

論文内容の要旨

Hyaluronic acid enhances cell migration and invasion via the YAP1/TAZ-RHAMM axis
in malignant pleural mesothelioma

(悪性胸膜中皮腫においてヒアルロン酸は細胞遊走・浸潤能を促進させる)
(重枝弥, 柴崎晶彦, 兼古由香, 安平進士, 増田友之, 谷田達男, 関戸好孝, 前沢千早)
(Oncotarget 8 巻, 55 号 平成 29 年 11 月掲載)

I. 研究目的

悪性胸膜中皮腫は、全世界的にみると今後も罹患数の増加が予測されている。しかし、生存期間中央値は 12 ヶ月以下と非常に予後不良の悪性腫瘍の一つである。その理由として、自覚症状に乏しく早期発見が困難であること、有効な治療の選択肢が少なく治療に対する感受性も低いことなどが挙げられる。近年他の癌腫で劇的な効果を来している分子標的治療薬や癌免疫療法も、悪性胸膜中皮腫に対しては未だ臨床応用されていない。悪性胸膜中皮腫に対する、新たな治療戦略を見出す意義は大きいと考えられる。

悪性胸膜中皮腫では、器官サイズ決定シグナルである Hippo pathway に高頻度に遺伝子変異が生じていることが報告されている。Hippo pathway では Yes associated protein 1 (YAP1) と Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) の核内移行を抑制し、TEA domain transcription factor (TEAD) 転写因子の作用が不活化されることで細胞増殖等を制御している。近年、乳癌、肺癌、肝細胞癌などにおいて Hippo pathway が、腫瘍の増殖、転移・浸潤能の活性化、薬剤抵抗性など癌の生物学的特性の形成に寄与する報告がなされている。さらに、悪性胸膜中皮腫の臨床的特徴として、胸水中のヒアルロン酸濃度異常高値があるが、ヒアルロン酸レセプターである CD44 や Receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) のプロモーター領域には TEAD との結合部位が存在し、Hippo pathway の標的分子として報告されている。また、脂質代謝異常症の治療薬として広く使用されているスタチン製剤は、YAP1 の核内移行を阻害するという報告もなされている。

本研究では、Hippo シグナル伝達系で制御される RHAMM の発現と悪性胸膜中皮腫の遊走・浸潤能の関連を検討し、加えて、スタチン製剤によるその抑制効果についても解析した。

II. 研究対象ならび方法

5 種類の悪性胸膜中皮腫細胞株を用いて実験を行った。3 種類の悪性胸膜中皮腫細胞株 (Y-MESO-12, 27, 30) は、愛知県がんセンター研究所分子腫瘍学部長関戸好孝先生 (愛知県名古屋市) より譲渡された。ACC-MESO-4 は理研細胞材料開発室 (茨城県つくば市) より、NCI-H28 は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。mRNA/蛋白質の発現解析には real-time PCR 法および Western Blotting 法を用いた。遺伝子の発現抑制は、small-interfering RNA transfection system (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) で行った。遺伝子導入は、活性型 YAP1 のプラスミド (pCMV-flag YAP 5SA) を Addgene (Cambridge, MA, USA) より購入し、Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いておこなった。細胞遊走・浸潤能は、transparent PET Membrane (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) および Matrigel invasion chambers (BD Biocoat, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて測定した。ヒアルロン酸 (R&D Systems Minneapolis, MN, USA) ならびにスタチン製剤 (Fluvastatin, Sigma Aldrich St Louis, MO, USA) の添加により YAP1/TAZ-RHAMM の系の動態と細胞遊走・浸潤能との関連を検討した。細胞数の計測は、DAPI 染色後、BZ-9000 BioRevo (KEYENCE, Elmwood Park, NJ, USA) と ImageJ software (無償ソフトウェア <https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて行った。全ての統計検定は、Welch's t test を用いて行った。

III. 研究結果

1. 悪性胸膜中皮腫細胞株において、RHAMM の発現は Hippo pathway を構成する分子である YAP1, TAZ により正に制御された。
2. 悪性胸膜中皮腫細胞株の細胞遊走・浸潤能は、YAP1, TAZ それぞれのノックダウンでは 5~7 割程度に、YAP1 と TAZ のダブルノックダウン、および RHAMM ノックダウンでは 1~4 割程度までに抑制された。
3. ヒアルロン酸添加は悪性胸膜中皮腫細胞の遊走・浸潤能を 1.5~2 倍程度上昇させた ($p < 0.05$)。さらに、その効果は RHAMM ノックダウンにより抑制された ($p < 0.05$)。
4. Fluvastatin 処理で、悪性胸膜中皮腫細胞株における YAP1 の核内移行が抑制され、RHAMM の発現が抑制された。Fluvastatin 処理で、細胞遊走・浸潤能も抑制され ($p < 0.05$)、その効果は濃度依存性であった。
5. 悪性胸膜中皮腫細胞株において、Fluvastatin はヒアルロン酸による細胞遊走・浸潤能の活性化を抑制した ($p < 0.05$)。

IV. 結 語

悪性胸膜中皮腫細胞株で、YAP1/TAZ-RHAMM の系を抑制することにより細胞遊走・浸潤能が有意に制御された。また、ヒアルロン酸添加により細胞遊走・浸潤能が有意に活性化されることから、胸水中のヒアルロン酸は悪性胸膜中皮腫の増悪因子である可能性が示唆された。さらに、YAP/TAZ 抑制作用を有する Fluvastatin 処理により、RHAMM を介した上記細胞遊走・浸潤能は有意に抑制された。

以上から、Fluvastatin を含むスタチン製剤は、脂質異常症に対し既に広く臨床応用されている比較的安かつ安価な薬剤であり、悪性胸膜中皮腫治療の有用な選択肢となりうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 櫻井 滋 (睡眠医療学科)

副査 教授 谷田 達男 (呼吸器外科学講座)

副査 教授 山内 広平 (内科学講座：呼吸器・アレルギー・膠原病内科分野)

悪性胸膜中皮腫 (MM) 患者の胸水ではヒアルロン酸 (HA) 高値であることが知られ, HA が種々の癌細胞において浸潤・転移能を促進させるとの先行研究から MM 細胞でも HA レセプターである RHAMM 発現を制御することで浸潤・転移能を抑制可能と考えた. そこで申請者らは MM の細胞株を用い, HA 制御系である Hippo pathway の阻害による RHAMM の発現増加や細胞周期促進・細胞死阻害的遺伝子の転写を促進する転写コアクチベーターである YAP/TAZ の knock down により RHAMM の発現制御系における YAP の関与を確認, さらに HA による MM 細胞の遊走能活性化をあらかじめ確認したうえで, YAP1 の核内移行抑制につながる Mevalonate pathway を HMG-CoA 抑制薬である statin を用いて抑制し, RHAMM の発現抑制と遊走能の阻害効果を確認した. 以上により statin の MM 治療への応用可能性を示した. 検証された Mevalonate pathway を介する HA 産生系へのアプローチは, 今後の MM における薬物治療に大きな進展をもたらす可能性がある.

試験・試問の結果の要旨

本研究は既存の癌細胞で報告されている系を MM 細胞において検証し, statin の MM 細胞の遊走能抑制効果をもっているが, 申請者に対し研究方法や過程に関する説明や結果の解釈について試問し, 適切な回答を得た. 申請者の学識と論文は学位に値すると考える. また, 学位論文の作成にあたって, 剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した.

参考論文

- 1) NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 expression sensitizes malignant melanoma cells to the HSP90 inhibitor 1 (7-AAG) (NAD(P)H キノンオキシドレダクターゼ 1 の発現はメラノーマ細胞において HSP90 阻害剤である 17-AAG への感受性を上げる) (葛西秋宅, 他 8 名と共著)
PLoS One 11 巻, 4 号 (2016)
- 2) 肺癌術前 PET-CT で発見された重複癌 4 例 (出口博之, 他 4 名と共著)
岩手医学雑誌 67 巻, 2 号 (2015)
- 3) The role of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in regulating angiogenin-like protein 1 expression in lung microvascular endothelial cells (肺微小血管内皮細胞における AmotL1 発現の TNF- α と IFN- γ の役割) (中島義雄, 他 6 名と共著)
Allergy International 62 巻, 3 号 (2013)