

主論文の要旨

LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade

LIMドメインを持つ蛋白質AJUBAは、
Hippo シグナル経路を介して悪性中皮腫細胞の増殖を抑制する

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：長谷川 好規 教授)

田中 一大

【目的】

悪性中皮腫は中皮細胞から発生する極めて予後不良の悪性腫瘍であり、診断確定時には進行例が多く、抗がん剤や放射線治療法に対し強い抵抗性を示す。アスベスト曝露後、約 30 年の潜伏期を経て発症し遺伝子変異の蓄積が予想されるが、その発生・進展における分子病態は未解明な点が多い。本研究は、中皮腫の新たな診断方法や分子標的剤の開発を目指し、細胞学的特性を解明することを目的として行った。

【背景・方法】

腫瘍抑制遺伝子 Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene の下流に、細胞間の接触阻止機能を持ち臓器サイズを規定する Hippo シグナル伝達経路の存在が確認されている。Hippo pathway は、2003 年にショウジョウバエで発見され、以後ヒトに至るまで進化的に保存されていることが確認された比較的新規のシグナル経路である。Hippo pathway はキナーゼカスケードであり、正常細胞では細胞が高密度になると、転写の co-activator YAP をリン酸化し不活化することで細胞増殖を抑制している。一方、Hippo pathway の機能不全は YAP の恒常的活性化を引き起こし、様々な腫瘍の増殖・進展に関わることが示唆されている。

悪性中皮腫では、NF2 の遺伝子変異が約 50% 確認されており、さらに YAP が 70 ~ 80% と高頻度に活性化し腫瘍の増殖に強く関わっていることが報告された。またその一因として、YAP を直接不活化するキナーゼの LATS2 が 20% 程度不活化していることも同時に報告された。しかし、NF2 と LATS2 の発現低下が重複している症例も存在し、悪性中皮腫における YAP の活性化には、Hippo pathway の構成因子のさらなる不活化が関与している仮説に至った。本研究は、愛知県がんセンターで日本人から樹立されたものを含む合計 24 の中皮腫細胞株を用いて、Hippo pathway の構成因子の中で発現が特徴的に変化している因子を検討し、その機能解析を行った。

【結果】

新たにショウジョウバエで報告された 7 種類の Hippo pathway の構成因子 (AJUBA、LIMD1、WTIP、MST1、MST2、LATS1、KIBRA) の発現レベルを検討するため、コントロールに不死化した中皮の細胞株 MeT-5A を用いて、計 24 の中皮腫細胞株とウェスタンブロット法解析で比較検討を行った。その中で多機能蛋白質であり LIM-domain を持つ AJUBA が、NF2 とは独立して約 80% と有意に発現低下していることを見出した。また、AJUBA の発現レベルが低下している中皮腫細胞株では、YAP のリン酸化レベルは低下傾向を示し、AJUBA が YAP の機能を不活化する可能性が示唆された。これまでに AJUBA は細胞骨格形成に関与し、YAP を直接不活化するキナーゼの LATS2 と結合する報告がされている。

AJUBA の発現低下と YAP 活性化の関係を解析するため、レンチウイルスベクターを用いて AJUBA 遺伝子を複数の中皮腫細胞株に導入したところ、YAP のリン酸化レベルは有意に上昇した。さらにレポーターアッセイでは、AJUBA 遺伝子の導入に

より YAP の標的遺伝子である *CCND1*・*CTGF* のプロモーター活性が著明に低下し、YAP の不活化が示唆された。次に、AJUBA の遺伝子の導入により YAP が核から細胞質へ局在移行するかの検討を行った。ウェスタンブロット法解析において、導入した AJUBA は主に細胞質に発現し、YAP はリン酸化すると同時に細胞質へ移行し不活化することが確認された。

さらに、AJUBA のシグナル伝達機序を解明するため、NF2 が発現低下している中皮腫細胞株を用いて、AJUBA 遺伝子の導入後に YAP を直接不活化するキナーゼである LATS1/2 をノックダウンし解析をすすめた。ウェスタンブロット法解析の結果、LATS1 と比較し LATS2 をノックダウンした時に AJUBA が YAP を不活化する効果がより減弱し、AJUBA のシグナル伝達において主要な mediator が LATS2 であることを同定した。

その後、中皮腫細胞において AJUBA が増殖抑制に機能するかを確認するため、AJUBA 強制発現時に MTT assay と soft agar colony formation assay を施行した。ともに LATS1/2 の発現が認められる中皮腫細胞株では、有意な増殖能・コロニー形成能の低下が認められた。また FACS を用いた細胞周期解析においては、AJUBA 遺伝子の導入により G1 期で細胞周期が停止する傾向が確認され、この結果は YAP をノックダウンした場合と一致した結果であった。一方で、LATS1/2 の発現レベルが低下している中皮腫細胞株では、AJUBA の強制発現下においても細胞増殖の抑制効果は認められなかった。以上の結果は、AJUBA のシグナルが LATS1/2 を介して YAP の不活化に関与するというウェスタンブロット法やレポーターアッセイ法の解析結果と一致していた。

最後に、*in vivo* で AJUBA の発現低下の頻度・YAP の恒常的活性化の割合を検討するため、中皮腫組織を用いて免疫染色を施行した。解析した 20 検体中、80%にあたる 16 検体で AJUBA の発現低下を認めた。さらに AJUBA の発現が全く認められなかった 5 検体では、YAP が核に強く局在し、これらの結果は *in vitro* における解析とほぼ一致した結果であった。

【結論】

以上の結果から、本研究で AJUBA は悪性中皮腫において高頻度に発現が低下している因子であることを見出した。さらに、AJUBA は中皮腫細胞における Hippo pathway の中で LATS1/2 を介して YAP の活性を抑制する機能を有し、中皮腫では新規の特徴的な細胞増殖抑制効果を持つことを明らかにした。