

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650650

研究課題名(和文) バイオツールを用いた新規中皮腫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapeutic tool against malignant mesothelioma

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・副所長 兼 部長

研究者番号：00311712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は極めて難治性であり現在有効な抗がん剤、分子標的剤はない。中皮腫に対する新規治療法の開発を目指し本研究を推進した。中皮腫で高頻度に不活性化しているがん抑制遺伝子p16INK4aに着目し、その機能を回復させる細胞膜透過性機能ペプチドを用いて検討を行った。その結果、中皮腫細胞特異的に細胞傷害性が誘導され、バイオツールを用いた新規治療法の有効性が確認された。さらに、中皮腫細胞で恒常的に活性化しているYAPがん遺伝子産物について解析した。YAPと結合する転写因子TEADファミリー分子の詳細が明らかになり、YAPを標的とする特異的な分子標的治療法の具体的戦略についての知見が集積した。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma (MM) is a very aggressive tumor and, currently, there are no effective chemotherapeutic drugs or molecular-target reagents against this fatal disease. In this project, we performed experiments to develop a new therapeutic modality against MM. Since MM shows frequent inactivation of p16INK4a tumor suppressor gene, we employed a functional peptide which is permeable through the cell membrane and restores p16 function. We found that this peptide induced apoptosis of MM cells very effectively and specifically, which seemed promising to be a new therapeutic tool. Furthermore, we also analyzed YAP oncogene product, which is constitutively activated and leads to more malignant phenotypes of MM cells. We clarified which members of TEAD family transcription factors, YAP binding partners, were important in deregulated MM cell proliferation. These findings were very indicative to develop a new strategy to regulate YAP protein as a therapeutic modality of MM.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療 悪性中皮腫 ペプチド創薬

## 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、本邦では 2020-2025 年ごろをピークに現在の 4 - 5 倍の死亡者数が予想されている。

悪性中皮腫では上皮成長因子受容体 (EGFR) や MET を代表とするがん遺伝子の活性化型変異や遺伝子増幅は稀であり、チロシンキナーゼ阻害剤をはじめとする新規分子標的薬の効果も極めて限定的である。現在、悪性中皮腫に有効な化学療法剤はシスプラチンとペメトレキセドのコンビネーションセラピーであるが、その治療効果は極めて限られている。

申請者は、悪性中皮腫において NF2 腫瘍抑制遺伝子が高頻度に変異し、その下流の Hippo シグナル伝達系が約 80% の中皮腫症例で不活性化していることを明らかにしてきた。特に、Hippo シグナル伝達系のコアコンポーネントである LATS2 遺伝子の不活性化異常を同定し、この NF2-Hippo シグナル伝達系の不活性化は転写コアクチベーターである YAP がん遺伝子産物の恒常的活性化を引き起こし、様々な遺伝子の転写亢進に繋がることを明らかにしてきた。それらにはサイクリン D1 などの細胞周期を促進する遺伝子群や結合組織成長遺伝子 (CTGF) などが含まれていた。

NF2-Hippo シグナル伝達系を標的とする分子標的療法の開発のためには、YAP をターゲットとすることが重要であると考えられ、YAP がいかに転写因子 TEAD とともに悪性中皮腫細胞における遺伝子発現亢進を引き起こしているかは、明らかではなかった。また、研究分担者が開発に携わっている細胞膜透過性のある抗腫瘍ペプチドに関しては中皮腫細胞に対する有効性はほとんど明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

悪性中皮腫細胞において最も高頻度に変異している CDKN2A 遺伝子に着目し、細胞膜透過性機能ペプチドを導入することにより中皮腫細胞株に対する腫瘍抑制性効果を明らかにし、細胞膜透過性機能ペプチドが悪性中皮腫の新規治療バイオツールとして有用性があるかどうかについて明らかにすることを目的とする。

YAP が転写コアクチベーターとして結合する転写因子 TEAD には TEAD1、2、3、および 4 と 4 種類のホモログがあり、中皮腫においてどの TEAD が重要であるか明らかになっていない。中皮腫細胞における TEAD の役割を明らかにし、YAP-TEAD 結合を阻害する治療戦略の基盤的知見とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 悪性中皮腫細胞株

悪性中皮腫細胞株は、in vitro の各種アッセイには NCI-H2052 株、NCI-H2373 株、および当センターで樹立した Y-MESO-12 株および Y-MESO-30 株の 4 株を使用した。コントロールとして不死化正常中皮細胞株 MeT-5A を使用した。各種の遺伝子発現レベルの検討のために、他に、中皮腫細胞株 20 株から抽出した RNA を合わせ、合計 24 細胞株の発現を検討した。

### (2) 機能ペプチド投与

蛍光標識タンパク (FITC) および p16 の機能を回復させるために必要な最小の配列 (p16 MIS) に D-鏡像異性体アルギニンを 9 つ付加したペプチド (r9、r9-p16 MIS) の 2 種類のペプチドを用いた。細胞への取り込ませるため、ペプチドを 50  $\mu$ L のリン酸緩衝液に混入し室温で 45 分放置した。その溶解液をペプチドの目的の最終濃度 (r9: 2  $\mu$ M、r9-p16 MIS: 10  $\mu$ M、20  $\mu$ M) となるようにして 500  $\mu$ L の RPMI1640 培地 (10% FBS 入り) に混ぜ、培養に用いた。

細胞は 48 穴プラスチックプレートに 1 穴あたり  $3 \times 10^4$  個ずつ細胞を撒き、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養後にペプチドを投与した。ペプチドの投与後、48 時間後に細胞を観察した。

### (3) 免疫沈降法

培養した細胞に細胞溶解緩衝液 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, NP-40 0.5%, EDTA 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, protease inhibitor x1) を投与してライセートを回収し、15,000 rpm、4 分で 15 分間遠心した後、上清に一次抗体 (抗 YAP 抗体) を混和した。4 分で 12 時間転倒混和を行った後 Protein G-Sepharose をサンプルの 5% 相当量加えてさらに 2 時間転倒混和。その後、3,000 rpm、4 分で 1 分間遠心し、上清は TCA 沈降した後に SDS-PAGE 緩衝液で調整、沈殿物は細胞溶解緩衝液で 4 回洗浄後に SDS-PAGE 緩衝液で調整した。それぞれのサンプルはウェスタンブロット法で解析し、得られた蛋白の量を相対的に評価した。

一次抗体には anti-YAP 抗体 (ab52771 abcam)、anti-TEAD1 抗体 (#8526 CST)、anti-TEAD2 抗体 (#8870 CST)、anti-TEAD3 抗体 (ab75192 abcam)、anti-TEAD4 抗体 (ab155244 abcam)、また、コントロールとして anti-actin 抗体 (A5441 Sigma-Aldrich) を使用した。

### (4) 細胞増殖アッセイ

中皮腫細胞株 3 株と MeT-5A をそれぞれ

れ $2 \times 10^3$ 個ずつ96-穴プラスチックプレートへ撒き、24時間培養後に YAP (Santa Cruz)、TEAD1、TEAD2、TEAD3、TEAD4 として control (Ambion) の siRNA を RNAi MAX (Invitrogen) を用いて transfection した。その後、24 時間、72 時間、96 時間、120 時間経過した時点で TetraColor ONE (生化学) を  $10 \mu\text{l}$  加え、40 分後にマルチプレートリーダーで 450nm の吸光度を計測した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 悪性中皮腫細胞株に対するポリアルギニン付加ペプチドの取り込み効率

ポリアルギニンを付加したペプチドの細胞内への取り込みが十分に行われるかを確認するため、蛍光標識したポリアルギニンペプチド (r9) を培養した細胞へ投与した。ペプチドを投与した 48 時間後にトリプシン処理をして細胞を回収し、蛍光顕微鏡で観察した。MeT-5A、NCI-H2052、NCI-H2373、Y-MESO-12 細胞と比較して Y-MESO-30 細胞ではややペプチドの取り込みが弱かったが、いずれの細胞でもペプチドが細胞内へ取り込まれていることが確認された。(図 1)

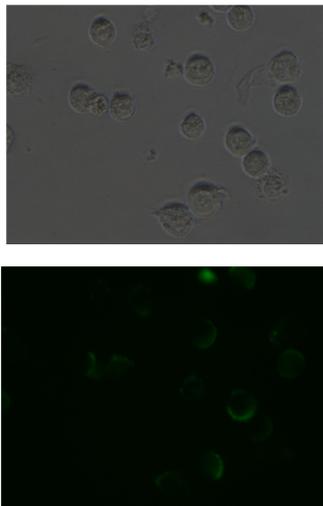


図 1 . NCI-H2373 株に対する蛍光ポリアルギニンペプチドの導入の観察 (上、位相差; 下、蛍光)

##### (2) 悪性中皮腫細胞株に対する p16 最小阻害配列 (p16 MIS) の導入

r9-p16 MIS ペプチドが細胞内に取り込まれて p16 の機能を回復することができるか否かを確認するため、p16 (CDKN2A) を欠損した 4 つの中皮腫細胞株に r9-p16 MIS ペプチドを投与し、48 時間後の形態学的な変化を観察した。いずれの細胞でも  $20 \mu\text{M}$  の濃度のペプチドを投与した場合には顕著なアポトーシス様の形態学的変化を認めた。特に Y-MESO-12 細胞では細胞死が著明で生

胞はほとんど見られなかった。(図 2)

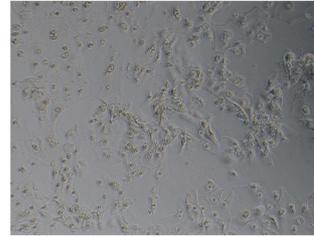


図 2 r9-p16 MIS ペプチドによる細胞死の誘導 (Y-MESO-12 細胞株)

r9 ペプチドの取り込みが他の細胞よりも弱かった Y-MESO-30 細胞でも  $20 \mu\text{M}$  のペプチドを投与した際にはアポトーシスが誘導されていた。さらに  $10 \mu\text{M}$  の濃度のペプチドを投与した場合は、いずれもアポトーシスは誘導されたが、その割合は  $20 \mu\text{M}$  のペプチド投与時よりも低く、濃度依存性にアポトーシスが誘導されることが確認された。一方、p16 の発現が残存している正常細胞への影響を確認するため、不死化中皮細胞の MeT-5A に対しても同様に r9-p16 MIS ペプチドを投与した。やはりペプチド投与後 48 時間に形態を観察したところ、他の中皮腫細胞ほどではないが、アポトーシスの導入が観察された。 $10 \mu\text{M}$  のペプチド投与でもわずかにアポトーシスをおこした細胞が観察された。

##### (3) 細胞の密度依存的な YAP-TEAD 結合

Hippo 経路が不活性化し、YAP が恒常的に活性化している細胞株において、YAP とともに転写活性に働く TEAD ファミリー 4 分子のうち、どの分子が細胞増殖に関与しているかをスクリーニングする目的で抗 YAP 抗体を用いて免疫沈降を行った。

Hippo 経路の最終酵素で YAP をリン酸化する LATS2 が欠失している細胞株である Y-MESO-27 細胞と、コントロールとして不死化中皮細胞の MeT-5A 細胞を用いた。それぞれ遅滞期、対数増殖期、増殖停止期で別々に細胞ライセートを抽出し、抗 YAP 抗体で免疫沈降を行った。その結果、不死化中皮細胞の MeT-5A では、細胞密度が高くなると YAP と TEAD3、TEAD4 との結合が減少していたのに対し、Y-MESO-27 細胞では細胞密度の変化に関わらず YAP と TEAD の結合が減少しなかった。このことから、Y-MESO-27 株で活性化している YAP は TEAD3、4 を介して細胞増殖を亢進している可能性が示唆された。(図 3)

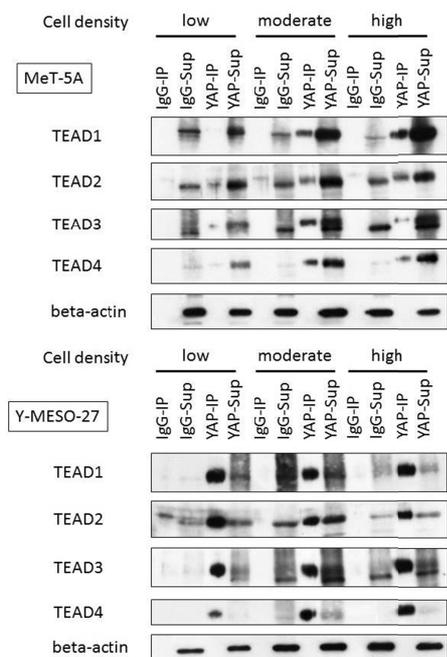


図3 細胞密度の差による YAP-TEAD 結合の差：抗 YAP 抗体で免疫沈降の後、ウエスタンブロットにて検出

#### (4) TEAD ホモログと細胞増殖

MeT-5A、Y-MESO-27、Y-MESO-30、NCI-H2373 細胞に対し、それぞれ YAP、TEAD1、TEAD2、TEAD3、TEAD4 とコントロールの siRNA を transfection し、細胞増殖アッセイを行った。Y-MESO-27 細胞では TEAD2、TEAD3 をノックダウンしたときに YAP と同程度細胞増殖が抑制され、TEAD1、TEAD4 ではコントロールと差がなかった。(図4) 一方、MeT-5A 細胞と Y-MESO-30、NCI-H2373 細胞ではそれぞれ軽度の細胞増殖抑制は見られたもののコントロールと比較して目立った差は見られなかった。このことから、細胞により一部の TEAD が増殖に強く関与しているものとそうでないものがあることが示唆された。

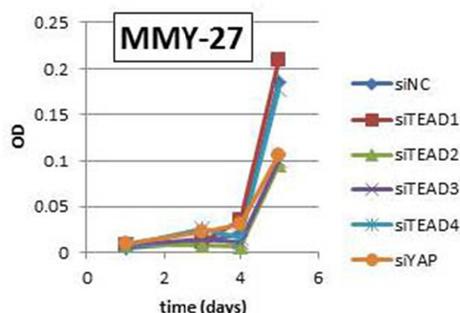


図4 RNA 干渉法による Y-MESO-27 細胞株の

## 増殖抑制効果

### 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. 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. 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*, 7, 890-9, 2012. 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*, 209:479-94, 2012. 査読有
4. 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 Suppl 3:S634-45, 2012. 査読有
5. 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. 査読有
6. Fujii M, Nakanishi H, Toyoda T, Tanaka I, Kondo Y, Osada H, Sekido Y: Convergent signaling in the regulation of the connective tissue growth factor in malignant mesothelioma: TGF-beta signaling and defects in the Hippo signaling cascade. *Cell Cycle*, 11: 3373-3379, 2012. 査読有
7. Sekido Y: Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*, 34:1413-9, 2013. 査読無
8. 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. 査読有
9. Abe S, Morita Y, Kato-Kaneko M, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y: A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. *J Immunol*, 190: 6239-40, 2013. 査読有
  10. Chew S-H, Okazaki Y, Nagai H, Misawa N, Akatsuka S, Yamashita K, Jiang L, Yamashita Y, Noguchi M, Hosoda K, Sekido Y, Takahashi T, Toyokuni S: Cancer-promoting role of adipocytes in asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through dysregulated adipocytokine production. *Carcinogenesis* 35 : 164-72 , 2014. 査読有
  11. Tanaka I, Osada H, Fujii M, Fukatsu A, Hida T, Horio Y, Kondo Y, Sato A, Hasegawa Y, Tsujimura T, Sekido Y: LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. *Oncogene in press*. 査読有
  12. Kondo E, Saito K, Tashiro Y, Kamide K, Uno S, Furuya T, Mashita M, Nakajima K, Tsumuraya T, Kobayashi N, Nishibori M, Tanimoto M, Matsushita M: Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems. *Nature Commun*, 3:951-963, 2012. 査読有
  13. Tcherniuk S, Fiser A-L, Derouazi M, Toussaint B, Wang Y, Wojtal I, Kondo E, Szolajska E, Chroboczek J: Certain protein transducing agents convert translocated proteins into cell killers. *Acta Biochimica Pol*. 59:433-9., 2012. 査読有
  14. Saito K, Takigawa N, Ohtani N, Iioka H, Tomita Y, Ueda R, Fukuoka J, Kuwahara K, Ichihara E, Kiura K and Kondo E: Anti-tumor impact of p14ARF on gefitinib-resistant non-small cell lung cancers. *Mol. Cancer Ther*. 12:1616-1628, 2013. 査読有
- [学会発表](計 15 件)
1. Sekido Y, Tanaka I, Osada H, Fujii M : Hippo signaling pathway inactivation in malignant mesothelioma cells. iMig (international Mesothelioma interest group) 2012 (Boston, USA) (口演)
  2. Sekido Y: Molecular Abnormalities and Cell Signaling Dysregulation of Malignant Pleural Mesothelioma. The 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (香港、中国) (シンポジウム)
  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 (横浜) (シンポジウム)
  4. 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. (京都)(口演)
  5. 田中一大、長田啓隆、藤井万紀子、深津明日樹、樋田豊明、佐藤鮎子、長谷川好則、辻村亨、関戸好孝: LIM ドメインをもつ AJUBA 蛋白質は、Hippo シグナル経路を介して悪性中皮腫細胞の増殖を抑制する。第 72 回 日本癌学会学術総会 2013 (横浜)(English Oral)
  6. Sekido Y, Tanaka I, Fujii M, Osada H: Hippo signaling cascade alteration in malignant mesothelioma. Keystone symposium (モントレイ, USA) (ポスター)
  7. 関戸好孝: 悪性中皮腫における Hippo シグナル伝達系異常 第 11 回日本臨床腫瘍学会 (シンポジウム)(仙台)
  8. 関戸好孝: 悪性中皮腫の遺伝子・シグナル伝達系異常 Japan mesothelioma interest group (JMIG) 2013 (セミナー) (京都)
  9. Sekido Y: Dysregulation of Hippo tumor-suppressive pathway in malignant mesothelioma. The 15th IASLC World Conference on Lung Cancer (シドニー、オーストラリア)(ポスター)
  10. 関戸好孝: 悪性中皮腫に対する新規治療法開発へ向けた中皮腫細胞株の利用. 平成 25 年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会 (名古屋) (ポスター)
  11. 関戸好孝: 悪性中皮腫の遺伝子異常. 第 8 回中皮腫細胞診セミナー。2014 (福岡) (口演)
  12. 近藤英作: ペプチドを応用した新規生体低侵襲性制がん DDS 技術の開発研究 招聘講演 (シンポジウム) 仙台 (仙台国際センター) 2014
  13. 近藤英作: 低侵襲性制がん医療技術の構築を目指した腫瘍吸収性ペプチドの開発 第 98 回 岡山県医用工学研究会 シンポジウム 岡山 (岡山大学福武記念ホール) 2014
  14. Kondo E, Saito K, Iioka H, Watanabe R.: Development of the Tumor-homing peptides and its application for the next-generation tumor medicine. 第 7

- 2 回日本癌学会学術総会 English Oral session 横浜(パシフィコ横浜)2013
15. 近藤英作:ペプチドをベースとした生体低侵襲性制がん医療技術へのアプローチ 第2回国際先端生物学・医学・工学会議(ICIBME 2013)シンポジウム(基調講演)愛知県がんセンター 2013

〔図書〕(計2件)

1. 関戸好孝:「悪性胸膜中皮腫にみられる遺伝子異常」胸膜全書、第7章1 p277-285 (医薬ジャーナル社)2013年5月20日発行
2. 近藤英作:「腫瘍組織に吸収されるペプチド~癌の新しい医療技術」G.I. Research (Journal of Gastrointestinal Research)(先端医学社)特集 消化器腫瘍の分子イメージング 22(1), 17-23, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

1)【出願番号】特願 2012-085969

【出願日】平成24年4月4日

【発明・工業所有権の名称】「アデノウイルスベクターをがん細胞に対して選択的に導入可能なポリペプチドおよび当該ポリペプチドを備えるアデノウイルスベクター」

【発明者】○近藤英作、阪口政清、許南浩、手塚克成

【特許出願人】愛知県、岡山大学、(株)糖鎖工学研究所

〔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

愛知県がんセンター(研究所)分子腫瘍学部  
(副所長 兼 部長)

研究者番号: 00311712

(2)研究分担者

近藤 英作

愛知県がんセンター(研究所)腫瘍病理学部  
(部長)

研究者番号: 30252951

藤井 万紀子

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: 70406031