

201313048A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 関 戸 好 孝

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 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 1

II. 分担研究報告書

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) 13

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) 17

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) 22

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) 26

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 33

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 副所長兼分子腫瘍学部部长

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, 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し、その本態解明により新規の分子標的治療戦略を構築することを目的として検討を進めた。昨年度、本シグナル伝達系に参与する 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。本年度は、Ajuba 遺伝子ファミリーの他の2つのメンバーである LIMD1 および WTIP1 に関して検討を進めた。Ajuba および LIMD1, WTIP1 をそれぞれ RNA 干渉法にてノックダウンして転写コアクチベーター YAP の活性化を検討したところ、Ajuba のノックダウンは YAP を活性化（低リン酸化）する一方、LIMD1 あるいは WTIP1 のノックダウンは YAP を不活性化（高リン酸化）することが明らかとなった。YAP の下流遺伝子であるサイクリン D1 (CCDN1) および結合組織成長因子 (CTGF) の遺伝子発現も Ajuba は転写亢進、LIMD1 および WTIP1 は転写抑制に働くことが示唆された。これらの結果は、Ajuba が悪性中皮腫細胞に対して腫瘍抑制性に機能する一方、そのファミリー分子である LIMD1 および WTIP1 は逆に Ajuba 機能を抑制する方向に機能することが示唆された。

中皮腫には3種類の主要な組織型（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 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) などの制御メカニズムはほとんど明らかになっていない。昨年度、この点を明らかにするために初代中皮細胞に HPV-E6, E7 および hTERT 遺伝子を導入し、上皮型、2相型、肉腫型を mimic する不死化正常中皮細胞株パネルを作成した。本年度はこれらの不死化正常中皮細胞株を用いて種々のサイトカイン刺激等により中皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) について検討した。その結果、中間型中皮細胞株 D-4 株では TGF- β および IL1- β などのサイトカインの単独あるいは併用刺激により EMT を誘導可能であることが明らかとなった。一方、D-4 細胞株の結合組織成長因子 (CTGF) 発現を siRNA でノックダウンしたところ、低密度培養下においても

細胞間接着性が増強し、敷石状の上皮細胞様配列の促進が認められた。このように、正常の不死化中皮細胞では TGF- β , IL1- β などの複数の炎症性サイトカインの協調作用により EMT が誘導されること、またこの EMT 誘導には TGF- β /CTGF 経路が関与し、この経路をブロックすることにより正常中皮の EMT の抑制のみならず、中皮腫細胞の肉腫型への悪性進展を抑制できる可能性が明らかとなった。

不死化正常中皮細胞株 3 株に YAP に代わり各種の細胞周期を促進する関連遺伝子の導入を行いその効果を検討した。しかし、YAP に比べ、細胞周期関連遺伝子の単独の導入では不死化正常中皮細胞の増殖能・造腫瘍能の亢進には不十分であることが明らかとなった。また不死化していない初代培養中皮細胞に YAP 遺伝子を単独で導入し不死化するか否かを検討したが不死化を誘導することはできなかった。E6/E7-hTERT と YAP1 が有する遺伝子機能が正常中皮細胞の不死化および腫瘍形成能に重要であることが明らかとなった。

がん細胞においてその制御が異常をきたしている一次線毛形成および中心体複製制御に関する分子機構について検討を進めた。その結果、Albatross や Ndel1 分子がこれらの制御について重要であることが明らかとなり、悪性中皮腫を含むヒト腫瘍に対する治療応用の可能性について新たな知見が集積した。

以上、本年度は悪性中皮腫細胞のシグナル伝達系の解析、不死化中皮細胞を用いた EMT および中皮腫関連遺伝子導入による *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を遂行し、極めて悪性度の高い、かつ難治性の中皮腫に対する新たな治療戦略の方向性に関する提案ができたものと考えられた。

研究分担者	所属施設名	職名	する。さらに NF2-Hippo シグナル伝達経路の不活性化によって恒常的活性化が引き起こされているがん遺伝子産物 YAP を制御する新規戦略を見出すことを目的とする。
関戸好孝	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に関わるがん関連遺伝子を導入またはノックダウンし、増殖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。これらの実験により悪
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	

A. 研究目的

悪性中皮腫において高頻度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、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知見を得ることを目的と

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。

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って、中皮腫細胞の細胞増殖抑制効果の有無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関係に着目し、中皮細胞におけるこれらの制御異常の機構を明らかに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。ウエスタンブロット法については抗 Ajuba 抗体、抗 LIMD1 抗体、抗 WTIP1 抗体、抗 LATS1 抗体、抗 LATS2 抗体、抗 YAP 抗体、抗 phospho-YAP 抗体、抗ベータ-actin 抗体等を用いて検討を行った。また遺伝子発現は quantitative real time RT-PCR 法にて発現レベルの解析を検討した。一方、Ajuba、LIMD1、WTIP1 のノックダウンは RNA 干渉法を用いた。CCDN1 および CTGF のプロモーター活性については、それぞれの遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼリポータープラスミドに導入し、その活性を検討した。免疫組織学的染色にて Ajuba 等の発現を検討した。

b) 不死化正常中皮細胞株の特性の解析

昨年度樹立した不死化正常中皮細胞 HMC-2

A-7 (B-1) 株 (上皮型、以下 B-1)、HMC-2

A-7 (D-4) 株 (中間型、以下 D-4)、および HMC-3

(A-4) (肉腫型、以下 A-4) を用いた。1-10 ng/ml のヒト TGF- β 、IL-1 β 、TNF- α 、及びそれらの併用により刺激し、24 時間後の EMT 誘導の有無を形態変化および qRT-PCR により検討した。また、siRNA を用いて CTGF 発現をノックダウンし、EMT が抑制されるか否かを検討した。さらに、複数の上皮型および肉腫型の悪性中皮腫細胞株を用いて CTGF 発現のノックダウン実験を行った。

c) 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、YAP1 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 (不死化正常中皮細胞株) へ感染させた。YAP1 導入効率をモニターするためにレポーター遺伝子として GFP を使用した。6 well 細胞培養プレートを用いて培養し、感染させた標的細胞の細胞増殖の観察を行った。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。

d) ノードマウスへの皮下移植

野生型 YAP1 もしくは活性型 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、ノードマウスへ皮下移植した。対照群としてレポーター遺伝子である GFP のみ (Empty vector) を導入した不死化正常中皮細胞株を移植した。皮下移植の場合、1 匹につき Empty vector 導入正常中皮細胞を左背側の 2 か所に移植し、遺伝子導入正常中皮細胞を右背側の 2 か所に移植した (1 匹につき 4

か所移植)。胸腔内移植の場合、1 匹につき 1 か所ずつ、それぞれのベクター導入正常中皮細胞を右側より胸腔内へ移植した。移植後 60 日に解剖して観察を行った。

e) 中心体での蛋白質局在解析

特異的な抗体を作成し、マーカー分子と共に組織染色、細胞染色を行い、細胞内局在を高解像度顕微鏡により確認した。一次線毛形成は血清飢餓により誘導した。

f) 中心体機能の解析

RNA 干渉法によるノックダウンを RPE1 細胞に対して行い、各種遺伝子発現を減弱させた。その状態において免疫染色によりマーカー分子の変化を検討した。また、表現型の確認のために適宜遺伝子を再導入しレスキューを試みた。

(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 Ajuba ファミリー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 株を用いて発現解析を行った。

昨年度、Ajuba が中皮腫の新規がん抑制遺伝子であることが明らかにされたため、Ajuba が属する Zyxin/Ajuba ファミリーの他のメンバーである LIMD1 および WTIP1 についても検討を開始した。その結果、LIMD1 は 3 細胞株において発現低下、また WTIP1 については数細胞株において若干の発現低下が認められたが、Ajuba に比較すると頻度および発現レベルの低下は著明ではないことが明らかとなった。

2. Ajuba ファミリー分子のノックダウンによる検討

悪性中皮腫細胞株を用いて Ajuba、LIMD1 および WTIP1 を RNA 干渉法によって発現を抑制し、それらの細胞生物学的な効果を検討した。MeT-5A および Y-MESO-43 細胞株（両細胞株とも 3 つの遺伝子は正常に発現）を用いた。YAP の活性化状態（p-YAP/YAP 比）の検討では、Ajuba をノックダウンすると YAP が活性化（低リン酸化）する一方、LIMD1、WTIP1 のノックダウンでは YAP が不活性化（高リン酸化）される傾向が認められた。さらに、YAP が転写を誘導する遺伝子（CCDN1 および CTGF 遺伝子）のプロモーター活性に関する検討においても、Ajuba のノックダウンはそれぞれの転写活性を亢進する一方、LIMD1、WTIP1 のノックダウンでは逆に抑制することが明らかとなった。これらの結果により、Ajuba が悪性中皮腫細胞に対して腫瘍抑制性に機能する一方、他のファミリー分子である LIMD1、WTIP1 は腫瘍促進性の機能を有することが示唆された。

3. Ajuba の発現の検討

中皮腫における Ajuba 分子の発現について、

外科手術標本 20 例を用いて検討を行った結果、発現低下症例は合計 16 例（80%）であることが明らかとなった。

4. 不死化正常中皮細胞株を用いた中皮細胞の EMT 誘導とその分子機構の解析

上皮型形質を示す不死化細胞株 B-1、および比較的、上皮様形態を保持する中間型細胞株 D-4 を用いて正常中皮細胞における上皮間葉移行 (EMT) 誘導の可能性とそのメカニズムについて検討した。B-1, D-4 細胞を TGF- β , IL-1 β , TNF α などのサイトカインで刺激したところ、TGF- β 単独投与でも軽度ながら形態変化が認められ、同時に E-cadherin 発現の低下および Snail の発現上昇傾向が認められた。さらに TGF- β と IL-1 β を併用投与したところ、上皮形態から紡錘型形態へと明らかな EMT 様変化が観察された。これに伴い EMT マーカー発現では、E-cadherin 発現の顕著な低下および Snail および CTGF 発現の有意な上昇が認められた。

さらに、複数の悪性中皮腫細胞株を形態から上皮型と肉腫型に分けて E-cadherin, Snail や CTGF の発現を調べたところ上皮型に比べ肉腫型細胞株において明らかな E-cadherin 発現の低下と共に、Snail および CTGF 発現の上昇が認められた。

5. 不死化正常中皮細胞株のヌードマウスにおける造腫瘍能の検討

昨年度に続き、ヌードマウスにおける造腫瘍能を検討した。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

は作らなかったが活性型 YAP1 (S127A) を導入した上皮型、中間型ともに腫瘍を形成した。

6. 細胞周期関連遺伝子の検討

不死化正常中皮細胞に細胞周期を促進する関連遺伝子 (CCND1、SKP2、FOXM1、MYC) を導入し、それらの増殖促進効果の有無を検討した。その結果、MYC 遺伝子の導入時のみいずれの細胞株においても *in vitro* で細胞増殖能の促進を認めた。しかしヌードマウスへの皮下移植では腫瘍形成に至らず、細胞周期関連遺伝子のみの導入では *in vivo* での造腫瘍能の獲得は認めなかった。

さらに、YAP1 単独にて不死化・腫瘍化が可能かを検討するため、不死化していない初代培養中皮細胞へ YAP1 遺伝子を導入した。Control と同様に継代後、細胞増殖の停止を認め、YAP1 単独導入では不死化が誘導できないことが明らかとなった。

7. NF2、BAP1 のノックダウンの検討

中皮腫臨床検体では高頻度の NF2 および BAP1 遺伝子の不活性化変異が報告されている。RNA 干渉を用いて 2 つの遺伝子発現を knock down させることにより、細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。その結果、NF2-shRNA では増殖能の促進を認めたが、BAP1-shRNA では逆に増殖能の低下を認めた。さらに *in vivo* のヌードマウスへの移植実験では、NF2-shRNA を導入した中間型不死化正常中皮細胞株で腫瘍形成を認めた。

8. 新規中心体複製制御分子の同定

細胞内の中心体 (centrosome) における

Albatross 蛋白質の詳細な局在を検討したところ、母中心小体の遠位端付属物に偏在することを明らかにした。また正常二倍体細胞に対する Albatross siRNA によるノックダウン実験では中心体の複製が障害され、同時に細胞周期が休止した。これらの結果から、Albatross が中心小体付属物に局在するだけでなく正常な中心体の複製を保証することで、細胞周期の進行に寄与するタイプの細胞周期制御因子である可能性が明らかとなった。

9. 新規一次線毛形成抑制分子の同定

中心体における Ndel1 の局在を検討したところ、母中心小体の subdistal appendage に偏在することが明らかとなった。正常二倍体細胞を用いた Ndel1 siRNA によるノックダウン実験では増殖条件下でも一次線毛が形成され、同時に細胞周期が休止した。この増殖休止は、一次線毛の除去により解除され、一次線毛依存的な細胞周期休止が起きていた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高頻度に認められる。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ー YAP の恒常的活性化(低リン酸化)を引き起こし、細胞周期の促進に関わる遺伝子群(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。昨年度、Ajuba 遺伝子が中皮腫において高頻度に発現低下し、中皮腫における腫瘍抑制遺伝子であることが明らかとなった。本年度は Ajuba のファミリー分子である

LIMD1, WTIP 1 の解析を行い、これらの分子が Ajuba とは逆に腫瘍促進性の機能を有することが示唆された。本研究により LIM-ドメイン蛋白質である Ajuba、LIMD1 および WTIP1 の中皮腫における NF2-Hippo シグナル伝達系に関する役割の詳細が明らかとなった。

中皮腫の上皮型、2相型および肉腫型という組織学的多様性解明の鍵を握ると考えられる上皮間葉移行(EMT)の詳細な機構について解析を進めた。中間型 D-4 細胞においてはサイトカイン TGF- β および IL1- β の刺激により明らかな EMT を誘導できることを明らかにした。D-4 株のサイトカインによる EMT 誘導は *in vivo* における 2相型の病理像を考える上で重要な示唆を含むものと考えられた。すなわち、D-4 株の YAP 強制発現株をマウスの胸腔内に移植した際、上皮様組織を呈する部分と肉腫様の組織を示す部分が共存する 2相型の組織所見が認められるが、本実験結果により、腫瘍内の部位により宿主の微小環境が異なることが大きな要因であることが考えられた。このように中皮細胞が *in vitro* でサイトカイン濃度の変化により EMT を起こしその性質を変えるということを考慮すると、ヒトの臨床例でも中皮腫では上皮型、2相型、肉腫型という組織型が一つの腫瘍内に存在し、それらの間で移行が見られるが、この Heterogeneity は腫瘍細胞の遺伝子レベルでの変異の蓄積にもとづく polyclonality によるものというよりも、むしろサイトカインなどの微小環境の変化により引き起こされる可能性が高いことが示唆された。

悪性中皮腫細胞株に細胞周期を促進する遺伝子(CCND1、FOXM1 など)を YAP1 の代わりに

導入することで造腫瘍能の亢進に寄与するかどうかを検討したが、それらの遺伝子導入では腫瘍形成能を認めなかった。この結果から、細胞周期関連遺伝子の発現制御を司るマスター遺伝子である YAP1 の恒常的活性化が中皮細胞の増殖にとって極めて重要であることが強く示唆された。また、不死化していない初代培養中皮細胞に対し YAP1 遺伝子単独導入での不死化を試みたが、YAP1 単独では中皮細胞の不死化に不十分であることが明らかとなった。

BAP1 は中皮腫の新規がん抑制遺伝子として同定されたが、その細胞増殖能に対する効果は議論が分かれている。本実験系の条件下においては中皮細胞において BAP1 遺伝子の存在がむしろ細胞増殖維持に機能していることが示唆された。

Albatross による中心体複製制御を介した新たな細胞周期制御機構の発見は、中心体機能に着目したがん治療標的分子の可能性を高めるものと考えられた。また、Ndel1 の阻害結果からは一次線毛に注目した腫瘍増殖障害を新たなメカニズムで導き得る可能性が考えられた。このように、がん細胞に一次線毛形成能が無いことや細胞増殖における中心体複製の要求性に着目し、複数の手段を提示することは、がん細胞特異的傷害効果を狙う上での新たな試みとなり得るものと考えられた。

E. 結論

悪性中皮腫細胞において NF2-Hippo シグナル伝達系の高頻度の不活性化が認められる。その経路において LIM-ドメイン蛋白である Ajuba が腫瘍抑制性に機能する一方、ファミリー分子である LIMD1、WTIP 1 は腫瘍促進性に機

能することが示唆された。悪性中皮腫における YAP がん遺伝子の恒常的活性化は上流の分子の様々な不活性化異常が原因と考えられるが、本研究により Ajuba ファミリーを制御することが中皮腫に対する新たな分子治療戦略となり得ることが強く示唆された。

正常の不死化中皮細胞パネルを確立し、それらを用いて TGF- β , IL1- β , TNF- α などの複数のサイトカインの協調作用により EMT が誘導されることを明らかにした。またこの EMT 誘導には TGF- β /CTGF 経路が関与し、この経路をブロックすることにより肉腫型への悪性進展を抑制できる可能性を明らかにした。今後、これらのモデルを組み合わせることにより、中皮腫の組織多様性や EMT のメカニズム解明、また中皮腫の各組織型に対する新しい治療法の開発につなげるべくモデルをさらに発展させることが重要と考えられた。

正常中皮細胞に対して遺伝子導入をすることにより *in vivo* における造腫瘍能を付与するには E6/E7-hTERT に加え YAP1 の機能が必須であることが明らかとなった。一方、正常中皮細胞に対する不死化は YAP1 単独導入では不可能であることが明らかとなった。さらに、悪性中皮腫における代表的な遺伝子異常の BAP1 は、肉腫型において増殖能への関連は乏しいが、中間型では逆に増殖能の維持に寄与していることが示唆された。

細胞の中心体の複製機能や細胞の一次線毛形成に関わる分子の詳細が明らかとなり、これらの分子機能の阻害による腫瘍細胞特異的な治療戦略の可能性が示唆された。正常中皮細胞および中皮腫細胞の比較により、悪性中皮腫に対する本治療戦略を検証することが可能になる

ものと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekido Y: Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*, 34:1413-9, 2013.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Yusa A, Toneri M, Masuda T, Okochi M, Iwata H, Honda H, Arai F, Nakanishi H: Development of a New Rapid Isolation Device for Circulating Tumor Cells (CTCs) using 3D Palladium Filter and its Application for Genetic Analysis. *PLoS ONE*: 9, e8882, 2014.
7. Ito A, Ito Y, Matsushima S, Tsuchida D, Ogasawara M, Hasegawa J, Misawa K, Kondo E, Kaneda N, Nakanishi H: New whole-body multimodality imaging of gastric cancer peritoneal metastasis combining fluorescence imaging with ICG-labeled antibody and MRI in mice. *Gastric Cancer*, in press.
8. Oshima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, Kodera Y, Nakanishi H: Lapatinib sensitivity of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines. *Gastric cancer*, in press.
9. Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, Iwatsuki M, Ota D, Ohkuma M, Iwaya T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Toh H, Sato T, Barnard GF, Fukagawa T, Yamamoto S, Nakanishi H, Sasaki S, Miyano S, Watanabe T, Kuwano H, Mimori K, Pantel

- K, Mori M: Plastin 3 Is a Novel Marker for Circulating Tumor Cells Undergoing the Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Associated with Colorectal Cancer Prognosis. *Cancer Res*, 73: 2059-69, 2013.
10. Odaka C, Loranger A, Takizawa K, Ouellet M, Tremblay MJ, Murata S, Inoko A, Inagaki M, Marceau N: Keratin 8 Is Required for the Maintenance of Architectural Structure in Thymus Epithelium. *PLoS ONE*, 8: e75101, 2013.
11. Neise D, Sohn D, Stefanski A, Goto H, Inagaki M, Wesselborg S, Budach W, Stühler K, Jänicke RU.: The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor BI-D1870 prevents gamma irradiation-induced apoptosis and mediates senescence via RSK- and p53-independent accumulation of p21WAF1/CIP1. *Cell Death and Dis*, 4: e859, 2013.
12. Matsuyama M, Tanaka H, Inoko A, Goto H, Yonemura S, Kobori K, Hayashi Y, Kondo E, Itohara S, Izawa I, Inagaki M: Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells. *J Biol Chem*, 288: 35626-35, 2013.
13. Ikawa K, Satou A, Fukuhara M, Matsumura S, Sugiyama N, Goto H, Fukuda M, Inagaki M, Ishihama Y, Toyoshima F: Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle*, 131: 126-37, 2014.
14. Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Akita H, Sugiyama I, Ishidate F, Nakano A, Takashima S, Goto H, Inagaki M, Kaibuchi K, Watanabe T: Plk1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. *Cell Struc Func*, 39: 45-59, 2014.
15. Goto H, Inagaki M: New Insights into Roles of Intermediate Filament (IF) Phosphorylation and Progeria Pathogenesis. *IUBMB Life*, in press.
16. Umino A, Seto M: Array CGH Reveals Clonal Evolution of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Methods Mol Biol*, 973: 189-96, 2013.
17. Teshima K, Nara M, Watanabe A, Ito M, Ikeda S, Hatano Y, Oshima K, Seto M, Sawada K, Tagawa H: Dysregulation of BMI1 and microRNA-16 collaborate to enhance an anti-apoptotic potential in the side population of refractory mantle cell lymphoma. *Oncogene*, 33: 2191-203, 2014.
18. Arita K, Maeda-Kasugai Y, Ohshima K, Tsuzuki S, Suguro-Katayama M, Karube K, Yoshida N, Sugiyama T, Seto M: Generation of mouse models of lymphoid neoplasm using retroviral gene transduction of in vitro-induced germinal center B and T cells. *Exp Hematol*, 41:731-41.e9. 2013.
19. Yamamoto K, Tsuzuki S, Minami Y,

- Yamamoto Y, Abe A, Ohshima K, Seto M, Naoe T: Functionally Deregulated AML1/RUNX1 Cooperates with BCR-ABL to Induce a Blastic Phase-Like Phenotype of Chronic Myelogenous Leukemia in Mice. *Plos One*, 8:e74864. 2013.
20. Yoshida N, Oda M, Kuroda Y, Katayama Y, Okikawa Y, Masunari T, Fujiwara M, Nishisaka T, Sasaki N, Sadahira Y, Mihara K, Asaoku H, Matsui H, Seto M, Kimura A, Arihiro K, Sakai A: Clinical Significance of sIL-2R Levels in B-Cell Lymphomas. *PLoS One*, 8: e78730, 2013.
21. Kimura H, Karube K, Ito Y, Hirano K, Suzuki M, Iwata S, Seto M: Rare occurrence of JAK3 mutations in natural killer cell neoplasms in Japan. *Leuk Lymphoma*, 55, 962-3, 2014.
22. Guo Y, Takeuchi I, Karnan S, Miyata T, Ohshima K, Seto M: Array CGH profiling of immunohistochemical subgroups of diffuse large B-cell lymphoma shows distinct genomic alteration. *Cancer Science*, in press.
23. Kato H, Karube K, Yamamoto K, Takizawa J, Tsuzuki S, Yatabe Y, Kanda T, Katayama M, Ozawa Y, Ishitsuka K, Okamoto M, Kinoshita T, Ohshima K, Nakamura S, Morishima Y, Seto M: Gene expression profiling of Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. *Cancer Science*, 105: 537-44, 2014.
24. Chihara D, Kagami Y, Kato H, Yoshida N, Kiyono T, Kinoshita T, Seto M: IL2/IL-4, OX40L and FDC-like cell line support the in vitro tumor cell growth of tumor cells in Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia Res*, 38: 608-12, 2014.
2. 学会発表
1. Sekido Y, Tanaka I, Fujii M, Osada H: Hippo signaling cascade alteration in malignant mesothelioma. Keystone symposium. 2013, (モントレー, USA) [ポスター]
2. 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. 2013, (仙台)[シンポジウム]
3. 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, (京都)[セミナー]
4. Sekido Y: Dysregulation of Hippo tumor-suppressive pathway in malignant mesothelioma. The 15th IASLC World Conference on Lung Cancer. 2013, (シドニー、オーストラリア) [ポスター]
5. 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. 2013, (名古屋)[ポスター]
6. 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]
7. Goto H, Inagaki M: Screening of novel Aurora-A-associated proteins to

- prevent primary cilia assembly at the centrosome in proliferating cells. 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013, (名古屋) [シンポジウム]
8. Inoko A, Inagaki M: Translocation of keratin-binding proteins between the cell-cell adhesion and the centrosome as the functional switch of differentiation and proliferation. 第 65 回日本細胞生物学会大会. 2013, (名古屋) [シンポジウム]
 9. Kasahara K, Kawakami Y, Kawamura Y, Ibi M, Goshima N, Inagaki M: Emerging role of the ubiquitin- proteasome system in assembly of primary cilium. 第 65 回日本細胞生物学会大会. 2013, (名古屋) [ポスター]
 10. 田中宏樹, 猪子誠人, 松山誠, 井澤一郎, 稲垣昌樹: 細胞質分裂障害は染色体不安定性の亢進および細胞老化を誘導する. 第 65 回日本細胞生物学会大会. 2013, (名古屋) [シンポジウム]
 11. Li P, Goto H, Kasahara K, Inoko A, Izawa I, Mochizuki H, Togashi T, Kawamura Y, Kawakami Y, Goshima N, Kiyono T, Inagaki M: Screening of novel Aurora-A-associated proteins to prevent primary cilia assembly at the centrosome in proliferating cells. 第 65 回日本細胞生物学会大会. 2013, (名古屋) [ポスター]
 12. Goto H, Era S, Li P, Kasahara K, Inoko A, Ichiro I, Mochizuki H, Togashi T, Kawamura Y, Kawakami Y, Goshima N, Kiyono T, Inagaki M: Screening of novel Aurora-A-associated proteins. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013, (横浜) [ポスター]
 13. Kasahara K, Kawakami Y, Kawamura Y, Ibi M, Kiyono T, Goshima N, Matsuzaki F, Inagaki M: A Cul3-based ubiquitin E3 ligase controls primary cilia assembly through degradation of Trichoplein. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013, (横浜) [ポスター]
 14. 後藤英仁, 渡辺信元, 猪子誠人, 稲垣昌樹: がんの分子標的としての Aurora A キナーゼ. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014, (仙台) [口演]
 15. 吉田稚明, 加留部謙之輔, 宇都宮與, 塚崎邦弘, 今泉芳孝, 平良直也, 鶴池直邦, 海野啓, 在田幸太郎, 片山幸, 都築忍, 大島孝一, 瀬戸加大: Cell cycle 関連遺伝子の異常は慢性型 ATLL の急性転化に関与する. 第 53 回日本リンパ網内系学会総会. 2013, (京都) [口演]
 16. Seto M.: MEET THE PROFESSOR SESSIONS: XV. MALIGNANT LYMPHOMA AS A CONSEQUENCE OF CLONAL EVOLUTION. 第 12 回国際悪性リンパ学会議. 2013, (Switzerland) [口演]
 17. 都築 忍, 瀬戸加大: インビトロで誘導した T 細胞への遺伝子導入によるマウスリンパ腫モデル. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013, (横浜) [示説]
 18. 勝呂 幸, 田川博之, 竹内一郎, 吉田稚明, 在田幸太郎, 都築 忍, 瀬戸 加大: リンパ腫を形成するクローン細胞の

- 多様性は、臨床病態を反映する。第 72 回日本癌学会学術総会。2013, (横浜) [示説]
19. 吉田稚明, 加留部謙之輔, 宇都宮與, 塚崎邦弘, 今泉芳孝, 平良直也, 鶴池直邦, 海野啓, 在田幸太郎, 片山幸, 都築忍, 大島孝一, 瀬戸加大: Cell cycle-related gene alterations are involved in transformation of chronic ATL. 第 72 回日本癌学会学術総会。2013, (横浜) [口演]
20. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M: New mouse model of B-cell lymphoma using retrovirally transduced normal mature B-cells. 第 72 回日本癌学会学術総会。2013, (横浜) [口演]
21. 瀬戸加大: 悪性リンパ腫発症の分子機構。第 72 回日本癌学会学術総会。2013, (横浜) [口演]
22. 都築 忍, 瀬戸加大: TEL(ETV6)-AML1(RUNX1) Initiates Self-renewing Fetal Pro-B Cells in mice. 第 75 回日本血液学会学術集会。2013, (札幌) [示説]
23. 吉田稚明, 加留部謙之輔, 宇都宮與, 塚崎邦弘, 今泉芳孝, 平良直也, 鶴池直邦, 海野啓, 在田幸太郎, 片山幸, 都築忍, 大島孝一, 瀬戸加大: Cell cycle-related gene alterations are involved in transformation of chronic ATL. 第 75 回日本血液学会学術集会。2013, (札幌) [口演]
24. Arita K, Tsuzuki S, Ohshima K, Sugiyama T, Seto M: New mouse B-cell lymphoma model originated from germinal center. 第 75 回日本血液学会学術集会。2013, (札幌) [口演]
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 発明名称: がん細胞自動分離装置およびがん細胞自動分離方法 特許出願番号: 特願 2011-115083 出願人: 名古屋大学、愛知県 発明者: 新井 史人、益田 泰輔、新美 京 (名古屋大学): 中西速夫 (愛知県がんセンター) 出願日: 平成 23 年 5 月 24 日
2. 発明名称: 末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。特願 2013-153717、 発明者: 中西速夫、伊藤誠二 (愛知県がんセンター)、発明者: 絹田精鎮、市ノ瀬義行 (株オプトニクス精密)、発明者: 遊佐亜希子 (公益財団法人科学技術交流財団)、発明者: 本多 裕之、大河内美奈 (国立大学法人名古屋大学) 出願日; 平成 25 年 7 月 23 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 副所長兼分子腫瘍学部部长

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, 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し、その本態解明により新規の分子標的治療戦略を構築することを目的として検討を進めた。昨年度、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。本年度は、Ajuba 遺伝子ファミリーの他の2つのメンバーである LIMD1 および WTIP1 に関して、その悪性中皮腫における役割を明らかにする目的で検討を進めた。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て、LIMD1 および WTIP1 の遺伝子発現レベルについて大きな差は認められなかった。Ajuba および LIMD1, WTIP1 をそれぞれ RNA 干渉法にてノックダウンし、YAP（Hippo シグナル伝達系の不活性化により恒常的に活性化する転写コアクチベーター）の活性化を検討したところ、Ajuba のノックダウンは YAP を活性化（低リン酸化）する一方、LIMD1 あるいは WTIP1 のノックダウンは YAP を不活性化（高リン酸化）することが明らかとなった。YAP が転写を亢進する遺伝子（CCDN1 および CTGF）の発現も Ajuba は転写亢進、LIMD1 および WTIP1 は転写抑制に働くことが示された。これらの結果は、Ajuba が悪性中皮腫細胞に対して腫瘍抑制性に機能する一方、そのファミリー分子である LIMD1 および WTIP1 は逆に腫瘍を促進する方向に機能することが示唆された。本年度の解析により、悪性中皮腫における NF2-Hippo シグナル伝達系に関わる Ajuba 遺伝子ファミリーの機能がより詳細に明らかとなった。

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。ウエスタンブロット法については抗Ajuba抗体、抗LIMD1抗体、抗WTIP1抗体、抗LATS1抗体、抗LATS2抗体、抗YAP抗体、抗phospho-YAP抗体、抗ベータ-actin抗体等を用いて検討を行った。また遺伝子発現レベルはquantitative real time RT-PCR法にて検討した。Ajuba、LIMD1、WTIP1のノックダウンはRNA干渉法を用いた。CCDN1およびCTGFのプロモーター活性については、それぞれのプロモーターをルシフェラーゼリポータープラスミドに導入し、その活性を検討した。免疫組織学的染色にてAjuba等の発現を検討した。

(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Ajubaファミリー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株を用いて発現解析を行った。昨年度、Ajubaの中皮腫における高頻度の発現低下を明らかにしAjubaが中皮腫の新規がん抑制遺伝子であることが強

く示唆された。AjubaはZyxin/Ajubaファミリーのメンバーであり、このファミリーの他のメンバーであるLIMD1およびWTIPについても中皮腫における発がん・進展への関与が想定されたため、最初にウエスタンブロット法およびRT-PCR法にて検討を開始した。LIMD1は24株中3細胞株において発現低下、またWTIP1については数細胞株において若干の発現低下が認められたが、Ajubaに比較すると低下した細胞株の頻度および発現低下レベルは著明ではなかった。

2. Ajubaファミリー分子の遺伝子ノックダウンによる解析

悪性中皮腫細胞株を用い、Ajuba、LIMD1およびWTIP1をRNA干渉法によって発現を抑制し、それらの細胞生物学的な効果を検討した。MeT-5AおよびY-MESO-43細胞株(両株とも3つの遺伝子は正常に発現)を実験に用いた。最初に、ウエスタンブロット法によりsiRNAがAjuba、LIMD1、WTIP1を効果的にノックダウンしていることを確認した。YAPの活性化状態(p-YAP/YAP比)の検討では、AjubaをノックダウンするとYAPが活性化(低リン酸化)する一方、LIMD1、WTIP1のノックダウンではYAPが不活性化(高リン酸化)される傾向が認められた。さらに、YAPの下流遺伝子(YAPにより遺伝子転写が直接亢進される)であるCCDN1およびCTGF遺伝子のプロモーター活性の検討でも、Ajubaのノックダウンはそれぞれの転写を亢進する一方、LIMD1、WTIP1のノックダウンでは逆に転写を抑制することが明らかとなった。これらの結果により、Ajubaが悪性中皮腫細胞に対して腫瘍抑制性に機能する一方、他のファミリー分子であるLIMD1、WTIP1は腫瘍促進性の機能を有することが

示唆された。

3. Ajuba の発現の検討

中皮腫における Ajuba 分子の発現について、外科手術標本 20 例を用いて検討を行った。Ajuba の発現強度を 3 段階に分類 (陰性 0, weak 1+, strong 2+) して評価した結果、0 は 5 例 (25%)、1+ は 11 例 (55%)、2+ は 4 例 (20%) であり、発現低下症例は合計 16 例 (80%) であることが明らかとなった。また、昨年度の細胞株レベルでの検討結果と同様に、中皮腫の臨床検体においても Ajuba は細胞質に局在していることを確認した。

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。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、細胞周期を促進する遺伝子群 (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。昨年度、Ajuba 遺伝子が中皮腫において高頻度に発現低下し、中皮腫における腫瘍抑制遺伝子であることが明らかとなった。さらに、機能的には Ajuba が中皮腫細胞において NF2-Hippo シグナル伝達系を LATS2 キナーゼ依存的に制御し、中皮腫の増殖・コロニー形成能等を抑制することが明らかとなった。本年度は Ajuba のファミリー分子である LIMD1、WTIP 1 の解析を行い、これらの分子が Ajuba とは逆に腫瘍促進性の機能を有する可能性が示唆された。本研究により中皮腫において LIM-ドメイン蛋白である Ajuba、LIMD1 および WTIP1

の NF2-Hippo シグナル伝達系における役割の詳細が明らかとなった。

E. 結論

悪性中皮腫細胞において NF2-Hippo シグナル伝達系の高頻度の不活性化が認められる。その経路において LIM-ドメイン蛋白である Ajuba が腫瘍抑制性に機能する一方、ファミリー分子である LIMD1、WTIP 1 は腫瘍促進性に機能することが示唆された。悪性中皮腫における YAP がん遺伝子の恒常的活性化は上流の分子の様々な不活性化異常が原因と考えられるが、本研究により Ajuba ファミリーを制御することが新たな中皮腫治療法開発のための新規分子治療戦略となり得る可能性が強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sekido Y: Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*, 34:1413-9, 2013.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
 5. 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.
2. 学会発表
 1. Sekido Y, Tanaka I, Fujii M, Osada H: Hippo signaling cascade alteration in malignant mesothelioma. Keystone symposium. 2013, (モントレール, USA) (ポスター)
 2. 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)
 3. 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)
 4. Sekido Y: Dysregulation of Hippo tumor-suppressive pathway in malignant mesothelioma. The 15th IASLC World Conference on Lung Cancer. 2013, (シドニー, オーストラリア) (ポスター)
 5. 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)
 6. 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)
 - G. 知的財産権の出願・登録状況なし。