

主論文の要旨

**TAZ activation by Hippo pathway dysregulation  
induces cytokine gene expression and promotes  
mesothelial cell transformation**

Hippo 経路の調節不全による TAZ 活性化はサイトカイン  
遺伝子の発現と中皮細胞の形質転換を促進する

名古屋大学大学院医学系研究科 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)

松下 明弘

## 【緒言】

悪性中皮腫はアスベスト暴露によって起こる腫瘍であり、患者の予後は極めて不良である。悪性中皮腫の約 50%において腫瘍抑制遺伝子 Neurofibromatosis type 2 (NF2) の不活化変異を認める。NF2 遺伝子はマーリン (merlin) をコードし、細胞内腫瘍抑制シグナル伝達経路である Hippo シグナル経路を活性化して YAP、TAZ 転写共役因子を負に制御する。YAP の恒常的活性化は種々の遺伝子の転写を活性化して中皮細胞の腫瘍化に強く関与することが報告されている。一方、TAZ は大腸がんや肺がんなどの悪性化に関与することが報告されているが、悪性中皮腫における腫瘍の進展や悪性化に関してはほとんど明らかになっていない。今回、悪性中皮腫細胞株、および不死化中皮細胞株を用いて TAZ が引き起こす中皮細胞の腫瘍化の影響について解析した。

## 【対象及び方法】

細胞株は悪性中皮腫細胞株 23 株と不死化中皮細胞株 2 株を用いた。YAP、TAZ の発現量は抗 YAP/TAZ 抗体を用いてウエスタンブロットで評価した。TAZ のリン酸化レベルの測定は Phos-tag gel を使用した。遺伝子導入実験及び knockdown の実験はレンチウイルスを使用した。In vivo 移植実験では生後 6 週間のヌードマウスを使用し、蛍光実体顕微鏡を用いて評価した。マイクロアレイ解析は SurePrint G3 HumanGE 8x60K V2 kit を使用した。細胞運動能、浸潤能はそれぞれ cell culture insert、BD Matrigel™ Invasion chamber を用いて評価した。足場非依存的増殖能は軟寒天培地内のコロニー形成数を測定し評価した。

## 【結果】

はじめに悪性中皮腫における YAP/TAZ の発現レベルを検討した。不死化中皮細胞株 2 株では YAP と TAZ の発現レベルはほぼ同程度であったが、悪性中皮腫細胞株 23 株の 61%で YAP に比べ TAZ の発現レベルが高い結果が得られた。次に TAZ の活性化状態 (低リン酸化型が活性型) を評価したところ、悪性中皮腫細胞株 23 株の 65%で TAZ が活性化 (低リン酸化) 状態にあることが明らかとなった。以降、TAZ が高度に活性化している悪性中皮腫細胞株 2 株 (Y-MESO-27 と Y-MESO-30) を選択して詳細に解析を進めた。

TAZ が悪性中皮腫細胞の細胞増殖能に及ぼす影響について検討した。悪性中皮腫細胞株(Y-MESO-27 と Y-MESO-30) に対し TAZ を knockdown した細胞 (shTAZ) とコントロール shRNA を導入した細胞 (shScr) を培養したところ、knockdown 細胞において増殖能の抑制を認めた (Figure 1)。一方で TAZ の活性化が認められない悪性中皮腫細胞株では増殖能の抑制を認めなかった。

不死化中皮細胞である HOMC-D4 株に恒常的活性型 TAZ<sup>S89A</sup> と野生型 TAZ<sup>WT</sup> を導入し、細胞増殖能を検討した。ベクターのみを導入した control 細胞に比べ、TAZ<sup>S89A</sup> において有意に増殖能の促進を認めたが、TAZ<sup>WT</sup> は変化を認めなかった (Figure 2a)。また運動能、浸潤能、足場非依存的増殖能においても同様に TAZ<sup>S89A</sup> は有意に促進した

(Figure 2b-d)。この結果は、恒常的活性型 TAZ は中皮細胞の悪性を促進する一方、単に過剰発現された野生型 TAZ は正常中皮細胞内では速やかに不活化されることを強く示唆した。

次に GFP を共発現させると共に TAZ<sup>wt</sup> あるいは TAZ<sup>S89A</sup> を導入した HOMC-D4 細胞をヌードマウスの右胸腔内に移植して造腫瘍能を検討した。移植後 54 日目に解剖したところ TAZ<sup>S89A</sup> 発現細胞を導入したマウスの胸壁には GFP 陽性の結節を多数認め、腫瘍の増殖を確認した (Figure 3a)。一方で TAZ<sup>wt</sup> 発現細胞では増殖を認めなかった (Figure 3a)。さらに、病理組織学的検討により、TAZ<sup>S89A</sup> を導入した細胞は壁側胸膜内へ浸潤し、また悪性中皮腫の診断マーカーである抗 calretinin 抗体で強く染色されることを確認した (Figure 3b)。

恒常的活性型 TAZ<sup>S89A</sup> が中皮細胞を腫瘍化するメカニズムを明らかにするため、TAZ<sup>S89A</sup> と TAZ<sup>wt</sup> をそれぞれ導入した HOMC-D4 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。TAZ の恒常的活性化によって mRNA の発現が上昇する遺伝子群上位 800 遺伝子を Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway のデータベースを用いて解析した。その結果、TAZ はサイトカインおよびその受容体をコードする遺伝子の発現を亢進することが明らかとなった (Figure 4a)。強く発現誘導される遺伝子には、これまで悪性中皮腫の進展や癌化との関連が報告されている *IL1A*、*IL1B*、*IL6*、さらに、抗腫瘍サイトカインとして知られている *IL24* が含まれていた (Figure 4b)。

次に不死化中皮細胞の悪性化にとって、どのサイトカインが重要かを評価するため TAZ<sup>S89A</sup> を導入した HOMC-D4 細胞にそれぞれのサイトカイン遺伝子を knockdown させて細胞増殖能を評価した。その結果、*IL1B* の knockdown が他と比べ有意に細胞増殖能を抑制した (Figure 4c)。TAZ が直接 *IL1B* 遺伝子の発現に関わるか評価するため、*IL1B* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 断片をクローニングして dual luciferase reporter assay を行ったところ、強いシグナルが誘導された (Figure 4d)。TAZ は TEADs など種々の DNA 結合蛋白と相互作用することが報告されており、中皮細胞で TAZ と結合する蛋白を免疫沈降法および質量分析法で解析したところ、転写因子 TEAD1, 3, 4 が同定された。さらに、*IL1B* 遺伝子のプロモーター領域に TEAD 結合モチーフが存在することが示唆されたためクロマチン免疫沈降法で検討した。その結果 TAZ<sup>S89A</sup> は TEAD 結合モチーフが存在する DNA 断片と結合したが、TAZ<sup>wt</sup> は結合しなかった (Figure 4e)。以上の結果から活性型 TAZ<sup>S89A</sup> は *IL1B* 遺伝子のプロモーター領域で TEAD 転写因子と結合し、サイトカインを始めとする pro-oncogenic な遺伝子群の転写を強く増強させることが明らかとなった。

さらに *IL1B* mRNA の発現上昇が中皮細胞に及ぼす影響を検討した。細胞培養上清を ELISA 法にて解析した結果、TAZ<sup>wt</sup> と比べ TAZ<sup>S89A</sup> 導入の HOMC-D4 細胞株において *IL1β* の分泌量の亢進がみられた (Figure 5a)。また *IL1β* の添加により、HOMC-D4 株の細胞増殖能・運動能、浸潤能の促進を認めた (Figure 5b-d)。一方、*IL1B* の knockdown は TAZ が活性化している悪性中皮腫細胞の増殖を強く阻害した (Figure 6a)。

最後に IL-1 antagonist (IL-1RA) を用い、悪性中皮腫細胞に対する抗腫瘍効果につい

て検討した。TAZ が活性化している悪性中皮腫細胞株 (Y-MESO-27) に IL-1RA を添加したところ細胞増殖能の抑制を認めた (Figure 6b)。一方で TAZ 活性化を有さない悪性中皮腫細胞株 (ACC-MESO-1 と NCI-H2452) では、細胞増殖能の抑制を認めなかった (Figure 6c)。以上より、IL-1RA による IL1 シグナル経路の阻害は、TAZ 活性化を有する悪性中皮腫細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

### 【結論】

本研究により、約半数の悪性中皮腫細胞において YAP に比べ TAZ の高発現、活性化が起きていることが明らかとなった。転写共役因子 TAZ の恒常的活性化は IL1B を含むサイトカイン遺伝子の転写を促進させ、不死化中皮細胞の腫瘍化を促進させることが明らかとなった。一方、TAZ の活性化を抑制することで悪性中皮腫細胞の増殖能・浸潤能や造腫瘍能は抑制されることが明らかとなった。IL1B は TAZ の恒常的活性化を呈している悪性中皮腫細胞において、悪性形質の増強にかかわる重要な因子であることが強く示された。