

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 WTIP1 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 CCND1 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、WTIP1 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、WTIP1 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, 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。