

主論文の要旨

Modeling mesothelioma utilizing human mesothelial cells reveals involvement of phospholipase-C beta 4 in YAP-active mesothelioma cell proliferation

ヒト中皮細胞を用いた悪性中皮腫モデルによる YAP 活性のある中皮腫の細胞増殖におけるホスホリパーゼ C ベータ 4 の関連の解明

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
高次医用科学講座 臓器病態診断学分野

(指導：中村 栄男 教授)

垣内 辰雄

【緒言】

悪性中皮腫は、胸膜・腹膜などの中皮細胞より発生する悪性腫瘍であり、発症原因にアスベスト曝露が示唆されている。アスベスト曝露から中皮腫発症まで長い潜伏期間があり、2020年までは増加傾向が示されている。手術療法、化学療法、放射線照射などを組み合わせた集学的治療が行われ成績も改善されつつあるが、標準的治療は確立しておらず、予後は極めて不良である。中皮腫検体において高頻度にHippo経路の破綻が認められる。Hippo経路は癌抑制経路であり、上流遺伝子[Neurofibromin 2(NF2)やLATS1/2]が働くことによりYes associated protein (YAP)を抑制する。悪性中皮腫では、この上流の遺伝子に変異が入り、YAPの抑制が取れ、YAPが活性化することで細胞増殖や抗アポトーシスに関わる遺伝子の発現を誘導する。Hippo経路の破綻は、すでに成立した中皮腫の維持に重要であることは分かっているが、腫瘍形成能についての報告は乏しい。今回、不死化中皮細胞株を用いてHippo経路の破綻と中皮腫形成の関連について検討した。

【方法】

正常中皮細胞へヒトパピローマウイルスE6/E7、hTERTを導入することにより不死化させ、形態の異なる3つの不死化中皮細胞株を樹立した。この不死化中皮細胞株は、形態学的に上皮型(HOMC-B1)、肉腫型(HOMC-A4)、そしてその間の様相を呈する中間型(HOMC-D4)に分類した。

これらの不死化中皮細胞株においてRNA干渉によりNF2の発現抑制、もしくは野生型YAPもしくは活性型YAP遺伝子導入により過剰発現させ、Hippo経路の破綻を再現した。Hippo経路の破綻が、これらの不死化中皮細胞株における増殖能、腫瘍形成能への影響をin vitroにおいて検討した。またHippo経路を破綻させた不死化中皮細胞株をヌードマウスへ移植し、in vivoにおける腫瘍形成の有無について検討した。

またYAPによる形質転換において重要な役割を担う遺伝子を明らかにするためYAP遺伝子導入前後の不死化中皮細胞株に対して発現解析を行った。既報にて中皮腫細胞株においてYAPの発現抑制により得られている発現が低下した遺伝子群をgene setとし、今回我々が行った発現解析の結果に対してGene Set Enrichment analysis(GSEA)を行った。YAP導入の不死化中皮細胞株や中皮腫細胞株に対して、GSEAより得られた遺伝子それぞれに対してRNA干渉による発現抑制を行い増殖能への影響を検討した。

【結果】

NF2の発現を抑制することによりHippo経路の破綻を再現した結果、上皮型(HOMC-B1)と中間型(HOMC-D4)不死化中皮細胞株では増殖能の亢進を認めた。しかし肉腫型(HOMC-A4)不死化中皮細胞株において増殖能の減弱を認めた(Figure1)。しかしながら、NF2の発現抑制にてHippo経路破綻を再現した不死化中皮細胞株は、3株ともヌードマウスへの移植にて腫瘍を形成した(Figure2)。

次にYAPを過剰発現させることによりHippo経路の破綻を再現し、増殖能・腫瘍形成

能を検討した。その結果、NF2の発現抑制の場合と同様、YAPを過剰発現した場合でも上皮型(HOMC-B1)と中間型(HOMC-D4)不死化中皮細胞株は増殖能が亢進し、肉腫型(HOMC-A4)では増殖能が減弱した(Figure3)。足場非依存性の有無についての形質転換を検討するコロニー形成アッセイにおいて、3つの不死化中皮細胞株はいずれもYAP導入によりコロニーを形成した(Figure3)。さらにこれらの3つの不死化中皮細胞株においてYAPを導入した場合、ヌードマウスへの皮下・胸腔内移植にて腫瘍形成を認めた(Figure4)。そして胸腔内移植では野生型YAP導入の場合に比べ、活性型YAP導入を導入した不死化中皮細胞株は、3株のいずれにおいても形成した腫瘍が数、大きさともに上回っていた(Figure4)。

つづいてYAPによる形質転換において、重要な役割を担う遺伝子を検討した。YAP遺伝子導入前後の不死化中皮細胞株に対して発現解析を行い、発現解析より得られた遺伝子と、既報の中皮腫細胞株に対しYAP knockdownにより発現が低下した遺伝子群を用いて、GSEAを行った。GSEAにより得られた遺伝子の発現抑制が、YAP非導入とYAP導入の不死化中皮細胞株に与える影響について検討した。CCND1とPhospholipase C beta 4 (PLCB4)の発現抑制は、YAP非導入に比べYAP導入の不死化中皮細胞株でより増殖抑制効果を認めた(Figure5)。CCND1はすでにHippo経路の破綻した中皮腫細胞株において増殖能に関わることで報告されており、今回同様の結果を再現できた。そして中皮腫においてPLCB4の与える影響については検討されていない。このためPLCB4が中皮腫細胞株に与える影響について検討した。PLCB4の発現抑制は、YAP活性のない中皮腫細胞株に比べ、YAP活性のある中皮腫細胞株においてより増殖能の減弱を認めた。さらにコロニー形成アッセイにおいても同様にYAP活性のある中皮腫細胞株においてより強くコロニー形成を抑制した(Figure6)。これらの結果より、YAP下流の増殖能に関わる遺伝子としてPLCB4を見出した。

【考察】

中皮腫は、高頻度にNF2の遺伝子異常を伴い、Hippo経路が破綻している。Hippo経路の破綻が中皮腫の維持に必要なことは報告されているが、中皮腫の発生に関わるとの報告は少ない。今回我々は、Hippo経路の破綻が不死化中皮細胞株を中皮腫様腫瘍に形質転換させることを見出した。さらに不死化中皮細胞株を用いた発現解析により、PLCB4がYAP活性のある中皮腫細胞株の増殖に関わる因子であることを同定した。

Hippo経路破綻の原因の多くはNF2の欠失であり、その結果YAPが活性化し細胞増殖や抗アポトーシスの遺伝子発現を誘導する。我々は不死化中皮細胞株を用いて、Hippo経路破綻を再現するためにNF2 knockdownやYAPの過剰発現実験を行った。Hippo経路の破綻により上皮型(HOMC-B1)と中間型(HOMC-D4)不死化中皮細胞株は増殖能が亢進し、肉腫型(HOMC-A4)では増殖能が減弱した。この細胞株間での増殖能の違う理由は不明である。しかしコロニー形成アッセイにてYAPを導入することにより3株ともコロニーを形成し、マウスへの移植にて腫瘍を形成した。これらのことより中皮腫の形成には足場非依存性が重要であることが示唆された。

これまでSV40がハムスターにおいて中皮腫の原因であることや、NF2(+/-)マウスへのアスベスト曝露により中皮腫を形成すること、さらにconditional NF2 knockoutマウスにおいてInk4a/Arfやp53が中皮腫の発生を促進するとの報告がある。これらの中皮腫のマウスモデルはいずれもマウス中皮腫であり、ヒト中皮腫マウスモデルは報告されていない。今回、我々は初めてヒト中皮腫マウスモデルを作成した。

Hippo経路はWnt/Notch/GPCRシグナル経路等とクロストークしている。このため中皮腫の発生・維持にHippo経路の破綻が関わっているが、NF2やYAPを標的にすることが難しい。それゆえに我々はYAPの下流における中皮腫の形質転換に関わる遺伝子を検索した。不死化中皮細胞株へYAPを導入することにより発現が上昇した遺伝子群と、既報にある中皮腫細胞株においてYAPをknockdownすることにより発現が低下した遺伝子群を解析することにより、我々はYAP活性のある中皮腫細胞株の増殖に関わる遺伝子としてphospholipase C beta 4 (PLCB4)を同定した。PLCB4は3量体G蛋白に共役しイノシトール3リン酸やプロテインキナーゼCを駆動し、さまざまな細胞応答を導く役割を持つ。

【結論】

不死化中皮細胞から中皮腫を作成できたことは、特定の遺伝子導入による中皮腫モデルを作成できたことを意味し、治療実験や他の遺伝子導入による効果などの検定のための基盤になることが示唆された。また PLCB4 は酵素であり、PLCB4 に対する酵素阻害薬は中皮腫の治療薬の一役になり得ると考えられた。