

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08726

研究課題名(和文) 中皮腫におけるHippo不活化で誘導されるヒアルアドヘリンの播種性転移機構の解明

研究課題名(英文) Expression of hyaladherin induced by inactivation of Hippo pathway in malignant mesothelioma

研究代表者

前沢 千早 (Maesawa, Chihaya)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・教授

研究者番号：10326647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は難治性の希少癌であり、死亡数増加が予測される社会的影響の大きい悪性腫瘍である。悪性中皮腫の生物学的特性の形成に中心的役割を果たす、「Hippo-YAP 経路」の標的分子RHAMMが、浸潤・転移と密接に関連していること、その浸潤転移能はヒアルロン酸依存性に亢進することを明らかにした。一方で、既存の候補薬物、ペプチドを用いた競合阻害実験では有効性を示せなかった。両者の作用は、腫瘍細胞のヒアルロン酸合成抑制効果であり結合の阻害効果によるものではなかった。RHAMM-ヒアルロン酸相互作用阻害の阻害薬物スクリーニング法の開発研究が必要であると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性の希少癌である胸膜悪性中皮腫の進展機構に、胸水中のヒアルロン酸と腫瘍細胞表面に発現するヒアルアドヘリンRHAMM (hyaluronan-mediated motility receptor)の相互作用が関連していることを明らかにした。この両者の結合阻害は、悪性中皮腫の新たな治療標的となる可能性が示された事は、有効な標準治療の確立されていない中皮腫に新たな治療戦略をもたらす点で社会的意義を認める。

研究成果の概要(英文)：Malignant mesothelioma is an intractable rare cancer and is a malignant tumor that has a great social impact and is expected to increase in death rate. RHAMM (hyaluronan-mediated motility receptor), a target molecule of the "Hippo-YAP pathway" that plays a central role in the formation of biological properties of malignant mesothelioma, was closely related to invasion and metastasis. Its invasion and metastasis ability depended on hyaluronan-treatment. On the other hand, the effectiveness was not shown in the competitive inhibition experiment using the known candidates such as competitive agent and peptide. The effects of both were downregulation of hyaluronan expression in tumor cells, not the inhibitory effect on binding of both molecules. Research and development of a screening method for inhibitors of RHAMM-hyaluronan interaction inhibition is needed

研究分野：実験病理

キーワード：RHAMM Hippo YAP 中皮腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は各種集学的治療法に反応不良な難治性癌であり、アスベストの吸引/長期暴露によって生じる胸膜中皮腫(>80%)が大部分を占める。アスベストは断熱性、耐久性、柔軟性に優れ、建築建材を含め多くの産業界で有用な天然資源として採掘が進み 20 世紀には大量消費されてきた。一方で、アスベストの曝露から数十年を経て中皮腫を発症するため、アスベストの使用が全面禁止された後でも、発症の増加が予測される疾患である。本邦では経済活動の支援の為、国策としてアスベスト使用が推奨されていた背景もあり、使用中止が欧米に比べ 10 年程遅れた。国内の死亡者数は、2006 年の 1000 人から 2015 年には年間 1500 人を超え増加傾向にあり、発症のピークは 2030 年ごろ予測されている。希少癌であるものの、死亡数の増加が予測される社会的影響の大きい悪性腫瘍であり、2006 年には法律の成立を以て社会保障制度が整備されている。

中皮腫は、他に心膜、腹膜、精巣鞘膜、卵巣・精巣にも発生する難治性の悪性腫瘍である。中でも、胸膜悪性中皮腫の特徴的な臨床症状は、胸水貯留とそれに引き続く呼吸困難であり、多くの症例で胸水中のヒアルロンが高値(>10 万 ng/mL)となる事が知られている。胸膜悪性中皮腫を特徴付ける胸水中のヒアルロン酸は、中皮腫細胞の生物学的特性の形成に何らかの影響を与えている可能性がある。

一方、胸膜中皮腫培養細胞株を用いた網羅的遺伝子異常の解析により生物学的特性の解明が進んでいる。2016 年に Bueno らが、216 例の胸膜悪性中皮腫の網羅的解析から、高頻度に異常が見つかる 5 つの経路を発表した(1)。解析から見出された異常の蓄積している経路は、Hippo, mTOR, histone methylation, RNA helicase, p53 経路である。中でも、Hippo 経路(NF2/SAV1/MST1/STK3/LATS1/LATS2)は、過半数の腫瘍 (>60%)で何らかの異常が見つかる最も主要な破綻経路と考えられている(1)。Hippo-YAP 経路の異常は複数の悪性腫瘍で見つかり、腫瘍細胞の増殖能を誘導する事が明らかとなっている。

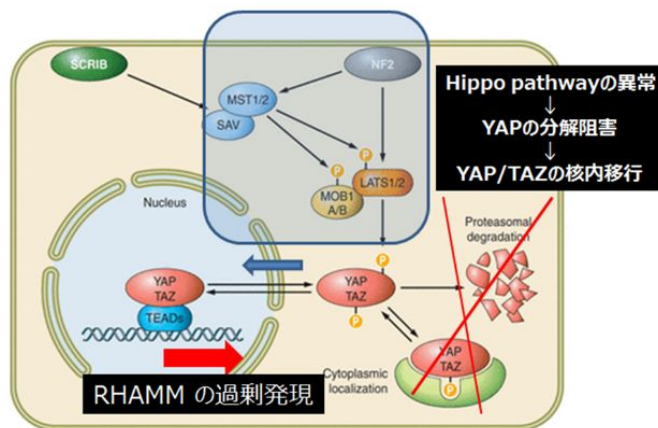


図 1: 悪性中皮腫に於ける Hippo 経路の異常と YAP/TAZ 活性化
悪性中皮腫の 6 割で異常の見出される Hippo 経路は (NF2/ SAV1/ MST1/ STK3/ LATS1/ LATS2) の異常は、YAP/TAZ のリン酸化依存性の分解経路、あるいは 14-3-3 タンパク質による細胞内貯留を阻害する。結果として転写標的分子の恒常的活性化が誘導される。

我々はこれまでに、悪性黒色腫/卵巣癌を中心とした難治性癌の浸潤・転移機構の解明を目的に、細胞運動/接着能の関連およびその阻害法について検討してきた。特に核-細胞質シャトル蛋白が接着斑(focal adhesion: FA)に集積し、翻訳後修飾状態に依存して細胞骨格の動態に影響を与える事や、微小管阻害薬の効果に影響を与える事も報告して来た(2)。RHAMM もまた核-細胞質シャトル蛋白の 1 つであり、その動態に注目している。RHAMM は細胞表面で 9-11 塩基性アミノ酸を含む領域でヒアルロン酸に結合する。細胞分裂時には細胞質/核内に移行し、微小管の再構成/細胞分裂に関与する。悪性中皮腫では、「Hippo 経路の破綻により活性化された YAP/TAZ が、ヒアルアドヘリンである RHAMM の過剰発現を誘導し、胸・腹水内に高濃度に存在するヒアルロン酸をリガンドとして浸潤・転移/播種能の獲得に寄与している。」との仮説を立てるに至った。

この事は、RHAMM-ヒアルロン酸間の結合を断ち切ることで、中皮腫の胸腔内播種や遠隔転移を制御出来る可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、悪性中皮腫の生物学的特性の形成に中心的役割を果たす、「Hippo-YAP 経路」の標的分子 RHAMM (hyaluronan-mediated motility receptor) に着目し、悪性中皮腫細胞の浸潤/転移/播種ならびに胸/腹水貯留に係る分子機構の解明と、その制御法開発の基礎研究を実施する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子工学/細胞生物学的手法を用いた、中皮腫における Hippo-YAP/TAZ-RHAMM axis と浸潤・転移活性化分子機構の解明

細胞株

解析に用いた培養細胞株の Hippo 経路遺伝子異常と YAP/RHAMM の発現状態を示す(表 1)。細胞核は愛知がんセンター研究所副所長 関戸好孝部長より譲渡されたものである。

表 1 : 実験に用いた培養細胞株

cell line	Hippo pathway's mutation	Nuclear YAP	RHAMM
ACC-MESO-4	Wild type	+	+
NCI-H28	Wild type	-	±
Y-MESO-12	NF2 homozygous deletion	-	-
Y-MESO-27	LATS2 homozygous deletion	+	++
Y-MESO-30	LATS2 NM_014572:c.2652_2665+111del125	+	-

解析手法

検討する経路は、RHAMM の発現を基軸にして Hippo 経路、RASSAF 等の SRC 活性を持つ遺伝子、およびこれら遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析を含め、蛋白発現を検討した。発現抑制には siRNA、過剰発現系の作成にはレンチウイルスベクターを用いた。Dominant active type (YAP 5SA/2SA) の過剰発現株を作成した。浸潤・転移能は trans well assay、scratch assay ならびに mitrigel invasion assay にて評価した。ヒアルロン酸添加による影響に関して同手法実験を行った。蛋白質の発現ならびに細胞骨格分子の状態に関しては共焦点レーザー顕微鏡で観察した。RHAMM 阻害薬として阻害効果の認められているスタチン系薬剤、RHAMM/ヒアルロン酸間の特異的結合阻害ペプチド(15 mer)、ヒアルロン酸合成阻害薬 4-MU を用いた。

(2) 中皮腫播種モデルの作成と RHAMM-ヒアルロン酸相互作用阻害による浸潤転移、胸/腹水コントロール実験

上記細胞株から Xenograft を作成し、胸腔・腹腔内播種モデル自験が可能か検討した。培養細胞株で検討した薬物/ペプチドについて、阻害実験を行った。

4. 研究成果

(1) Hippo 経路分子の異常の解析と RHAMM の発現制御

関連分子のプロモーター領域のメチル化状態について、脱メチル剤投与前後で蛋白発現の変化が起きるとか合わせて検討し評価した。特定のメチル化状態の変化と関連した発現の変化は生じていなかった。

YAP/TAZ siRNA 処理にて RHAMM の発現低下を認めた(図 2)。また、NCI-H28 に YAP のリン酸化部位に変異を加えた dominant active form (YAP-2SA/5SA) を作成した。YAP の核内移行・集積を認めた。RHAMM の過剰発現とそれに引き続く腫瘍細胞の浸潤・転移能は上昇を確認した(図 2)。

RHAMM の免疫染色では、過剰発現株で focal adhesion kinase (FAK) の蛋白の凝集がみられ、接着斑での FAK の作用が活性化している可能性が示された (図 2) 。

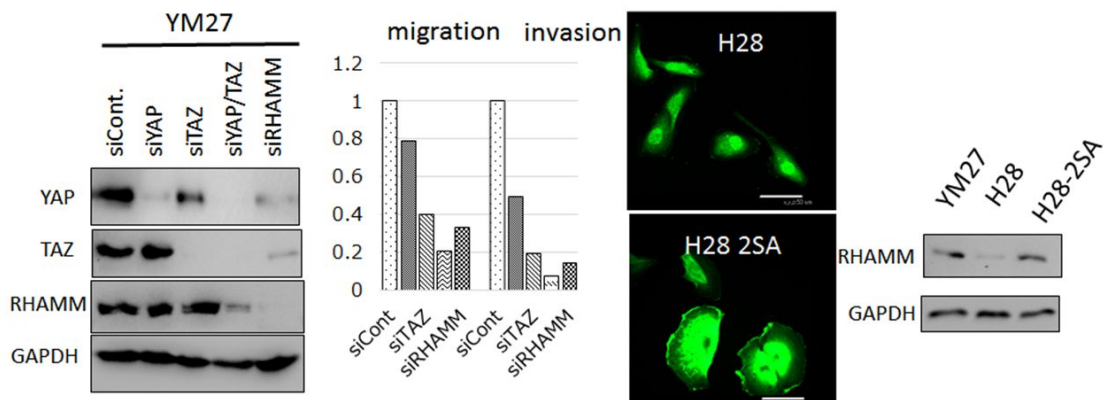


図 2 悪性中皮腫に於ける Hippo- YAP/TAZ-RHAMM の発現動態

Hippo pathway に異常のある(LATS homozygous deletion)の細胞株 YMESO-27 は、RHAMM の過剰発現があり、YAP/TAZ の siRNA 処理で発現が抑制された。一方、野生型の細胞株に dominant active YAP を導入した細胞では、細胞質・核内集積がみられ、RHAMM の発現が誘導された。免疫染色で、FA への凝集が確認され浸潤運動能の活性化が FAK によるものである可能性が示唆された。

(2) ヒアルロン酸添加による、中皮腫の浸潤・転移能に与える影響

ヒアルロン酸添加により、細胞運動能は上昇した (図 3) 。

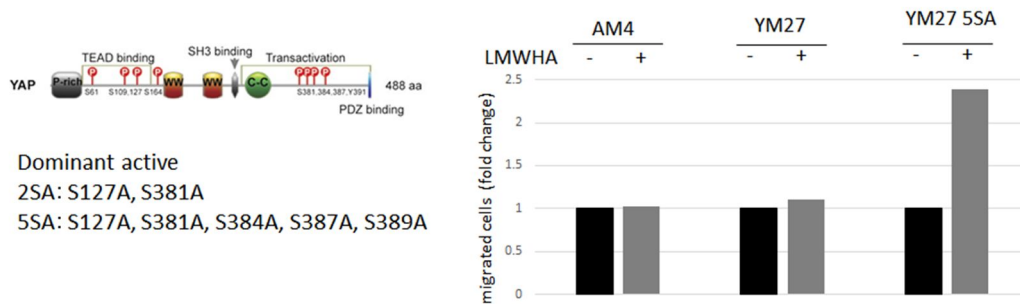


図 3 実験に用いた dominant active YAP の構築とヒアルロン酸添加の影響

Hippo 不活化 type の YM27 5SA でヒアルロン酸添加による運動能の亢進がみられる。

培養細胞株では、ヒアルロン酸添加による運動能の亢進は、スタチン、結合阻害ペプチド(15 mer)、4-MU 添加で抑制された (図 4) 。同様に細胞増殖能も抑制された。一方で、腹膜播種モデルでは抑制効果は確認されなかった。

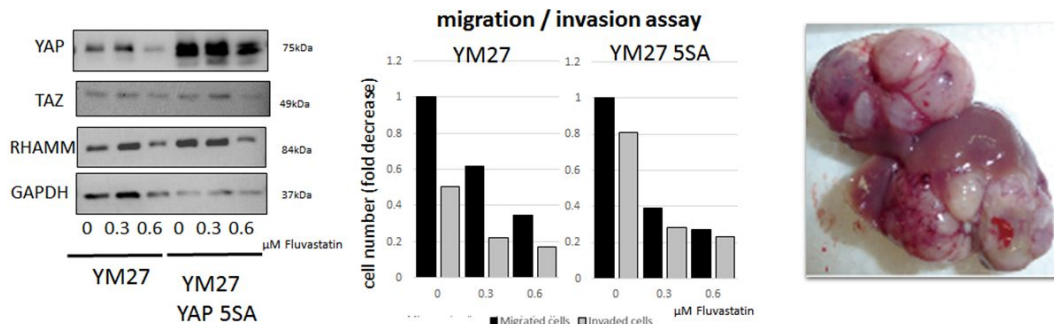


図 4 スタチン系薬剤による RHAMM の発現抑制と運動/浸潤能に対する影響。

RHAMM の過剰発現株 YM27-5S の腹膜播種。肝表面に多数の播種が見られる。

以上の研究成果は、Hippo-YAP 経路の標的分子 RHAMM が浸潤・転移と密接に関連していること、その浸潤転移能はヒアルロン酸依存性に亢進することを明らかにした。一方で、既存の候補薬物、ペプチドを用いた競合阻害実験では有効性を示せなかった。RHAMM は胸膜中皮腫治療の標的分子になり得る可能性は示されたものの、ヒアルロン酸相互作用を阻害する薬物スクリーニング法の開発研究が必要であると思われた。

文献

- (1) Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD. Comprehensive Genomic Analysis of Malignant Pleural Mesothelioma Identifies Recurrent Mutations, Gene Fusions and Splicing Alterations. *Nat Genet.* 2016 Apr;48(4):407-16. doi: 10.1038/ng.3520. Epub 2016 Feb 29.
- (2) Tatemichi Y., Shibasaki M., Maesawa C. et. al. Nucleus accumbens associated 1 is recruited within the promyelocytic leukemia nuclear body through SUMO modification. *Cancer Sci.* 2015;106(7):848-56.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishiya Masao, Yasuhira Shinji, Shibazaki Masahiko, Oikawa Hiroki, Masuda Tomoyuki, Maesawa Chihaya	4. 巻 30
2. 論文標題 Fluvastatin exerts an antitumor effect in vemurafenib-resistant melanoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anti-Cancer Drugs	6. 最初と最後の頁 451 ~ 457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CAD.0000000000000757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saeki Eri, Yasuhira Shinji, Shibazaki Masahiko, Tada Hiroshi, Doita Minoru, Masuda Tomoyuki, Maesawa Chihaya	4. 巻 14
2. 論文標題 Correction: Involvement of C-terminal truncation mutation of kinesin-5 in resistance to kinesin-5 inhibitor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0212821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0212821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Saeki Eri, Yasuhira Shinji, Shibazaki Masahiko, Tada Hiroshi, Doita Minoru, Masuda Tomoyuki, Maesawa Chihaya	4. 巻 13
2. 論文標題 Involvement of C-terminal truncation mutation of kinesin-5 in resistance to kinesin-5 inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0209296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0209296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Masahiro, Ogasawara Masahito, Kawasaki Yasushi, Niisato Miyuki, Saito Heisuke, Kasai Shuya, Maesawa Chihaya, Maemondo Makoto, Yamauchi Kohei	4. 巻 9
2. 論文標題 Deficiency of protein-L-isoaspartate (D-aspartate) methyl-transferase expression under endoplasmic reticulum stress promotes epithelial mesenchymal transition in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 e13287-e13300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa Nobuyuki, Okubo Ayaka, Yasuhira Shinji, Takahashi Kazuhiro, Amano Hiroo, Akasaka Toshihide, Masuda Tomoyuki, Shibazaki Masahiko, Maesawa Chihaya	4. 巻 15
2. 論文標題 Carnosic acid, an inducer of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, enhances the cytotoxicity of lapachone in melanoma cell lines	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2393-2400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.7618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigeeda Wataru, Shibazaki Masahiko, Yasuhira Shinji, Masuda Tomoyuki, Tanita Tatsuo, Kaneko Yuka, Sato Tatsuhiro, Sekido Yoshitaka, Maesawa Chihaya	4. 巻 8
2. 論文標題 Hyaluronic acid enhances cell migration and invasion via the YAP1/TAZ-RHAMM axis in malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 93729-93740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.20750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Akiko, Yasuhira Shinji, Mayama Hisayo, Miura Hiroyuki, Maesawa Chihaya, Satoh Kazuro	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization of PAX9 variant P20L identified in a Japanese family with tooth agenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e186260-e186260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0186260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kasai Shuya, Sasaki Takuya, Watanabe Ayano, Nishiya Masao, Yasuhira Shinji, Shibazaki Masahiko, Maesawa Chihaya	4. 巻 14
2. 論文標題 Bcl-2/Bcl-xL inhibitor ABT-737 sensitizes pancreatic ductal adenocarcinoma to paclitaxel-induced cell death	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 903 ~ 908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2017.6211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷田 達男 (Tanita Tatsuo) (20217144)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	
研究分担者	柴崎 晶彦 (Shibazaki Masahiko) (20445109)	岩手医科大学・医学部・助教 (31201)	
研究分担者	杉山 徹 (Sugiyama Toru) (40162903)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	