

悪性中皮腫における TEAD 阻害剤 K-975 耐性機序の解明

愛知県がんセンター研究所

分子腫瘍学分野 リサーチレジデント 井田梨沙

1. 研究の背景・目的

悪性中皮腫は、アスベストの吸入を主な原因とする極めて難治性の腫瘍である。日本ではすでにアスベストの輸入および使用が禁止されているものの、曝露から約 30 年の潜伏期を経て発症することから、今後も患者が増大し続けると予想されている。悪性中皮腫では、活性型のドライバー遺伝子変異は極めて少なく、がん抑制遺伝子への変異が主因となることが特徴である。そのため既存のキナーゼ阻害剤などの分子標的薬がほとんど奏効しない。近年注目されている免疫チェックポイント阻害剤が中皮腫に対しても有効であることが報告されているが、効果は限定的であり、薬剤耐性を獲得した症例や適応外の症例に有効な新規分子標的薬の開発が求められている。

中皮腫で不活性化が高頻度に検出される NF2 は、Hippo 経路の制御を担うがん抑制遺伝子である。転写因子 YAP1/TAZ は、正常細胞では細胞質に留まっているが、NF2 変異細胞で Hippo 経路の不活性化が生じると核に移行して活性化され、結果として中皮細胞の増殖、浸潤、造腫瘍能が促されることが、当研究室からこれまでに明らかとなってきた(文献 1-4)。YAP1/TAZ は、核移行すると転写因子 TEAD ファミリー分子と結合し、転写コアクチベーターとして様々ながん化促進遺伝子の発現を亢進し、細胞の悪性形質を増強することが知られる。我々は、このメカニズムに着目し、YAP1/TAZ の TEAD family との結合を抑制する小分子化合物 K-975 を製薬企業やアカデミアとの共同研究により開発し、YAP1/TAZ の機能阻害に成功した。しかし、TEAD 阻害剤 K-975 は Hippo 変異を有する細胞株の多くに腫瘍抑制効果を示すものの、変異細胞の中にも K-975 耐性を持つ株が一部存在することが明らかとなってきた。K-975 は、TEAD の自己パルミトイル化阻害を介して YAP1/TAZ 結合を妨げることから、耐性機構として、YAP1/TAZ—TEAD 間の結合阻害が障害されていることを予想した。そこで、耐性株において、K-975 処理下の TEAD と

YAP1/TAZ の結合を評価したところ、予想に反し、K-975 による結合阻害が確認された。本研究では、耐性細胞における YAP1/TAZ 及び TEAD の制御機構を解明し、TEAD 阻害剤の効果の最適化と耐性機序の解明を目指す。

2. 研究の対象ならびに方法

K-975 耐性機序を解析するため、K-975 感受性細胞株 (MSTO-211H、NCI-H2052)、耐性細胞株 (Y-MESO-27、ACC-MESO-1)、および感受性株に K-975 を処理し、長期培養した獲得二次耐性細胞株 (MSTO-211H-KR、NCI-H2052-KR) を使用した。

1) K-975 添加時の YAP1 局在についての検証

感受性株、耐性株、獲得二次耐性株に対して K-975 を処理し、抗 YAP1 抗体による免疫染色実験をおこなった。K-975 処理前後における YAP1 局在をそれぞれの細胞株で比較評価した。

2) YAP1 結合タンパクの解析

K-975 感受性 MSTO-211H 細胞株に FLAG-YAP1 を強制発現させた後に 1 μ M K-975 を 2 日間処理したところ、予想外に K-975 による増殖阻害効果が抑えられ耐性となった。そこで、抗 FLAG 抗体にて免疫沈降をおこない、LC-MS/MS 質量分析により K-975 処理群と未処理群の YAP1 結合タンパクを比較した。

3) 結合候補タンパクの細胞増殖への影響を評価

IP-MS/MS により示された結合候補分子から、既存の結合分子を除く分子を選択し、shRNA を作製した。レンチウイルスシステムを用いて細胞に導入し、puromycin 選択後に IncuCyte S3 生細胞イメージング解析システムを用いて、ノックダウンによる細胞増殖阻害効果を検証した。

3. 研究結果

1) K-975 添加時の YAP1 局在についての検証

YAP1 は、定常状態ではいずれの細胞株においても核への局在が観察された。K-975 処理

時には、感受性株では YAP1 の細胞質への移行がみとめられた一方で、耐性株および獲得耐性株では共に K-975 処理後も核内に濃縮していた。

2) YAP1 結合タンパクの解析

Control 群と比較して、K-975 処理群では YAP1 と TEAD1-4 それぞれとの結合量が顕著に抑えられていることを確認した。また、YAP1 に強く結合する分子のうち、DNA 結合能を有するものを同定した。

3) 結合候補タンパクの細胞増殖への影響を評価

LC-MS/MS の結果から得られた YAP1 結合候補分子の shRNA を用いて、細胞増殖阻害能を検討し、ノックダウンにより耐性株の増殖を顕著に抑制する分子を複数同定した。

4. 考察

耐性株における免疫沈降実験の結果、K-975 刺激下においても YAP1/TAZ と TEAD の結合阻害が生じていたことから、TEAD との結合が乖離された YAP1/TAZ は、別のタンパクと相互作用して細胞の生存・増殖を維持しているのではないかと予想した。免疫染色の結果から、耐性株において K-975 処理下の YAP1 は核に局在していたことから、核内タンパクと結合して機能している可能性が示唆された。そこで、FLAG-YAP1 を発現させた感受性株を用い、YAP1 結合能を有する DNA 結合タンパクを同定し、ノックダウンによる増殖阻害アッセイの結果から、一部の候補分子について耐性化への関与の可能性が示唆された。これらの中には、K-975 処理により YAP1 との結合量に差がみとめられたものと変化がなかったものを含んでおり、今後、耐性細胞における YAP1 複合体と制御機構の全体像を明らかにすることが課題となると考えている。

5. 文献

- 1) Mizuno T et al., YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle-promoting genes. *Oncogene*. 31: 5117-5122 (2012)
- 2) Tanaka I et al., LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. *Oncogene*.34: 73-83 (2015)

- 3) Kakiuchi T et al., Modeling mesothelioma utilizing human mesothelial cells reveals involvement of phospholipase-C beta 4 in YAP-active mesothelioma cell proliferation. *Carcinogenesis*. 37(11): 1098-1109 (2016)
- 4) Matsushita A et al, TAZ activation by Hippo pathway dysregulation induces cytokine gene expression and promotes mesothelial cell transformation. *Oncogene* 38: 1966-1978 (2019)

6. 論文発表

なし