

# TAZ による中皮細胞がん化機構の解析

愛知県がんセンター研究所

分子腫瘍学分野 主任研究員 佐藤龍洋

## 1. 研究の背景・目的

悪性中皮腫はアスベスト暴露を主原因として発症する予後不良の悪性腫瘍である。希少がんであるため抗がん剤の開発は遅れており、シスプラチンとペメトレキセドが現在化学治療として使用される。近年、免疫チェックポイント阻害剤が適用されることとなったが、その奏効率は20%程度であり、新規治療法の開発が望まれている。

申請者の所属する研究室では、これまでに悪性中皮腫の分子基盤の解明に取り組んできており、Hippo シグナル伝達経路の破綻が悪性中皮腫に高頻度にみられることを明らかにしている(1, 2)。また、Hippo 経路の異常による中皮細胞がん化の引き金として、YAP, TAZ の活性化が重要な役割を果たすことを見出してきた(3-5)。申請者らは TAZ の詳細な解析を行い、Hippo シグナル伝達経路破綻による転写活性化因子 TAZ の活性化が IL-1 $\beta$  の転写を活性化して中皮細胞のがん化を促進する、というデータをこれまでに得てきた。そこで本研究では、TAZ- IL-1 $\beta$  経路の活性化が悪性中皮腫の治療標的となりうるか検討することとした。

## 2. 研究の対象並ならびに方法

本研究では、患者より樹立した悪性中皮腫細胞株を研究の対象とした  
培養細胞株

患者より樹立した悪性中皮腫細胞株のうち、Hippo 経路遺伝子に変異を持つ細胞株として Y-MESO-27, Y-MESO-30 の2種類を、正常不死化中皮細胞株として HMC 株1種類を用いた。細胞株はすべて RPMI 培地、10% FBS 存在下で培養し、本実験に使用した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

IL-1 $\beta$  のプロモーター領域として、転写開始領域の上流 600 bp をクローニングし、ウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミドのプロモーター部位に挿入した。このプラスミドと、CMV プロモーターを持つ蛍光ルシフェラーゼ発現プラスミドを細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を Dual Luciferase reporter assay kit (Promega) を用いて測定した

ノックダウン

TAZ および IL-1 $\beta$  のノックダウンは、特異的 shRNA を発現するレンチウイルスを培養細胞に感染させて実施した。

マウス胸腔内での増殖抑制効果の検討

モデルマウスによる腫瘍増殖抑制効果の検討は、まず悪性中皮腫細胞株の検出のため GFP を発現させ、次に TAZ もしくは IL-1 $\beta$  のノックダウンを行った後、これらの細胞を NOD/SCID 免疫不全マウスの胸腔内に移植し、4-8 週後のマウス胸腔内腫瘍の増殖を GFP 蛍光により検出した。

## 3. 研究結果

(1) TAZ による IL-1 $\beta$  転写活性化の検討

HOMC 中皮細胞株に TAZ の活性化型 (S89A) 遺伝子を導入し、レポーターアッセイを行った。その結果、TAZ S89A を導入した細胞では、導入していないコントロール細胞と比較して IL-1 $\beta$  の転写活性が上昇していた。また、IL-1 $\beta$  のプロモーター-600bp 領域(-600)のうち、TAZ-TEAD 複合体が結合すると予測された領域 11 bp を欠損させたプロモーター ( $\Delta$ TEAD) を用いると、IL-1 $\beta$  の転写活性が抑制された (図 1)。

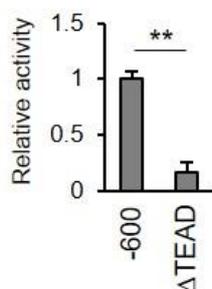


図 1. TAZ による IL-1 $\beta$  のプロモーター活性化

IL-1 $\beta$  の転写開始領域の上流-600bp (-600) を結合したレポーター遺伝子と比較して、TAZ-TEAD 複合体結合予測領域 11 bp を欠損させた上流-600bp ( $\Delta$ TEAD) は転写活性が有意に低下した。

\*\* ,  $p$ -value < 0.01

## (2) マウス胸腔内での増殖抑制効果の検討

TAZ をノックダウンした中皮腫細胞株 Y-MESO-27 もしくは Y-MESO-30 をマウス胸腔内に移植して、細胞の増殖を観察した。その結果、ノックダウンした細胞 (shTAZ #1, shTAZ #2) はコントロール細胞 (shScr) と比較して胸腔内での腫瘍のサイズが有意に小さいことがわかった (図 2)。

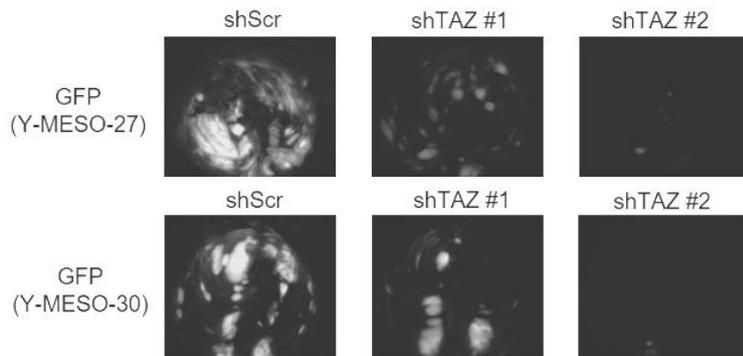


図2. TAZ ノックダウンによる腫瘍増殖の抑制  
TAZ をノックダウンした細胞（上段 Y-MESO-27 細胞，下段 Y-MESO-30 細胞）を移植したマウスではコントロール細胞を移植したマウスと比較して GFP 蛍光で観察される腫瘍のサイズが小さいことがわかる。

次に TAZ の活性化型(S89A)を発現した HMC 細胞株に IL-1 $\beta$  のノックダウンを行い、この細胞をマウス胸腔内に移植したところ、ノックダウンした細胞(shIL1B #1, shIL1B #2)はコントロール細胞(shScr)と比較して胸腔内での増殖が有意に減少していることがわかった (図3)。



図3. IL-1 $\beta$  ノックダウンによる腫瘍増殖の抑制  
IL-1 $\beta$ をノックダウンした細胞 (TAZ S89A 発現 HMC 細胞) を移植したマウスではコントロール細胞を移植したマウスと比較して GFP 蛍光で観察される腫瘍のサイズが小さいことがわかる。

#### 4. 考察

これまでに得られた知見と合わせて、Hippo シグナル伝達経路に関わる遺伝子の不活性化変異は TAZ を活性化させることで IL-1b の分泌を促し中皮細胞のがん化、悪性化を促進すると考えられた。また、Hippo シグナル伝達経路が破綻した細胞では、TAZ および IL-1b が治療標的となりうる可能性が示唆された。

#### 5. 文献

1. Sekido Y, Pass HI, Bader S, Mew DJ, Christman MF, Gazdar AF, Minna JD. Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res.*, 55:1227-1231, 1995
2. Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka

- S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y. LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res.*, 71:873–883, 2011
3. 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*, 31:5117–5122, 2012
  4. 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*, 34:73–83, 2015
  5. Kakiuchi T, Takahara T, Kasugai Y, Arita K, Yoshida N, Karube K, Suguro M, Matsuo K, Nakanishi H, Kiyono T, Nakamura S, Osada H, Sekido Y, Seto M, Tsuzuki S. Modeling mesothelioma utilizing human mesothelial cells reveals involvement of phospholipase-C beta 4 in YAP-active mesothelioma cell proliferation. *Carcinogenesis*, pii: bgw084, 2016
6. 論文発表
- 論文発表
- Matsushita A, Sato T, Mukai S, Fujishita T, Mishiro-Sato E, Okuda M, Aoki M, Hasegawa Y, Sekido Y. TAZ activation by Hippo pathway dysregulation induces cytokine gene expression and promotes mesothelial cell transformation. *Oncogene*, 38:1966–1978, 2019