

## 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 6 月 12 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590375

研究課題名（和文） 悪性中皮腫におけるがん遺伝子 YAP の腫瘍形成機構の解明

研究課題名（英文） The biological roles of YAP in malignant mesothelioma proliferation and invasion

研究代表者

村上 秀樹（MURAKAMI HIDEKI）

愛知医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90303619

研究成果の概要（和文）：我々は悪性中皮腫において Hippo 腫瘍抑制経路の構成分子の遺伝子異常が高頻度に検出されることを明らかにしてきた。Hippo 経路の不活化は転写のコアクチベーターである Yes-associated protein (YAP) およびそのホモログである TAZ の活性化を引き起こすものと考えられているが、悪性中皮腫細胞の増殖および運動能に与える影響については十分には明らかにされていない。YAP/TAZ の悪性中皮腫における生物学的な役割を明らかにするために、悪性中皮腫細胞株において YAP/TAZ をノックダウンし、細胞増殖、運動能に与える影響を調べ、また発現の変化する遺伝子群の同定を行った。YAP/TAZ のノックダウンにより増殖能、運動能の低下がみられた。発現プロファイリングにより発現の低下する遺伝子群を同定したところ、それらの多くは細胞周期の進行、アポトーシス、細胞骨格の制御に関与する分子であった。このことから YAP/TAZ は細胞周期、細胞骨格の制御に関与し悪性中皮腫の増殖・進展に関わると考えられた。YAP/TAZ は中皮腫における新たな標的治療の候補分子に成りえる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We recently revealed malignant mesothelioma cell lines frequently harbor mutations of the genes associated with Hippo tumor suppressor pathway. Dysregulation of Hippo pathway leads to activation of a transcriptional co-activator Yes-associated protein (YAP) and the YAP paralog transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ). However the detailed function of YAP/TAZ on MM cell growth or motility remains unclear. To investigate the biological roles of YAP/TAZ in MM development, we generated lentivirus mediated YAP or TAZ knock-down system in MM cells, and analyzed the changes in cell growth, motility, and the gene expression patterns with oligonucleotide microarrays. siRNA mediated reduction of YAP/TAZ in MM cell lines suppress cell proliferation and motility. We also detected the deregulation of several genes involved in cell proliferation, apoptosis, and cytoskeleton by YAP/TAZ knockdown. Our results will provide new insights into development of mesothelioma, and give some clues to developing a new molecular target therapy for mesothelioma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
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

悪性中皮腫はアスベスト暴露が原因とされ、今後も患者数の増加が予測されている。悪性中皮腫は一般に治療抵抗性であることから極めて予後不良で、新たな治療薬および早期診断法の開発が望まれている。中皮腫における遺伝子異常として癌抑制遺伝子である p14ARF/p16INK4a 遺伝子の不活化が高頻度（約 85%）に検出される。また約半数の症例において神経線維腫症 2 型 (NF2) 遺伝子の不活化が認められ、中皮腫に特徴的とされている。一方癌遺伝子の変異はほとんど認められず、新たな分子標的治療法開発の支障になっている。中皮腫の遺伝子異常を明らかにするために、我々は中皮腫細胞株を用いた遺伝子解析を行い、癌遺伝子である Yes-associated protein (YAP) の遺伝子増幅による活性化が検出されること、また新たな腫瘍抑制経路である Hippo 経路の構成分子の不活性化型の遺伝子異常が高頻度に検出されることを見出してきた。ショウジョウバエの系において NF2 遺伝子産物である Merlin は Hippo 経路を活性化すること、Hippo 経路は転写のコアクチベーター Yokkie (YAP) をリン酸化することにより、細胞質へと局在を変化させその機能を抑制することが明らかにされた。哺乳類においてもこれらの経路が保存されており、中皮腫において YAP は遺伝子増幅以外にも抑制経路の破綻によっても活性化していることが明らかになり、中皮腫の発症、進展に関与していることが示唆されている。

### 2. 研究の目的

悪性中皮腫における NF2→Hippo 経路の破

綻は YAP とそのホモログである TAZ の恒常的な活性化を引き起こし、中皮腫の増殖・進展に関与することが示唆されるが、YAP/TAZ の中皮腫細胞における生物学的役割については十分に明らかにされていない。悪性中皮腫における YAP/TAZ の生物学的役割を明らかにし、結合する転写因子および発現誘導する遺伝子群を明らかにし、中皮腫に対する新規の治療法への応用を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) YAP, Hippo 経路に関与する分子の遺伝子発現および異常の解析。

中皮腫細胞株 (20 細胞株) を用い NF2, Hippo 経路、YAP/TAZ の遺伝子異常についての解析を行う。また臨床検体を用いて遺伝子異常の有無、YAP の局在について免疫組織染色により評価を行う。

(2) 中皮腫細胞株における YAP/TAZ の生物学的役割についての解析

NF2→Hippo 経路に異常を有する細胞株において YAP あるいは TAZ をノックダウンし増殖、運動能に与える影響を調べる。ノックダウンにはレンチウイルスの系を用いる。増殖能の評価は MTT アッセイ、細胞周期解析を行う。浸潤・運動能については wound healing assay、トランスウェル、マトリゲルを用いた方法で評価を行う。

(3) YAP/TAZ が転写を誘導する遺伝子群および結合する転写因子の同定

YAP/TAZ をノックダウンした細胞より RNA を抽出し、発現プロファイルを行い発現の変化する遺伝子群を同定する。Gene ontology 解析、パスウェイ解析を行い標的遺伝子群の生物学的機能との関連性をあきらかにして

いく。直接の標的遺伝子の候補についてはリアルタイム PCR、ChIP-PCR にて確認を行う。標的遺伝子のプロモーター領域を単離し、YAP/TAZ の発現による転写活性の変化についても解析を行う。

(4) YAP/TAZ の標的遺伝子の生物学的役割についての解析

標的遺伝子のうち発現の変化のランキングおよび腫瘍形成に重要と考えられるものについては、レンチウイルスの系のノックダウンシステムを構築し増殖能・運動能に与える解析を行っていく。

#### 4. 研究成果

(1) YAP, Hippo 経路に関与する分子の遺伝子発現および異常の解析。

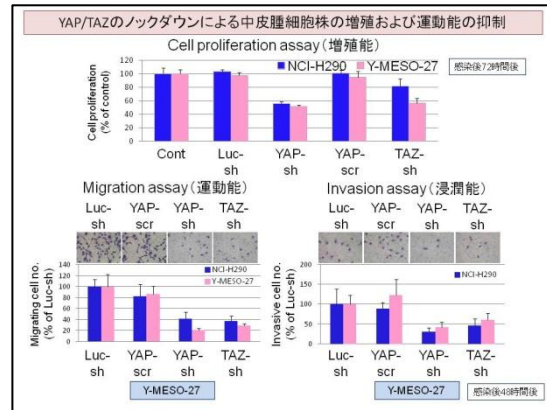
中皮腫細胞株 (20 細胞株) を用いて NF2, Hippo 経路の構成分子 (LATS2, SAV1)、YAP, TAZ の遺伝子異常の有無を CGH アレイ、変異解析を用いた調べたところ、NF2 の不活型変異が 10 細胞株で、7 細胞株で LATS2 の変異、1 細胞株で SAV1 のホモ欠失がみられた。15 細胞株 (75%) で NF2→Hippo 経路の異常が検出された。YAP/TAZ の遺伝子増幅は検出されなかった。LATS2 に関しては 25 の腫瘍組織の解析では 2 検体でホモ欠失と考えられるロスが検出された。

(2) 中皮腫細胞株における YAP/TAZ の生物学的役割についての解析

NF2 遺伝子のホモ欠失している細胞株 NCI-H290 細胞、LATS2 遺伝子をホモ欠失している Y-MESO-27 の 2 細胞株において、レンチウイルスの系を用いて YAP, TAZ をそれぞれノックダウンし増殖能、運動・浸潤能に与える影響を調べた。YAP, TAZ のノックダウンにより増殖および運動能の低下がみられた。運動・浸潤能に及ぼす影響は YAP, TAZ とともに強く、増殖能に関しては TAZ のノックダウンでは YAP と比較して弱いものであった (図 1)。

細胞周期解析では G1 アレストがみられ、また subG1 population の増加がみられ、アポトーシスが誘導されたことが示唆された。

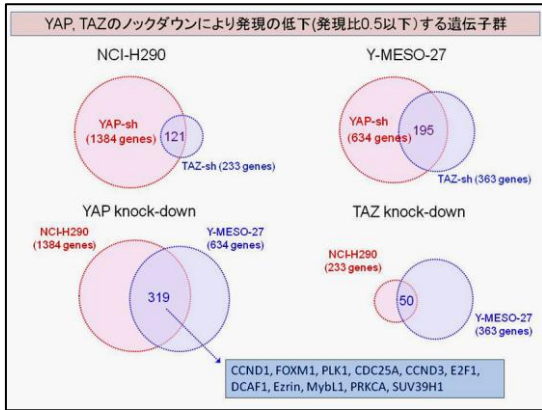
図 1 : YAP/TAZ ノックダウンによる増殖、運動能に与える影響



(3) YAP/TAZ が転写を誘導する遺伝子群および結合する転写因子の同定

YAP/TAZ をノックダウンした細胞より mRNA を抽出し、マイクロアレイにより発現解析を行い発現の変化する遺伝子群の同定を試みた。コントロールと比較して発現の低下 (1/2 以下) する遺伝子が、YAP のノックダウンにより NCI-H290 で 1384 遺伝子、Y-MESO-27 で 634 遺伝子同定された。TAZ のノックダウンでは NCI-H290 で 121 遺伝子、Y-MESO-27 で 191 遺伝子であった。YAP のノックダウンによりより多くの遺伝子の発現の低下がみられ、2 つの細胞間で共通して低下する 319 遺伝子が同定された。これらの遺伝子には CCND1(cyclin D1), FOXM1 (forkhead box M1), Aurora B, PLK1(polo-like kinase 1) E2F1 などの細胞周期に関与する遺伝子が多く含まれていた (図 2)。また Ezrin などの細胞骨格の制御に関する遺伝子の発現の低下もみられた。TAZ のノックダウンで発現の低下する遺伝子の約半数は YAP のノックダウンによっても発現の低下がみられた。

図2 : YAP/TAZ のノックダウンにより発現の低下する遺伝子群



Gene ontology 解析では細胞分裂、細胞周期との強い関連がみられ、pathway 解析では RB/E2F1、FOXM1 経路との関連が示された (図 3、4)。

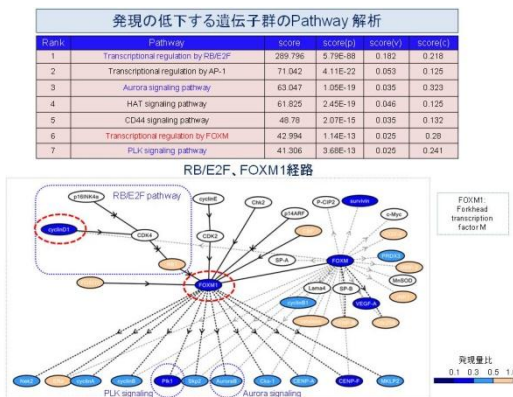
図3 : YAP ノックダウンにより発現の低下する遺伝子群の Gene ontology 解析

発現低下のみられる遺伝子群の Gene Ontology 解析						
NCI-H290 YAP-KD						
GO ID	GO name	SO Type	Number Changed	Number in GO	Percent Changed	Z-score
278	mitotic cell cycle	P	74	279	33.48416	12.166
7067	cell cycle	P	138	633	22.71134	12.732
279	M phase	P	65	242	35.71429	12.643
87	M phase of mitotic cell cycle	P	57	185	38	12.438
7067	mitosis	P	56	182	38.35616	12.42
22403	cell cycle phase	P	75	305	32.05128	12.403
22402	cell cycle process	P	120	715	24.06599	12.029
51301	cell division	P	59	217	35.11905	11.865
5694	chromosome	C	76	404	27.04626	10.661
775	chromosome, pericentric region	C	29	68	46.77419	10.369

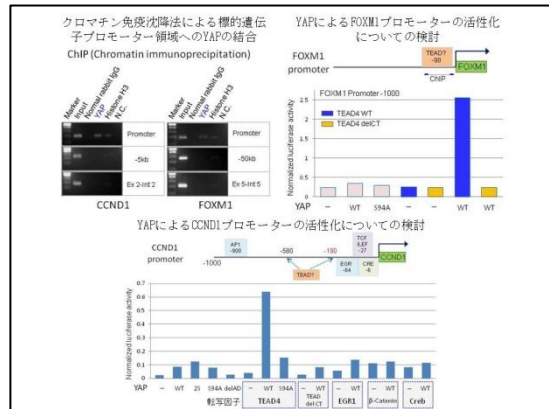
Y-MESO-27 YAP-KD						
GO ID	GO name	SO Type	Number Changed	Number in GO	Percent Changed	Z-score
278	mitotic cell cycle	P	44	279	19.9095	12.865
22403	cell cycle phase	P	45	305	19.23077	12.692
7067	mitosis	P	34	182	23.29767	12.582
87	M phase of mitotic cell cycle	P	34	185	22.66977	12.351
279	M phase	P	36	242	19.78222	11.554
7049	cell cycle	P	68	633	11.68385	10.497
775	chromosome, pericentric region	C	17	68	27.41936	9.891
22402	cell cycle process	P	59	715	11.84739	9.857
51301	cell division	P	29	217	16.56667	8.34
5819	spindle	C	14	64	26.41509	8.744

図4 : YAP ノックダウンにより発現の低下する遺伝子群のパスウェイ解析



RB/E2F1 経路の関与する遺伝子として CCND1、FOXM1 に注目して YAP の直接の標的遺伝子であるかクロマチン免疫沈降を行いプロモーター領域への結合について調べた。YAP の CCND1、FOXM1 プロモーター領域への結合が確認され、各プロモーター領域を含むレポーターアッセイでは転写因子である TEAD と協調的に転写を活性化することが明らかになった。各プロモーター領域には TEAD の結合部位が存在していた (図 5)。β-catenin, EGR1, CREB などの転写因子との協調的な転写活性はみられなかった。

図5 : CCND1, FOXM1 プロモーター領域への YAP の結合と転写活性化機構



(4) YAP/TAZ の標的遺伝子の生物学的役割について

CCND1, FOXM1 のノックダウンシステムを構築し、各遺伝子の増殖、運動能に与える影響を調べた。CyclinD1, FOXM1 とともに軽度 (20% 程度) の増殖能、運動能の抑制がみられたが、YAP のノックダウンと比較して効果は弱いものであった。

以上より YAP, TAZ の活性化は中皮腫細胞株において増殖、運動能を促進し腫瘍形成に働くと考えられた。細胞増殖の分子機構として転写因子 TEAD 結合することにより CCND1, FOXM1 など細胞周期に進行に重要な遺伝子群

の発現を促進することを明らかにした。  
YAP/TAZ は中皮腫における分子標的治療の候補分子と成りえる可能性が示唆された。

#### 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 5 件)

1. 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*, (2012); 31: 5117-22 doi: 10.1038/onc.2012.5. (査読有)
2. Ishiguro, F., Murakami, H., Mizuno, T., Fujii, M., 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.*, (2012); 7:890-899. doi: 10.1097/JTO.0b013e31824af2db. (査読有)
3. 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.*, (2012); 209(3):479-494. doi: 10.1084/jem.20111653. (査読有)
4. 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.*, (2011); 71(3):873-883. doi:

10.1158/0008-5472.CAN-09-1595. (査読有)

5. Hwang, J. H., 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.*, (2011); 300(2):189-196. doi: 10.1016/j.canlet.2010.10.005. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 石黒太志、村上秀樹、水野鉄也、谷口哲郎、横井香平、関戸好孝：悪性中皮腫における BAP1 遺伝子異常の検討。第 53 回癌学会総会 2012 年 11 月 9 日 岡山
2. 村上秀樹、谷口哲郎、水野鉄也、石黒太志、関戸好孝：高密度 CGH アレイを用いた悪性中皮腫細胞株における染色体欠失・増幅領域の網羅的解析。第 51 回肺癌学会総会 2010 年 11 月 4 日 広島
3. Murakami H., Kawada S, Taniguchi T, Kawaguchi K, Mizuno T, Ishiguro F, Fujii M, Kondo Y, Osada H, Sekido Y: Expression and functional analysis of Hairy Enhancer of Split 1(HES1) in human malignant mesothelioma cell lines. The 10<sup>th</sup> International Conference of the International Mesothelioma Intrest Group, 2010 年 9 月 2 日 京都

[その他]

ホームページ等

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

村上 秀樹 (Murakami Hideki)  
愛知医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90303619

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：