

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  
グナル伝達系に参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・浸潤に参与し  
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 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.

Japan Mesothelioma Interest Group (JMIG) 2012。(京都)(口演)

G. 知的財産権の出願・登録状況なし。

## 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- $\beta$ 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。