

201220065A

厚生労働科学研究費補助金
第3次対がん総合戦略研究事業

悪性中皮腫の増殖、分化に係る細胞特性
に基づく新規治療法の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関 戸 好 孝

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

悪性中皮腫の増殖、分化に係る細胞特性に基づく新規治療法の開発

研究代表者 関戸好孝 1

II. 分担研究報告

1. 悪性中皮腫の細胞特性と治療効果に関する解析

関戸好孝 (愛知県がんセンター研究所・分子腫瘍学部) 15

2. 正常中皮細胞株の樹立と新規分子標的薬の効果の検討

中西速夫 (愛知県がんセンター研究所・腫瘍病理学部) 19

3. 悪性中皮腫の細胞周期・細胞極性の異常の解析と阻害薬の検討

稲垣昌樹 (愛知県がんセンター研究所・発がん制御研究部) 25

4. 正常中皮細胞に対する遺伝子導入による悪性化の検討

瀬戸加大 (愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部) 31

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 39

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
総括研究報告書

悪性中皮腫の増殖、分化に係る細胞特性に基づく新規治療法の開発

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 部長

研究要旨：悪性中皮腫の患者予後は極めて不良であり、現在、有効な抗がん剤や有効な分子標的薬は存在せず、標準的治療法は未だ確立されていない。悪性中皮腫は CDKN2A/CDKN2B, NF2, BAP1 の3つの腫瘍抑制遺伝子の高頻度変異が明らかになっているが、既存の分子標的治療法の標的となりうる活性型がん遺伝子変異に乏しく、新たな分子標的治療法の開発は極めて遅れている。悪性中皮腫において NF2 遺伝子の不活性化等により NF2（マーリン）-Hippo 細胞内増殖抑制シグナル伝達系は極めて特徴的に不活性化しており転写コアクチベータである YAP がん遺伝子の恒常的な活性化が高頻度に認められる。本年度、Hippo シグナル伝達系の制御に係わることが最近報告された複数の分子を詳細に検討し、LIM ドメイン蛋白である Ajuba が高頻度に発現低下していることを明らかにした。悪性中皮腫細胞株 24 細胞株中、不死化正常中皮細胞株の発現レベルに比べ 21 株で Ajuba 蛋白が発現低下していた。Ajuba 遺伝子を中皮腫細胞株にトランスフェクションしたところ、中皮腫の細胞増殖が抑制され、Ajuba が中皮腫細胞において腫瘍抑制性に機能することが明らかとなった。さらに、YAP1 をリン酸化して不活性化する LATS2（Hippo シグナル伝達系の因子）をノックダウンしたところ、Ajuba による腫瘍抑制機能が減弱し、Ajuba の細胞増殖抑制は LATS2 依存性であることが明らかになった。中皮腫細胞における YAP1 の恒常的な活性化には NF2 遺伝子変異、LATS2 遺伝子変異の他に Ajuba 分子の発現低下が大きく関与している可能性が示唆された。

中皮腫には種々の組織型（上皮型、2相型、肉腫型）が存在し、肉腫型ほど悪性度が高い。しかし、この組織多様性の背景に存在すると考えられる中皮細胞の分化や上皮間葉移行 (EMT) などの制御メカニズムは殆ど明らかになっていない。本年度、初代中皮細胞に HPV-E6, E7 および hTERT 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、敷石状に増殖する上皮性の株から繊維芽細胞様の形態を示す株まで上皮型、2相型、肉腫型を mimic する種々の不死化中皮細胞株（パネル）を作成した。樹立した細胞株は Calretinin, Podoplanin, Mesothelin などの中皮細胞マーカーを中等度から高度に発現し、Merlin など Hippo シグナル伝達経路がインタクトに保存されていた。これらの細胞株は、少数の染色体異常は認めるものの、ヌードマウスでは造腫瘍性を認めなかった。さらに、レンチウイルスベ

クターを用いて Luciferase 遺伝子を導入した中皮腫細胞株を複数株樹立した。この細胞をヌードマウスの胸腔内に接種し、形成された胸膜播種を生きのまま体外から経時的に発光イメージングでき、前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種モデルを確立した。

さらに、これらの不死化した正常中皮細胞株 3 株に YAP1 がん遺伝子を導入することで *in vitro* にて増殖促進効果が認められることを確認した。さらに YAP1 遺伝子を導入した正常中皮細胞株をヌードマウスへ移植した結果、*in vivo* においても腫瘍を形成できることを確認した。このことは特定の遺伝子導入により悪性中皮腫モデルを作成できたことを意味するものと考えられた。

最後に、中皮細胞における一次線毛形成について基盤的な解析を進めた。一次線毛は、一つの細胞に一つだけ生じる細胞膜上の突起物で、正常細胞の増殖休止期に形成される。多くのがん細胞が一次線毛形成能を失っており、これが細胞周期制御を逸脱する原因の一つであると考えられている。我々はトリコブレイン分子が、分裂キナーゼであるオーロラ A キナーゼを活性化し、また、一次線毛を消失させて、正常細胞における円滑な細胞周期の進行に寄与していることを明らかにしてきた。オーロラ A キナーゼの阻害薬の投与により、正常細胞では一次線毛を形成することで細胞周期を停止させて細胞死を回避することができるが、一次線毛形成能を失っているがん細胞では増殖休止を生じず細胞分裂障害を起こして死滅することを明らかにした。複数の不死化正常中皮細胞株を用い、血清飢餓誘導により一次線毛形成を検討したところ、LP9/TERT1 細胞株において一次線毛形成が確認された。

以上、本年度は悪性中皮腫細胞のシグナル伝達系の解析、不死化中皮細胞の樹立と *in vitro*, *in vivo* における解析、さらには細胞生物学的な特性に関する解析が着実に遂行した。

研究分担者	所属施設名	職名	制シグナル伝達系について、その原因となる分子異常を明らかにし、中皮腫に対する新たな治療戦略を構築するための基盤的知見を得ることを目的とする。
関戸好孝	愛知県がんセンター研究所	部長	
中西速夫	愛知県がんセンター研究所	室長	
稲垣昌樹	愛知県がんセンター研究所	部長	
瀬戸加大	愛知県がんセンター研究所	副所長	ヒトパピローマウイルス E6/E7-hTERT を用い、種々の分化形質を示す不死化正常中皮細胞株の樹立を試み、樹立株の特性を明らかにすることを目的とする。不死化した正常中皮細胞株に悪性中皮腫関連のがん遺伝子を導入し、増殖

A. 研究目的

悪性中皮腫において高頻度に不活性化が生じている NF2 (マーリン) -Hippo 細胞内増殖抑

様式や形態変化を検討すると共に、マウスへの移植実験により造腫瘍性を明らかにする。これらにより悪性中皮腫の腫瘍化に関わる分子機構を解明することを目的とする。また、前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種発光イメージングモデルの作成することを目的とする。

中皮腫細胞の新たな細胞増殖・分化制御の仕組みを明らかにし、その阻害あるいは誘導による効果を明らかにすることを目的とする。特に、正常二倍体細胞における一次線毛形成と細胞周期進行の逆相関に注目し、正常中皮のモデルとなる細胞を一次線毛形成能に注目して検討することを目的とする。

B. 研究方法

a) NF2 (マーリン) -Hippo 細胞内増殖抑制シグナル伝達系の解析

悪性中皮腫細胞株 24 株を使用して解析を行った (Y-MESO-8D, Y-MESO-14, Y-MESO-27 などの 18 株は当センターで樹立に成功した細胞株を使用した)。培養細胞より RNA および whole cell lysate を抽出し、発現解析を行った。NF2 (マーリン) -Hippo シグナル伝達系路の分子については抗 Ajuba 抗体、抗 MST1 抗体、抗 MST2 抗体、抗 KIBRA 抗体、抗 LATS1 抗体、抗 LATS2 抗体、抗 YAP 抗体、抗 phospho-YAP 抗体等を用いてウエスタンブロット法にて検討を行った。RT-PCR 法にて Ajuba cDNA を増幅し、Ajuba 発現プラスミドベクター及びレンチウイルス発現ベクターを構築した。また、Ajuba のノックダウンは RNA 干渉法を用いた。腫瘍増殖抑制効果は Tetra Color One を用いたカロリメトリッ

クアッセイ及びソフトアガーコロニー形成能アッセイを用いた。免疫蛍光染色にて Ajuba 等の局在を検討した。

b) 不死化正常中皮細胞株の樹立とその特性の解析

胃がん患者の切除大網組織および腹水より中皮細胞の初代培養を行い、敷石状に増殖する上皮様コロニーを分離してこれに HPV-E6, E7 および hTERT 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、不死化中皮細胞株を作成した。さらにリングクローニング法により敷石状に増殖する上皮型から繊維芽細胞様に増殖する肉腫型まで、細胞形態の異なる亜株を複数分離した。次にこれらの細胞株を用いて染色体の核型解析やヌードマウスにおける造腫瘍性を検討した。また蛍光染色、定量 RT-PCR 法や Western blot 法等をもちいて Rb 経路や Hippo シグナル伝達経路の解析を行った。一方、in vivo における腫瘍組織形成能を見るためレトロウイルスベクター MIG-YAP を用いて YAP を強制発現させた株を作成した。

c) 発光イメージングの可能な悪性中皮腫の胸腔播種モデルの作成

NCI-H290 細胞等にレトロウイルスベクター CSII-luc を用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入し、薬剤選択により安定細胞株をえた。この H290-Luc 細胞をマウスの胸腔内に接種し、経時的にルシフェリンを胸腔内に投与し、胸腔内の腫瘍増殖や胸腔内進展を IVIS Lumina II を用いて in vivo

イメージングを行った。また一定期間後、マウスを屠殺解剖し、胸腔を開いた状態で胸腔内の播種性進展を定量的に検討した。

d) In vitro 増殖様式の検討方法

リン酸カルシウム法を用い 293T を標的として、悪性中腫関連がん遺伝子である野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1 (S127A) を組み込んだプラスミドを用いてウイルス産生 (レトロウイルスベクター) させ、標的細胞 (正常中皮細胞株) へ感染させた。YAP1 のレポーター遺伝子として GFP を使用した。感染させた標的細胞の細胞増殖の観察を Corning 6 well 細胞培養プレートを用いて培養した。4 日毎に継代し、継代時に FACS を行い GFP 陽性細胞の割合を 40 日間継時的に調べた。

e) ノードマウスへの皮下移植

野生型 YAP1 もしくは恒常的活性型 YAP1 (S127A) を導入した不死化正常中皮細胞を $7.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 個/1 か所まで増やし、ノードマウスへ接種した。対照群としてレポーター遺伝子である GFP のみを導入した (Empty vector) 正常中皮細胞を接種した。皮下接種の場合、1 匹につき Empty vector 導入正常中皮細胞を左背側の 2 か所に接種し、野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1 (S127A) 導入正常中皮細胞を右背側の 2 か所に接種 (1 匹につき 4 か所接種) した。胸腔内へは 1 匹につき 1 か所ずつ、Empty vector・野生型 YAP1・活性型 YAP1 (S127A) 導入正常中皮細胞を接種した。

f) 中心体での蛋白質局在解析

特異的な抗体により、マーカー分子と共に組織染色、細胞染色を行いその局在を高解像度顕微鏡 (デルタビジョン) により確認した。また、分画を調整しそのイムノブロットを行うことで生化学的にも局在を検討した。一次線毛形成は血清飢餓により誘導した。

g) オーロラ A キナーゼアッセイ

トリコプレインとオーロラ A の共発現によるオーロラ A リン酸化 (pT288) の変化を検討した。また in vitro のキナーゼ活性変化はトリコプレインとオーロラ-A のリコンビナント精製蛋白質を混合し、ヒストン H3 を基質にすることで検討した。

h) トリコプレイン・オーロラ A の中心体機能の解析

RNA 干渉法によるノックダウンを行い、その発現を減弱させた。その状態において免疫染色により解析必要な分子の検討をした。トリコプレイン機能欠失による一次線毛形成については主に RPE1 細胞で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て提供された検体を実験に使用した。また、遺伝子組換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得て行った。動物実験は愛知県がんセンター動物委員会の許

可を得た上で行った。

C. 研究結果

1. 悪性中皮腫細胞における NF2-Hippo 関連分子の発現解析

培養中皮腫細胞株 24 株および不死化正常中皮細胞株 MeT-5A 株を用いてウエスタンブロット法等にて発現解析を行った。NF2, LATS2 などの中皮腫において遺伝子異常を有する既知の分子についてその発現低下を確認した。さらに Ajuba, MST1 などの本シグナル伝達系に関与することが報告されている分子について検討を行った。MST1 の発現異常は認められなかったが Ajuba は 24 株中 21 株の中皮腫細胞株において MeT-5A コントロール株より発現低下していることが観察された。

2. Ajuba 遺伝子導入による YAP リン酸化解析

Ajuba の発現が低下した細胞株に Ajuba 発現レンチウイルスを感染させたところ、YAP のリン酸化（不活性化）が誘導された。さらに YAP の転写標的遺伝子である CCND1 および CTGF のプロモーター活性に与える影響をルシフェラーゼレポーターアッセイにて検討したところ、Ajuba の強制発現がそれらのプロモーター活性を抑制することを明らかにした。一方、Ajuba 導入による YAP リン酸化が LATS ファミリーキナーゼ依存性か否を確かめるために、RNA 干渉法を用いて LATS1 あるいは LATS2 をノックダウンして解析を行ったところ、特に LATS2 キナーゼ依存的に YAP がリン酸化されることが明らかとなった。

3. Ajuba の細胞内局在の検討

中皮腫細胞における Ajuba 分子の局在を Cell fractionation を用いたウエスタンブロット法および免疫蛍光染色法にて検討したところ細胞質に局在することが明らかとなった。さらに Ajuba の強制発現により YAP が細胞核から細胞質に移動（転写コファクターとしては不活性化）することが明らかとなった。

4. Ajuba による中皮腫細胞増殖能抑制効果

Ajuba の発現低下が観察された中皮腫の細胞株に Ajuba を強制発現させたところ、細胞増殖抑制効果が観察された。一方、Ajuba が発現低下しているが LATS2 遺伝子が欠失している細胞株では増殖抑制効果は非常に弱かった。FACS による細胞周期の解析では Ajuba 導入により G1 あるいは G2 アレストを誘導していることが明らかとなった。

5. 不死化正常中皮細胞株の樹立とその特性の解析

リングクローニング法により細胞形態が異なり、悪性中皮腫の上皮型、2 相型、肉腫型をミミックする 3 種類の不死化中皮細胞株を作成した（上皮型：HOMC-2 A-7 (B-1), 2 相型：HOMC-2 A-7 (D-4), 肉腫型：HOMC-3 A-4）。HPV-E6, E7, hTERT および P16 等の発現を RT-PCR 法で調べ、HOMC-2 A-7 (B-1) (以下 B-1), HOMC-2 A-7 (D-4) (以下 D-4), HOMC-3 A-4 細胞 (以下 A-4) のみで高発現していることを確認した、また不死化細胞は中皮腫細胞と異なり初代培養細胞と同様に P16 を高発現しており、Rb のリン酸化は阻止されるが、E7 が直接 Rb に結合することにより、Rb 経路を不活化し S 期移行を促進していることを確認した。ヌードマウ

スにおける造腫瘍性は皮下移植、胸腔内移植ともに認めなかった。次に各種中皮細胞マーカー遺伝子発現を解析したところ、不死化 B-1 細胞株は上皮マーカー (E cadherin) を初代培養細胞と同様に高発現していたが、D-4 細胞の E cadherin 発現は低く、A-4 細胞では発現を殆ど認めなかった。一方、Merlin (NF2) は不死化細胞では悪性中皮腫細胞と異なり初代培養細胞と同様に高発現しており、そのタンパク局在も悪性中皮腫細胞が核であるのに対し、不死化中皮細胞では細胞質により多く局在していた。

6. 発光イメージングの可能な悪性中皮腫の胸腔播種モデルの作成

H290-Luc 細胞を胸腔内に接種し、経時的にルシフェリンを腹腔内に投与し、胸腔内の腫瘍増殖や胸腔内進展を IVIS Lumina II を用いて *in vivo* イメージングを行った。胸腔は肋骨など硬組織に被われているため、蛍光イメージングでは体外からのイメージングは不可能であるのに対し、発光イメージングでは胸腔接種後 1 日目から数週間まで体外からの経時的な胸腔内腫瘍の非侵襲的モニタリングが可能であった。

7. 不死化中皮細胞への YAP 遺伝子導入

同一個体から由来する不死化正常中皮細胞株をクローニングすることにより形態の異なる細胞株をこれまで樹立してきた。それらは、形態学的に上皮型 (HOMC-2 A-7 B-1) (上皮型 1) と、肉腫型① (HOMC-2 A-7 D-4) (肉腫型 2)、と肉腫型② (HOMC-3 A-4) (肉腫型 3) に分けられる。まず、B-1 (上皮型 1)、D-4 (肉腫型 2)、A-4 (肉腫型 3) を対象に、野生型 YAP1 あるいは

活性型 YAP1 (S127A) 遺伝子を導入し、細胞増殖能における役割を検討した。その結果、*in vitro* での増殖効果を検討したところ B-1 (上皮型 1) では増殖促進効果は明確に認められなかったものの、D-4 (肉腫型 2) では明確に増殖促進効果が認められた。一方、A-4 (肉腫型 3) では、遺伝子導入のない元の細胞株と比較し増殖能の低下が認められた。

8. YAP 遺伝子導入した不死化中皮腫細胞の *in vivo* 移植実験

遺伝子導入のない元の細胞株もしくはレポーター遺伝子 GFP のみ導入した細胞株ではヌードマウスへの皮下接種にて腫瘍は作らなかったものの、活性型 YAP1 (S127A) を導入した B-1 (上皮型 1)、D-4 (肉腫型 2) ともに腫瘍を形成した。また野生型 YAP1 導入の細胞株においても腫瘍形成を認めた。

活性型 YAP1 (S127A) を導入した B-1 (上皮型 1)、D-4 (肉腫型 2)、A-4 (肉腫型 3) を胸腔内接種にていずれの細胞株でも胸腔内に腫瘍形成を認めた

9. 中皮細胞における一次線毛形成

中皮細胞における一次線毛形成について検討を進めた。一次線毛は、一つの細胞に一つだけ生じる細胞膜上の突起物 (アンテナ様構造物) で、正常細胞の増殖休止期に形成される。多くのがん細胞が一次線毛形成能を失っており、これが細胞周期制御を逸脱する原因の一つであると考えられている。我々はトリコプレイン分子が、分裂キナーゼであるオーロラ A キナーゼを活性化し、また、一次線毛を消失させて、正常細胞における円滑な細胞周期の進行に寄与

していることを明かにしてきた。オーロラ A キナーゼの阻害薬の投与により、正常細胞では一次線毛を形成することで細胞周期を停止させて細胞死を回避することができるが、一次線毛形成能を失っているがん細胞では増殖休止を生じず細胞分裂障害を起こして死滅することを明かにした。

10. 一次線毛形成に関する正常中皮モデル細胞

複数の不死化正常中皮細胞株を用い、血清飢餓誘導により一次線毛形成を検討したところ、正常腹膜中皮細胞を hTERT で不死化した LP9/TERT1 細胞株において一次線毛形成が確認された。本細胞株は中皮腫細胞株に対するオーロラ A キナーゼ阻害薬の効果を検討する上で良いコントロール細胞株となり得ることを明かにした。

D. 考察

悪性中皮腫において NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化が重要であり中皮腫細胞の増殖・浸潤に関与していると考えられている。NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化は転写コアクチベータ YAP の恒常的活性化(低リン酸化)を引き起こし、細胞周期に関わる遺伝子群(CCND1 など)や細胞間質造成に関わる遺伝子群(CTGF など)の発現を誘導する。中皮腫の約 80%に YAP の活性化が認められ、その原因は NF2 遺伝子(約 40%)あるいは LATS2 遺伝子(約 15%)におけるジェネティックな異常で説明されるが、これらの遺伝子変異が認められない中皮腫においてどの分子異常が原因であるかが大きな疑問であっ

た。本研究により LIM-ドメイン蛋白である Ajuba が高頻度に発現低下し、中皮腫における腫瘍抑制遺伝子として機能していることが明らかとなった。

現在までに、in vitro の実験で使用可能であるコントロール中皮細胞株は極めて限られている。今回樹立した3種類の不死化中皮細胞株は極めて有用性が高いとともに、in vitro, in vivo においてそれぞれ以下のユニークな特徴を示した。B-1 株は in vitro において敷石状の上皮様増殖パターンを示し E-cadherin を高発現するが、Vimentin, Snail, CTGF の発現が低く、また YAP 強制発現株をヌードマウス胸腔内に移植すると乳頭状パターンで増殖する上皮型腫瘍を形成することから最も上皮性性格の強い細胞株であることが明らかとなった。D-4 株は in vitro で B-1 株ほどきれいな敷石状の上皮様増殖パターンを示さず、E-cadherin の発現も B-1 株に比べ低く、逆に Vimentin, Snail, CTGF の発現は高いこと、YAP 強制発現株の胸腔内移植では一部で肉腫様の組織型を認めることから、2相型をミミックしている細胞株であることが示された。一方、A-4 株は in vitro で繊維芽細胞様形態を示し、E-cadherin の発現は殆どなく、逆に Vimentin, Snail, CTGF の発現が高く、また YAP 強制発現株の胸腔内移植では肉腫様腫瘍を形成することから、上皮性性格を欠損した肉腫様の細胞株であることが明らかとなった。

以上より、今回樹立した不死化中皮細胞株 B-1, A-4 およびそれらの YAP 発現株は悪性中皮腫の上皮型、肉腫型を、また D-4 株は中間(2相)型をミミックしており、肉腫型に近い従来の SV40LT 導入による不死化中皮細胞

(MeT-5A)に比べて、中皮細胞の増殖、分化、シグナル伝達等の解析により有用なモデルと考えられた。また本モデルは悪性中皮腫における上皮型、肉腫型、中間型に見られる中皮腫の組織学的多様性や EMT のメカニズム解明に最適の実験モデルと考えられた。今後、これらの細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株を作成すれば発光による高感度な *in vivo* イメージングも可能となり、中皮腫の各組織型に対する新しい治療法の開発に極めて有用と考えられた。

不死化した正常中皮腫細胞株を用いて悪性中皮腫に関与する主要なシグナル伝達系の構成遺伝子である YAP1 を導入することで、*in vitro* での増殖促進効果が認められ、ヌードマウスで腫瘍を形成したことは、正常中皮細胞から中皮腫を作成できたことを意味すると考えられた。すなわち、特定の遺伝子導入による悪性中皮腫モデルを作成できたことを意味し、治療実験や他の遺伝子導入による効果などの検定のための基盤ができた。さらに、B-1(上皮型 1)では *in vitro* で増殖促進効果が低く、A-4(肉腫型 3)では増殖能の低下が認められたにもかかわらず、ヌードマウスで腫瘍を形成した。おそらく、*in vivo* での腫瘍を取り巻く微小環境が造腫瘍性にかかわっている可能性が示唆された。

トリコプレイン・オーロラ A の中心体機能の解析により、一次線毛形成抑制による細胞周期制御仕組みが新たに示された。今回がん細胞に一次線毛形成能が無いことに着目し、オーロラ A 阻害によるがん細胞特異的傷害効果を狙った試みは画期的と考えられた。同時に、生体内での線毛制御はより複雑であることが

想定されるが、類似機能蛋白質の同定によりその補強が可能となった。また、一次線毛形成の誘導可能な正常中皮のモデル細胞を得たことで、オーロラ A 阻害効果の中皮での応用検討が可能になった。

E. 結論

悪性中皮腫細胞において LIM-ドメイン蛋白である Ajuba が高頻度に発現低下していることが明らかとなった。Ajuba は悪性中皮腫細胞に対して腫瘍抑制分子として働き、その機能は LATS ファミリーキナーゼ依存的に YAP をリン酸化(不活性化)することであることが明らかとなった。本研究結果は悪性中皮腫細胞において NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化が重要であり、その原因として NF2, LAT2 の遺伝子異常に加え Ajuba の発現低下が大きく関与していることが示唆された。

中皮腫には3種類の組織型(上皮型, 2相型, 肉腫型)が存在するが、この組織多様性を備えながら、しかも単一患者に由来し、従って遺伝的背景の均一な正常不死化細胞株を作成し、中皮細胞の分化や上皮間葉移行(EMT)などの制御メカニズムの解析に最適な実験モデルを世界に先駆け開発した。またルシフェラーゼ発光による高感度な胸腔播種の *in vivo* イメージングが可能な、前臨床試験に有用な悪性中皮腫の胸腔播種モデルを確立した。

不死化中皮細胞株に野生型 YAP1 もしくは活性型 YAP1(S127A) 遺伝子導入を行い、その細胞増殖効果を検討した。ヌードマウスにこれらの細胞株を移植して腫瘍形成能を明かにした。YAP がん遺伝子の増殖促進効果およびマウスでの微小環境が増殖を支えていると考えられた。

一次線毛形成能の差によるオーロラ A 阻害のがん細胞特異的傷害効果の中皮で検討する準備が整った。また、類似機能蛋白質の同定により標的分子の幅が広がった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.
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.
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.
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.
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.
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.
7. Ohta M, Abe A, Ohno F, Hasegawa Y, Tanaka H, Maseki S, Kondo E, Kurita K, Nakanishi H.: Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF- β and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*, 49:20-26, 2013.
8. Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, and Kodera Y.: Establishment and

- characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell, poorly-differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. *Gastric Cancer*, 16:74-83, 2013.
9. Akita K, Yoshida S, Ikehara Y, Shirakawa S, Toda M, Inoue M, Kitawaki J, Nakanishi H, Narimatsu H, Nakada H. : Different levels of Sialyl-Tn Antigen expressed on MUC16 in Patients With Endometriosis and Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 22:531-8, 2012.
 10. Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, Fujii M, Hasegawa Y, Ogawa T, Murakami S, Kondo E Nakanishi H. : Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3 β /snail signaling pathway. *Br J cancer*, 106:1196-1204, 2012.
 11. Ozaki H, Matsuzaki H, Ando H, Kaji H, Nakanishi H, Ikehara Y, Narimatsu H. : Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model. *Clin Exp Metastasis*, 29:229-38, 2012.
 12. Nakanishi H, Ito S, Matsui M, Murakami H, Kodera Y. : Non invasive and real-time fluorescence imaging of peritoneal metastasis in nude mice. *Methods Mol Biol*, 872 : 85-95, 2012.
 13. Ohmuro-Matsuyama, Y., Inagaki M., Ueda, H. Detection of Protein Phosphorylation by Open-Sandwich Immunoassay. *Integrative Proteomics*. ed. Leung, H.-C.E. InTech, 197-214, 2012 (ISBN 978-953-51-0070-6)
 14. Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, Urano T, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I, Inagaki M. : Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J Cell Biol*, 197: 391-405, 2012
 15. Li P, Goto H, Kasahara K, Matsuyama M, Wang Z, Yatabe Y, Kiyono T, Inagaki M. : P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Mol Biol Cell*, 23: 1582-92, 2012.
 16. Goto H, Izawa I, Li P, Inagaki M. : Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci*, 103: 1195-200, 2012
 17. Toda M, Kuo CH, Borman SK, Richardson RM, Inoko A, Inagaki M, Collins A, Schneider K, Ono SJ. : Evidence that formation of Vimentin mitogen-activated protein kinase (MAPK) complex mediates mast cell activation following Fc{epsilon}RI/CC chemokine receptor 1 cross-talk. *J Biol Chem*, 287: 24516-24, 2012.
 18. Jeong HJ, Ohmuro-Matsuyama Y, Ohashi H, Ohsawa F, Tatsu Y, Inagaki M, Ueda H. : Detection of vimentin serine

- phosphorylation by multicolor Quenchbodies. *Biosens Bioelectron*, 40: 17-23, 2013.
19. Kato H, Yamamoto K, Oki Y, Ine S, Taji H, Chihara D, Kagami Y, Seto M, Morishima Y.: Clinical value of flow cytometric immunophenotypic analysis for minimal residual disease detection in autologous stem-cell products of follicular and mantle cell lymphomas. *Leukemia*, 26: 166-9, 2012.
 20. Chihara D, Matsuo K, Kanda J, Hosono S, Ito H, Nakamura S, Seto M, Morishima Y, Tajima K, Tanaka, H.: Inverse association between soy intake and non-Hodgkin lymphoma risk among women: a case-control study in Japan. *Ann Oncol*, 23: 1061-6, 2012.
 21. Liu F, Karube K, Kato H, Arita K, Yoshida N, Yamamoto K, Tsuzuki S, Kim W, Ko Y-H, Seto M.: Mutation analysis of NF- κ B signal pathway-related genes in ocular MALT lymphoma. *Int J Clin Exp*, 5: 436-441, 2012.
 22. Yoshida N, Umino A, Liu F, Arita K, Karube K, Tsuzuki S, Ohshima K, Seto M: Identification of multiple subclones in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified with genomic aberrations. *Cancer Med*, 1: 289-94, 2012.
 23. Liu F, Yoshida N, Suguro M, Kato H, Karube K, Arita K, Yamamoto K, Tsuzuki S, Oshima K, Seto M.: Clonal heterogeneity of mantle cell lymphoma revealed by array comparative genomic hybridization. *Eur J Haematol*, 90: 51-8, 2012.
 24. Inoue T, Matsuura K, Yoshimoto T, Nguyen LT, Tsukamoto Y, Nakada C, Hijiya N, Narimatsu T, Nomura T, Sato F, Nagashima Y, Kashima K, Hatakeyama S, Ohyama C, Numakura K, Habuchi T, Nakagawa M, Seto M, Mimata H, Moriyama M.: Genomic profiling of renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease. *Cancer Sci*, 103:569-576, 2012.
 25. Tsuzuki S, Seto M.: Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem and progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*, 119: 727-35, 2012.
 26. Karube K, Tsuzuki S, Yoshida N, Arita K, Liu F, Kondo E, Ko YH, Ohshima K, Nakamura S, Kinoshita T, Seto M.: Lineage-specific growth inhibition of NK cell lines by FOXO3 in association with Akt activation status. *Exp Hematol*, 40: 1005-15, 2012.
 27. Tsuzuki S, Seto M.: TEL(ETV6)-AML1(RUNX1) initiates self-renewing fetal pro-B cells in association with a transcriptional program shared with embryonic stem cells in mice. *Stem Cells*, 31: 236-47. 2013.
 28. Umino A, Seto M.: Array CGH reveals clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Methods Mol Biol*,

- 973: 189-96, 2013.
29. Yoshioka S, Tsukamoto Y, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Matsuura K, Takeuchi I, Seto M, Kawano K, Moriyama M.: Genomic profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. PLoS One, 8: e56165, 2013.
 30. Seto M.: Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. Blood, 21: 121, 2013.
2. 学会発表
1. Fujii M, Toyoda T, Nakanishi H, Yatabe Y, Sato A, Hida T, Tsujimura T, Osada H, Sekido Y. : TGF-beta synergizes with defects in the Hippo pathway by inducing CTGF expression. AACR Annual Meeting 2012 (Chicago, USA) (ポスター)
 2. 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)
 3. 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)
 4. 藤井万紀子、豊田武士、中西速夫、近藤豊、長田啓隆、関戸好孝: 悪性中皮腫における Hippo シグナリングの欠失と TGF- β の協調による CTGF の発現調節。第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌) (ポスター)
 5. 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)
 6. 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)
 7. 瀬戸 加大: NK 細胞性腫瘍の機能特異的がん抑制遺伝子としての FOXO3. 第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2012, (北九州市) [ワークショップ]
 8. 加留部 謙之輔, 都築 忍, 中村 栄男, 瀬戸 加大: NK 細胞性腫瘍に特異的ながん抑制遺伝子である FOXO3. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, (札幌) [ポスター (示説)]
 9. 都築 忍, 瀬戸 加大: Expansion of mouse hematopoietic stem/progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. 第 74 回日本血液学会総会, 2012, (京都) [ポスター (示説)]
 10. 瀬戸 加大: Molecular characterization of T/NK cell malignancies. 第 74 回日本血液学会総会, 2012, (京都) [シンポジウム(口演)]
 11. Kotaro Arita and Masao Seto.: New mouse models of B-cell lymphoma using in vitro retroviral transduction system. 第 9 回日本癌学会・AACR 合同会議, 2013, ラハイナ(米国) [ポスター]
 12. Goto H, Li P, Kasahara K, Matsuyama M, Wang Z, Yatabe Y, Kiyono T, Inagaki M.:

- P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. 第 45 回日本発牛生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, (神戸), [ワークショップ]
13. Goto H, Li P, Kasahara K, Matsuyama M, Wang Z, Yatabe Y, Kiyono T, Inagaki M. : P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. 第 45 回日本発牛生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, (神戸), [ポスター]
14. Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, Urano T, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I, Inagaki M. : Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. 第 45 回日本発牛生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012, (神戸), [ポスター]
15. Kasahara K, Goto H, Izawa I, Watanabe N, Kiyono T, Inagaki M. : The PI3K-Akt pathway controls mitotic progression through Plk1. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012, (札幌), [ポスター]
16. Inagaki M. : Intermediate filaments and site- and phosphorylation state-specific antibodies. Lecture at the University of Gothenburg, 2012, (Gothenburg), [招請講演]
17. Inagaki M., Goto H. : Novel regulation of checkpoint kinase 1 (Chk1): Is Chk1 a good candidate for anti-cancer therapy? Mini-Symposium on “Stress Signals & Responses”, Abo Akademi University Center of Excellence “Cell stress and Molecular Aging”, 2012, (Turku), [シンポジウム]
18. Inagaki M. : Pathophysiological roles of intermediate filaments and intermediate filament phosphorylation. Molecular concepts in epithelial differentiation, pathogenesis and repair. International Meeting of the German Society for Cell Biology, 2012, (Leipzig), [シンポジウム]
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明名称：微粒子分離用マイクロ流路チップ、該チップを用いた微粒子分離用システム及び微粒子分離方法 特許出願番号：特願 2012-227717 発明者：新井 史人、益田 泰輔、新美 京（名古屋大学）：中西 速夫、伊藤 誠二（愛知県がんセンター） 出願日；平成 24 年 10 月 15 日
2. 発明名称：腹腔鏡手術時に胃の外側から腫瘍の位置を同定する方法特許出願番号：特願 2012-28667 出願人：愛知県、学校法人梅村学園、国立大学法人名古屋大学 発明者：三澤 一成、中西 速夫（愛知県がんセンター）：長谷川 純一、木村翔太（中京大学）：瀧 真悟、森 健策（名古屋大学） 出願日：平成 24 年 2 月 13 日

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

悪性中皮腫の細胞特性と治療効果に関する解析

研究分担者 関戸好孝 愛知県がんセンター研究所 分子腫瘍学部 部長

研究要旨：悪性中皮腫の患者予後は極めて不良であり、現在、有効な治療法は確立されていない。悪性中皮腫は CDKN2A/CDKN2B, NF2, BAP1 の3つの腫瘍抑制遺伝子の高頻度変異が明らかになっているが、既存の分子標的治療法の標的となりうる活性型がん遺伝子変異に乏しく、新たな分子標的治療法の開発は極めて遅れている。悪性中皮腫において極めて特徴的に不活性化している NF2（マーリン）-Hippo 細胞内増殖抑制シグナル伝達系について解析を進めた。Hippo シグナル伝達系の制御に係わることが最近報告された複数の分子を詳細に検討し、LIM ドメイン蛋白である Ajuba が高頻度に発現低下していることが明らかになった。悪性中皮腫細胞株 24 細胞株中、不死化正常中皮細胞株の発現レベルに比べ 21 株で Ajuba 蛋白が発現低下していた。Ajuba 遺伝子を中皮腫細胞株にトランスフェクションしたところ、中皮腫の細胞増殖が抑制され、Ajuba が中皮腫細胞において腫瘍抑制性に機能することが明らかとなった。さらに、YAP1 をリン酸化して不活性化する LATS2 (Hippo シグナル伝達系の因子) をノックダウンしたところ、Ajuba による腫瘍抑制機能が減弱し、Ajuba の細胞増殖抑制は LATS2 依存性であることが明らかになった。中皮腫細胞における YAP1 の恒常的な活性化には NF2 遺伝子変異、LATS2 遺伝子変異の他に Ajuba 分子の発現低下が大きく関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

悪性中皮腫において高頻度に不活性化が生じている NF2（マーリン）-Hippo 細胞内増殖抑制シグナル伝達系について、その原因となる分子異常を明らかにし、中皮腫に対する新たな治療戦略を構築するための基盤的知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

悪性中皮腫細胞株 24 株を使用して解析を行った (Y-MESO-8D, Y-MESO-14, Y-MESO-27

などの 18 株は当センターで樹立に成功した細胞株を使用した)。培養細胞より RNA および whole cell lysate を抽出し、発現解析を行った。NF2（マーリン）-Hippo シグナル伝達系路の分子については抗 Ajuba 抗体、抗 MST1 抗体、抗 MST2 抗体、抗 KIBRA 抗体、抗 LATS1 抗体、抗 LATS2 抗体、抗 YAP 抗体、抗 phospho-YAP 抗体等を用いてウェスタンブロット法にて検討を行った。RT-PCR 法にて Ajuba cDNA を増幅し、Ajuba 発現プラスミドベクター及びレンチウイルス

ス発現ベクターを構築した。また、Ajuba のノックダウンは RNA 干渉法を用いた。腫瘍増殖抑制効果は Tetra Color One を用いたカロリメトリックアッセイ及びソフトアガーコロニー形成能アッセイを用いた。免疫蛍光染色にて Ajuba 等の局在を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は愛知県がんセンターヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会および共同研究先である名古屋大学医学部の倫理委員会の承認を得た後、患者本人の文書同意を得て提供された検体を実験に使用した。また、遺伝子組換え実験に関しては愛知県がんセンター遺伝子組換え実験等安全委員会の承認を得ておこなった。

C. 研究結果

1. 悪性中皮腫細胞における NF2-Hippo 関連分子の発現解析

培養中皮腫細胞株 24 株および不死化正常中皮細胞株 MeT-5A 株を用いてウエスタンブロット法にて発現解析を行った。NF2, LATS2 などの中皮腫において遺伝子異常を有する既知の分子についてその発現低下を確認した。さらに Ajuba, MST1 などの本シグナル伝達系に関与することが報告されている分子について検討を行った。MST1 の発現異常は認められなかったが Ajuba は 24 株中 21 株の中皮腫細胞株において MeT-5A コントロール株より発現低下していることが観察された。さらに定量 RT-PCR 法にて Ajuba の mRNA レベルでの検討を行ったところ、mRNA レベルで低下している細胞株も認められたが、mRNA レベルでは変化の乏しい細胞株も検出された。

2. Ajuba 遺伝子導入による YAP リン酸化解析

Ajuba の発現が低下した細胞株に Ajuba 発現レンチウイルスを感染させたところ、YAP のリン酸化 (不活性化) が誘導された。さらに YAP の転写標的遺伝子である CCND1 および CTGF のプロモーター活性に与える影響をルシフェラーゼレポーターアッセイにて検討したところ、Ajuba の強制発現がそれらのプロモーター活性を抑制することを明らかにした。一方、Ajuba 導入による YAP リン酸化が LATS ファミリーキナーゼ依存性か否を確かめるために、RNA 干渉法を用いて LATS1 あるいは LATS2 をノックダウンして解析を行ったところ、特に LATS2 キナーゼ依存的に YAP がリン酸化されることが明らかとなった。

3. Ajuba の細胞内局在の検討

中皮腫細胞における Ajuba 分子の局在を Cell fractionation を用いたウエスタンブロット法および免疫蛍光染色法にて検討したところ細胞質に局在することが明らかとなった。さらに Ajuba の強制発現により YAP が細胞核から細胞質に移動 (転写コファクターとしては不活性化) することが明らかとなった。

4. Ajuba による中皮腫細胞増殖能抑制効果

Ajuba の発現低下が観察された中皮腫の 3 細胞株 (NCI-H28, NCI-H290, Y-MESO-8D) に Ajuba を強制発現させたところ、細胞増殖抑制効果が観察された。一方、Ajuba が発現低下しているが LATS2 遺伝子が欠失している 2 細胞株 (Y-MESO-14, Y-MESO-27) では増殖抑制効果は非常に弱かった。FACS による細胞周期の解析では Ajuba 導入により G1 あるいは G2 アレストを誘導している

ことが明らかとなった。

D. 考察

悪性中皮腫において NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化が重要であり中皮腫細胞の増殖・浸潤に関与していると考えられている。NF2(マーリン)-Hippo シグナル伝達系の不活性化は転写コアクチベータ YAP の恒常的活性化(低リン酸化)を引き起こし、細胞周期に関わる遺伝子群(CCND1 など)や細胞間質造成に関わる遺伝子群(CTGF など)の発現を誘導する。中皮腫の約80%にYAPの活性化が認められ、その原因はNF2遺伝子(約40%)あるいはLATS2遺伝子(約15%)におけるジェネティックな異常で説明されるが、これらの遺伝子変異が認められない中皮腫においてどの分子異常が原因であるかが大きな疑問であった。本研究によりLIM-ドメイン蛋白であるAjubaが高頻度に発現低下し、中皮腫における腫瘍抑制遺伝子として機能していることが明らかとなった。

E. 結論

悪性中皮腫細胞においてLIM-ドメイン蛋白であるAjubaが高頻度に発現低下していることが明らかとなった。Ajubaは悪性中皮腫細胞に対して腫瘍抑制分子として働き、その機能はLATSファミリーキナーゼ依存的にYAPをリン酸化(不活性化)することであることが明らかとなった。本研究結果は悪性中皮腫細胞においてNF2(マーリン)-Hippoシグナル伝達系の不活性化が重要であり、その原因としてNF2、LATS2の遺伝子異常に加えAjubaの発現低下が大きく関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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.
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, 890-899, 2012.
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.
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.
5. Elshazley M, Sato M, Hase T, Yamashita