

# 悪性中皮腫における TAZ の機能解析

愛知県がんセンター研究所

分子腫瘍学部 主任研究員 佐藤 龍洋

## 1. 研究の背景・目的

中皮腫は、アスベスト曝露を主原因とする中皮細胞のがんである。アスベスト輸入は1990年代後半まで行われており、中皮腫発症までの潜伏期間30-40年を考慮すると、中皮腫患者は今後も増加すると考えられる。中皮腫は早期発見が難しく、外科的手法により除去することが困難であるため、中皮腫を特異的に死滅させるような抗がん剤による治療が求められる。しかし、現在の化学療法で用いられているシスプラチンとペメトレキセドの併用投与は患者の生存期間を延長するものの中皮腫の縮小にはいたっていない。申請者らは特定の遺伝子変異、遺伝子発現パターンをもつ中皮腫にFAK阻害剤が有効であることを示す研究成果を報告しているが(Kato T, Sato T, et al., Oncogene, 2018)、多くの中皮腫患者に広く有効な治療薬はいまだ報告されていない。新規中皮腫治療薬の開発が待望されるなか、開発促進に向けた中皮腫細胞内での増殖促進、悪性化機構の解明は喫緊の課題であるといえる。

2016年、次世代シーケンスを用いた大規模遺伝子解析によりNF2の変異が高頻度で見られること、また、NF2により制御されるHippoシグナル伝達経路因子の変異が低頻度ではあるが複数見られることが明らかとなった(Bueno R. et al., 2016 Nat. Genet.)。Hippo経路はがん抑制経路として知られており、中皮腫の発症・悪性化にはこれらの経路の破たんが重要な役割を果たしていると考えられている。申請者の所属する研究室でも長年Hippo経路破たんによる中皮腫発症機構について解析を行ってきた。その結果、Hippo経路破たんによるYAP、TAZの活性化が中皮細胞がん化に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた(Sato T, et al, Int. J. Mol. Sci., 2018)。しかし、YAP、TAZがどのような機構で中皮細胞のがん化、中皮腫の悪性化を促進するのかについてはいまだ十分に理解されていない。

申請者らは活性化型TAZが正常不死化細胞をがん化させること、また、これによりがん化した細胞ではサイトカイン類のmRNA量が増大していることを見出している。特に、IL-1 $\beta$ の発現が活性化型TAZ発現細胞増殖に関与しており、中皮腫の発症との関連が示唆された。

そこで本研究では、TAZ による IL-1 $\beta$ 発現上昇の分子機構、IL-1 $\beta$ が中皮細胞のがん化・中皮腫の悪性化にどのように関与するかについて解析を行った。さらに IL1 $\beta$ 受容体阻害剤を使用し、TAZ-IL-1 $\beta$ 経路が中皮腫細胞の増殖を抑制するか検討した。

## 2. 研究の対象ならびに方法

### 細胞

申請者の所属する研究室で樹立した正常不死化中皮細胞株 HMC 細胞に、FLAG タグを付与した野生型 TAZ (WT)、もしくは活性化型 TAZ (S89A)を発現させた細胞を作製した。これらの細胞は RPMI 培地、10% FBS 存在下で培養し、本実験に使用した。

### レポーターアッセイ

IL1B プロモーター領域として転写開始領域の上流 600 bp、300 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 TAZ を発現する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。

### LC-MS/MS 解析

FLAG-TAZ WT, および FLAG-TAZ S89A 発現細胞を溶解し、anti-FLAG M2 agarose beads (Sigma)を用いて免疫沈降を行った。3x FLAG ペプチドを用いて免疫沈降物を溶出した後、trypsin Gold を用いてペプチド断片化を行い、C18 カラムで精製した後、LC-MS/MS 装置にて免疫沈降物を解析した後、ProteinPilot ソフトウェアを用いて免疫沈降物に含まれるタンパク質を同定した。

### ChIP アッセイ

FLAG-TAZ WT, および FLAG-TAZ S89A 発現細胞を 1% ホルマリンで固定し、ソニケーションで破碎した。破碎液を anti-FLAG M2 agarose beads (Sigma)を用いて免疫沈降した後、ChIP kit (Abcam)を用いて ChIP アッセイを行った。IL1B 転写開始領域上流 (-230 から-1)を PCR で増幅し、IL1B プロモーター領域への TAZ の結合を検討した。

## 3. 研究結果

### (1) TAZ による IL1B 転写の促進

活性化型 TAZ を発現した HMC-D4 細胞を用いてレポーターアッセイを行ったところ、IL1B 転写開始領域上流 600 bp、および 300 bp を持つルシフェラーゼベクターにおいて強いルシフェラーゼ活性が観察された。このことから、TAZ は IL1B の転写開始領域 300 bp のと

ころに結合する可能性が示唆された。

#### (2) IL1B プロモーター領域への TAZ の結合

ChIP アッセイを行ったところ、IL1B の転写開始領域上流 250 bp において TAZ との結合が観察された。また、この領域内の塩基配列を探索したところ、TAZ の結合タンパク質である TEAD の結合領域が検出された。このことから、TAZ は TEAD と複合体を形成し、IL1B プロモーターに結合すると推測された。

#### (3) TAZ-TEAD 複合体の検出

TAZ が HMC-D4 細胞内において TEAD と結合するか検討するため、TAZ 結合タンパク質の網羅的検出を LC-MS/MS 装置を用いて解析した。その結果、TAZ は複数の TEAD ファミリータンパク質と結合することが分かった。一方、TAZ と結合することが報告されている他の DNA 結合タンパク質 Runx2, Smad ファミリータンパクは検出されなかった。このことから、HMC-D4 細胞においては TAZ は TEAD と結合し、転写を調節すると考えられた。

#### (4) IL1 $\beta$ 受容体アンタゴニストによる HMC-D4 細胞の増殖抑制

IL-1 $\beta$  受容体アンタゴニストであるアナキンラを用いて活性化型 TAZ を発現する HMC-D4 細胞の増殖への影響を観察した。その結果、アナキンラは 10 ng/ml 以上で濃度依存的に細胞増殖を抑制した。また、TAZ の高活性化が見られる Y-MESO-27 中皮腫細胞株においても有意に増殖を抑制した。このことからアナキンラは中皮腫増殖の抑制に有効であることが示唆された。

### 4. 考察

本研究により、IL1 $\beta$  受容体阻害剤が TAZ が高活性化された中皮腫細胞の増殖抑制に有効であることが示唆された。また、活性化された TAZ が IL1 $\beta$  の発現を制御する仕組みについて明らかにした。すなわち、正常不死化中皮細胞 HMC-D4 細胞内において活性化された TAZ は主に TEAD と結合し、IL1B のプロモーター領域に結合して転写を促進し、中皮細胞がん化を促進すると考えられた。IL1 $\beta$  シグナル伝達経路の阻害が実際に中皮腫患者に有効である可能性については、今後、中皮腫のモデルマウス等を用いたインビボ実験系により検証していく予定である。

### 5. 文献

1. Kato T, Sato T, Yokoi K, Sekido Y. E-cadherin expression is correlated with focal adhesion kinase inhibitor resistance in Merlin-negative malignant mesothelioma cells. *Oncogene*. 36(39):5522-5531, 2017
2. Bueno R. et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet*. 48(4):407-16, 2016
3. Sato T, Sekido Y. NF2/Merlin Inactivation and Potential Therapeutic Targets in Mesothelioma. *Int J Mol Sci*. 19(4), 2018

6. 論文発表

学会口頭発表

第8回 JMIG 研究会、平成 29 年 9 月 2 日「悪性中皮腫における転写因子 TAZ の機能解析」