3. Mizuno T, Murakami H, Fujii M, Ishiguro F, Tanaka I, Kondo Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle promoting genes. **Oncogene** 31:5117-22, 2012. DOI: 10.1038/onc.2012.5.
4. Ishiguro F, Murakami H, Mizuno T, Fujii F, Kondo Y, Usami N, Yokoi K, Osada H, Sekido Y: Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) promotes malignant phenotypes of malignant mesothelioma. **J Thorac Oncol** 7:890-9, 2012. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31824af2db.
5. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Matsudaira Y, Ito H, Murakami H, Kondo Y, Kondo E, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y: TGF- $\beta$  synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. **J Exp Med** 209:479-94, 2012. DOI: 10.1084/jem.20111653.
6. Elshazley M, Sato M, Hase T, Yamashita R, Yoshida K, Toyokuni S, Ishiguro F, Osada H, Sekido Y, Yokoi K, Usami N, Shames DS, Kondo M,

- Gazdar AF, Minna JD, Hasegawa Y: The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant mesothelioma. **Int J Cancer** 131:2820-31, 2012. DOI: 10.1002/ijc.27598.
7. Akatsuka S, Yamashita Y, Ohara H, Liu Y, Izumiya M, Abe K, Ochiai M, Jiang L, Nagai H, Okazaki Y, Murakami H, Sekido Y, Arai E, Kanai Y, Hino O, Takahashi T, Nakagama H, Toyokuni S: Fenton reaction induced cancer in wild type rats recapitulates genomic alterations observed in human cancer. **PLoS One** 7: e43403, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0043403.
  8. Fujii M, Nakanishi H, Toyoda T, Tanaka I, Kondo Y, Osada Y, Sekido Y: Convergent signaling in the regulation of connective tissue growth factor in malignant mesothelioma: TGF- $\beta$  signaling and defects in the Hippo signaling cascade. **Cell Cycle**. 11:3373-9, 2012. DOI: 10.4161/cc.21397.
  9. Sekido Y: Inactivation of Merlin in malignant mesothelioma cells and the Hippo signaling cascade dysregulation. **Pathol. Int.** 61:331-44, 2011. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02666.x.
  10. Hwang JH, Takagi M, Murakami H, Sekido Y, Shin-Ya K: Induction of tubulin polymerization and apoptosis in malignant mesothelioma cells by a new compound JBIR-23. **Cancer Lett** 300: 189-96, 2011. DOI:10.1016/j.conlet.2010.10.005.
  11. Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y: LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. **Cancer Res** 71:873-83. 2011. DOI:10.1158/0008-5472.
  12. Ali AH, Takizawa H, Kondo K, Matsuoka H, Toba H, Nakagawa Y, Kenzaki K, Sakiyama S, Kakiuchi S, Sekido Y, Sone S, Tangoku A: 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence diagnosis of pleural malignant tumor. **Lung Cancer** 74, 48-54, 2011. DOI:10.1016/j.lungcan.2011.01.031.
  13. Tajima K, Ohashi R, Sekido Y, Hida T, Nara T, Hashimoto M, Iwakami S, Minakata K, Yae T, Takahashi F, Saya H, Takahashi K: Osteopontin-mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells. **Oncogene** 29: 1941-51, 2010. DOI:10.1038/onc.2009.478.
  14. Takemura Y, Satoh M, Satoh, K, Hamada H, Sekido Y, Kubota S: High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. **BBRC** 394 : 249-53, 2010. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.02.012.
- [学会発表] (計 11 件)
1. 関戸好孝: Molecular Abnormalities and Cell Signaling Dysregulation of Malignant Pleural Mesothelioma. The 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respirioly (APSR). Hong Kong Convention and Exhibition Centre (香港、中国) 2012. 12. 15
  2. 関戸好孝: 悪性中皮腫における Hippo シグナリング伝達系異常と遺伝子発現. Japan Mesothelioma Interest Group (JMIG) 2012 会議. 京都私学会館 (京都) 2012. 11. 17
  3. 関戸好孝: Carcinogenesis induced by asbestos exposure and genetic abnormalities in mesothelioma cells. 第 50 回日本癌治療学会学術総会. パシフィコ横浜 (横浜) 2012. 10. 26
  4. 関戸好孝、田中一大、長田啓隆、藤井万紀子: Hippo signaling pathway inactivation in malignant mesothelioma cells. 世界中皮腫グループ会議 2012 (International Mesothelioma Interest Group: IMIG) . World Trade Center (ボストン、米国) 2012. 9. 13
  5. 関戸好孝: Dysregulation of signal transduction cascades in malignant mesothelioma cells induces connective tissue growth factor (CTGF) expression. 9th China-Japan Joint Conference of Cancer. Oriental Riverside Hotel Shanghai (上海、中国) 2011. 12. 22
  6. 関戸好孝: 悪性中皮腫における新規がん抑制遺伝子 LATS2 の同定と YAP がん遺伝子の活性化. 第 52 回日本肺癌学会. 大阪国際会議場 (大阪) 2011. 11. 4
  7. 関戸好孝: 悪性中皮腫の分子病態. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場 (名古屋) 2011. 10. 05
  8. 関戸好孝: 悪性中皮腫における Hippo シグナル伝達系異常. 第 84 回日本生化学会大会. 京都国際会館 (京都) 2011. 9. 21

9. 関戸好孝：悪性中皮腫細胞における NF2 (マーリン) -Hippo シグナル伝達系の異常. BMB2010. 神戸ポートアイランド (神戸) 2010. 12. 8
10. 関戸好孝：LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. 2nd Workshop on the Hippo Tumor Suppressor Pathway. Palazzo Chigi (イタリア・ローマ) 2010. 11. 5
11. Sekido Y, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Murakami H. Inactivation of LATS2 indicates frequent dysregulation of the Merlin-Hippo signaling pathway in malignant mesothelioma. 10th International Conference of International Mesothelioma Interest Group (iMig) 京都国際会館 (京都) 2010. 9. 2

[その他]

ホームページ

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi\\_shuyo/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/03bunshi_shuyo/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関戸 好孝 (Sekido Yoshitaka)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学  
部・部長

研究者番号：00311712