

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830113

研究課題名(和文) YAP・TAZの過剰活性化を阻害する既存医薬品の乳がん幹細胞阻害薬としての応用

研究課題名(英文) Inactivation of YAP/TAZ by approved agents and their application as anti-breast cancer stem cell drugs

研究代表者

奥 裕介 (Oku, Yusuke)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50626843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌遺伝子産物YAP/TAZの機能を阻害する化合物として、フルバスタチン、ダサチニブ、パゾパニブを同定した。これらは、Hippo経路を活性化し、YAP/TAZの核移行を阻害した。乳がんと大腸がん細胞株におけるこれらの薬剤に対する感受性は、YAP/TAZの依存性とよく相関していた。これら3種の医薬品のコンビネーションによって、効率よくMDA-MB-231乳がん細胞の増殖を抑制することができた。更に、これら3つの薬剤は、古典的な抗癌剤との併用により相乗的にMDA-MB-231細胞株の増殖を抑制した。以上の結果は、これらの薬剤がYAP/TAZ依存性の乳がんに対して有効であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We identified fluvastatin, dasatinib, pazopanib as agents inhibiting the function of oncogenic transcriptional co-activator, YAP/TAZ. They activate Hippo pathway and inhibit their nuclear localization. The sensitivity to these drugs of breast and colon cancer cell lines were correlated with the dependence on YAP/TAZ. Combination of these drugs efficiently reduced viability of MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Furthermore, combination of these drugs with classical anti-cancer drugs synergistically reduced the viability of MDA-MB-231. These results suggest that these agents are effective for breast cancer cells with YAP/TAZ activation.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：Hippo経路 YAP/TAZ スタチン ダサチニブ パゾパニブ

1. 研究開始当初の背景

Hippo 経路は、組織のサイズを規定するシグナル伝達経路として知られている。その下流に位置する YAP・TAZ は、転写因子 TEAD と結合する転写コアクチベーターであり、転写を介して細胞死耐性と増殖を促す。細胞密度の上昇や、アクチン細胞骨格の動態変化が生じると、LATS1/2-MOB1 複合体が活性化し、YAP・TAZ をリン酸化する。これにより、YAP・TAZ は細胞質内に蓄積し、核での転写活性化が抑制される。Hippo 経路の構成因子の変異マウスは、組織の過増殖を生じてがんを生じる。YAP・TAZ は、がん遺伝子産物としての性質を持つが、その制御については不明な点が多く、現在のところ YAP・TAZ の過剰活性化を抑制する医薬品シードは見出されていない。がん幹細胞は自己複製を行いながら、腫瘍組織の細胞に分化するという未分化細胞様の性質を持つ。がん幹細胞は多剤耐性を示し、化学療法への耐性や再発の原因と考えられている。様々ながんにおいて、細胞表面マーカーの発現量を指標としてがん幹細胞が分離されている。近年、乳がん幹細胞として知られている CD44^{high}CD24^{low} の細胞集団では、YAP・TAZ の発現量が高いこと、TAZ の発現抑制により、CD44^{high}CD24^{low} の細胞集団が減少することが報告された。このことは、TAZ が乳がん幹細胞の自己複製に必要であることを示しており、YAP・TAZ の過剰な活性化を抑制することにより、乳がん幹細胞の自己複製を抑制することが可能であることを示唆している。研究代表者は、YAP・TAZ の過剰な活性化を抑制し、乳がん幹細胞の自己複製能を阻害する化合物の同定を試みた。その結果、スタチン系薬剤である lovastatin を含む、複数の化合物が YAP の核移行を阻害することを見出していた。

2. 研究の目的

本研究では、乳がん及び大腸がんに対する医薬品として、YAP/TAZ を不活性化する既存医薬品もしくはその誘導体の臨床への応用を試みた。YAP/TAZ はがん化学療法耐性や再発にかんよすることがこれらのがんで報告されており、その阻害剤は、これらのがんの成績の向上につながる。乳がん幹細胞は、転写コアクチベーター YAP・TAZ の過剰活性化によって生じる。研究代表者は、YAP・TAZ の活性化を抑制する化合物の候補として、スタチン系化合物、ダサチニブ、パゾパニブといった既存医薬品を同定した。本研究では、これらの薬剤が、YAP・TAZ の不活性化する分子機構を明らかにし、抗がん剤耐性を阻害するかについて明らかにすることを試みた。また、YAP/TAZ の機能阻害を定量的に解析すること、新たな YAP/TAZ の機能阻害を生じる化合物の同定を目的としたツールとして、Hippo 経路による YAP/TAZ のユビキチン-プロテアソーム系による分解を、ルシフェラーゼ活性を指標にモニターする系の構築を試み

た。

3. 研究の方法

乳がん細胞株として、MDA-MB-231、SKBR3、HBC-4、HBC-5、MCF-7、BSY-1、ZR-75-1、MDA-MB-453 細胞株を、大腸がん細胞株として、DLD-1、HCT-116、HT-29、LS180、KM-12、HCC2998 を用いた。フルバスタチン、ダサチニブ、パゾパニブの作用機序の解析には、YAP/TAZ に対する依存性の高い乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞株を用いた。YAP/TAZ の不活性化が生じているかについては、YAP/TAZ に対する抗体を用いた免疫染色、YAP/TAZ-TEAD 結合部位の下流にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されたレポータープラスミドを導入し、レポーターアッセイを行った。また、内在性の標的遺伝子として CTGF の発現量を、qPCR を用いて調べた。

これらの細胞株の薬剤感受性は、MTT assay を用いて検討した。

4. 研究成果

YAP/TAZ の不活性化を導く医薬品として、高脂血症薬フルバスタチン、慢性骨髄性白血病治療薬ダサチニブ、軟部腫瘍治療薬パゾパニブをハイコンテンツスクリーニングを用いて同定した。これらは乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞の YAP と TAZ の核移行を阻害した。YAP/TAZ の核移行は、Hippo 経路の活性化により、YAP/TAZ のリン酸化によって制御されている。そこで YAP/TAZ のリン酸化がこれらの薬剤によって増加するかについて調べたところ、これらの薬剤は YAP のリン酸化を促進させることがわかった。パゾパニブは YAP, TAZ の分解を促進した。この分解はプロテアソーム阻害剤である MG132 によって阻害されたことから、パゾパニブによる YAP, TAZ の分解の促進は、プロテアソームに依存するものであることがわかった (図 1)。フルバスタチンはアクチン細胞骨格の動態制御に関与する RhoA のゲラニルゲラニル化を阻害することが知られている。このことと一致して、フルバスタチンによる YAP, TAZ の核移行の阻害はゲラニルゲラニル 2 リン酸の培地への添加によって抑制された。この効果は、ファルネシル 2 リン酸の添加では見られなかった。さらに、GGT1-286 によるゲラニルゲラニル基転移酵素の阻害によっても同様の表現型が見られ、FTI-276 によるファルネシル基転移酵素の阻害では見られなかった。したがって、フルバスタチンによる YAP, TAZ の核移行の阻害には、RhoA をはじめとするタンパク質のゲラニルゲラニル化修飾の阻害と、Hippo 経路の活性化が関与するものと考えられた。ダサチニブは、SRC キナーゼを阻害することでアクチン細胞骨格の動態変化に直接寄与する。また、パゾパニブは VEGFR のキナーゼ活性を阻害する化合物であり、そのシグナル伝達の下流には RhoA や Focal adhesion kinase (FAK) が存在する。したが

って、これらもまたアクチン細胞骨格の動態変化に基づいて Hippo 経路を活性化し、YAP, TAZ を不活性化しているものと考えられた。

8 株の乳がん細胞株、6 株の大腸がん細胞株について、これら 3 剤の感受性を比較したところ、感受性に大きな差が見出された。また、正常細胞として用いたヒト胎児腎臓線維芽細胞 HEK293 細胞では、これらの薬剤による細胞増殖の低下は大きくなかった。この薬剤感受性と、YAP, TAZ のノックダウンに対する感受性にはある程度の相関が見られた。したがって、3 剤に対する感受性を規定する因子として、YAP, TAZ に対する依存性が考えられた。3 剤の組み合わせによって、乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞の増殖はより効率的に抑制された。YAP, TAZ は抗がん剤耐性に関与することが報告されている。そこで、同定した 3 種の薬剤と、殺細胞性抗がん剤の併用を MDA-MB-231 細胞株に対して行った。その結果、これら 3 剤の薬剤は乳がん治療に広く用いられるパクリタキセルやドキシソルピシンの効果を高めることがわかった。以上の結果から、YAP, TAZ 依存性の乳がんに対して、フルバスタチン、ダサチニブ、パゾパニブが有効である可能性を示した。

本研究を取りまとめる前に、イタリアの研究グループからスタチン系化合物が YAP/TAZ の不活性化を生じるとの報告がなされ、スタチン系化合物によるマンモスフェア形成の阻害や、造腫瘍能の低下が報告された (Sorrentino *et al* 2014 *Nature Cell Biology*)。乳がん幹細胞では、YAP/TAZ によって自己複製能が維持されていることが報告されており、TAZ の阻害によって、自己複製能が失われることが示唆されている。したがって、本研究で得られた 3 種の化合物は、乳がん幹細胞の自己複製を阻害しうることが考えられた。

本研究で得られたこれらの結果は、FEBS Open Bio 誌に掲載された。また、本内容を含む内容について、第 19 回がん分子標的治療学会学術集会でポスター賞を受賞した。

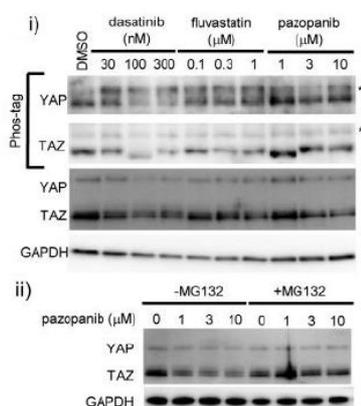


図 1. i) ダサチニブ、フルバスタチン、パゾパニブによる YAP のリン酸化の増加。*は phos-tag gel 上で、バンドシフトしたリン酸化 YAP または TAZ を示す。ii) パゾパニブによる TAZ のプロテアソーム依存性の分解の促進。

さらに YAP, TAZ の機能を阻害するプローブとして、また、同定した 3 つの化合物の作用機序を知る上でのツールとして、split luciferase assay を用いた YAP, TAZ のユビキチン化プローブの作製を行った。YAP, TAZ は Hippo 経路のキナーゼである LATS1/2 によってリン酸化されると、核移行の阻害と、ユビキチンプロテアソーム系による分解を受ける。このユビキチン化をモニターするために、YAP とユビキチン cDNA と、分割したルシフェラーゼ断片の cDNA を融合した融合コンストラクトを作成した。これらは単独でルシフェラーゼ活性を示さないが、YAP とユビキチンが近接することで、ルシフェラーゼ断片の近接が起こり、酵素活性が再構成される。まず、ウミシイタケルシフェラーゼの N 末端と C 末端をそれぞれ YAP の N 末端、ユビキチンの N 末端に融合したコンストラクトを発言した。その結果、細胞の密度の増加に応じたルシフェラーゼ活性の上昇が見られた。しかしながら、その半減期は 2 分と極めて短く、発光強度も弱いものであった。そこで、近年開発された NanoLuc ルシフェラーゼを用いた系を Promega 株式会社から譲渡していただき、NanoLuc の N 末端と C 末端をそれぞれ YAP または TAZ、ユビキチンの N 末端に融合したコンストラクトを作成した。その結果、細胞密度の増加に応じたルシフェラーゼ活性の増大や、血清添加によるルシフェラーゼ活性の上昇、YAP, TAZ の活性化に関与する GSK3 を阻害した場合にも活性上昇が見られた。このルシフェラーゼの半減期は 2 時間と極めて長く、発光強度もウミシイタケルシフェラーゼを用いた場合よりも高かった。したがって、本プローブは YAP, TAZ の不活性化を担う Hippo 経路の活性化をモニター可能なプローブであり、YAP, TAZ に作用する薬剤の作用機序の解析ばかりでなく、薬剤スクリーニングのツールとして有用である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Oku, Y., Nishiya, N., Shito, T., Yamamoto, R., Yamamoto, Y., Oyama, C. & Uehara, Y. (2015) Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers, *FEBS Open Bio*. 5, 542-549.

Nishiya, N., Sakamoto, Y., Oku, Y., Nonaka, T. & Uehara, Y. (2015) JAK3 inhibitor VI is a mutant specific inhibitor for epidermal growth factor receptor with the gatekeeper mutation T790M, *World J Biol Chem*. 6, 409-18.

〔学会発表〕(計 17 件)

Yoshimasa Uehara, Yusuke Oku、

Kayoko Tsuda, Masahiko Shibasaki, Chihaya Maesawa, Naoyuki Nishiya Self-floating breast cancer cell populations express cancer stem cell markers and show resistance to anticancer drugs、10th AACR-JCA Joint Conference, Maui, USA, 平成 28 年 2 月 19 日 ポスター発表

Yusuke Oku, Naoyuki Nishiya, Yoshimasa Uehara Identification of small molecules inhibiting oncogenic transcriptional co-activator, YAP/TAZ、10th AACR-JCA Joint Conference, Maui, USA, 平成 28 年 2 月 17 日 ポスター発表

Yusuke Oku, Naoyuki Nishiya, Yoshimasa Uehara Self-floating cell populations express cancer stem cell markers and show resistance to anticancer drugs、第 74 回日本癌学会学術集会、名古屋、平成 27 年 10 月 10 日 ポスター発表

奥裕介、西谷直之、上原至雅、がん幹細胞様細胞集団を濃縮する自発的浮遊培養法、第 54 回日本薬学会東北支部総会、矢巾、平成 27 年 9 月 26 日 口頭発表

工藤紫乃、堀籠宏稀、奥裕介、上原至雅、西谷直之、イベルメクチンによる Wnt/beta-catenin 経路の阻害とその作用機序の解析、第 54 回日本薬学会東北支部総会、矢巾、平成 27 年 9 月 26 日 ポスター発表

阿部佳祐、加藤汐織、沼畑実希、阿部奈美子、村井さとみ、奥裕介、西谷直之、上原至雅、がん遺伝子産物 YAP・TAZ のユビキチン化の評価系の開発、第 54 回日本薬学会東北支部総会、矢巾、平成 27 年 9 月 26 日 ポスター発表

小山千尋、奥裕介、西谷直之、志渡俊也、山本礼一朗、山本泰史、上原至雅、がん遺伝子産物 YAP・TAZ の核移行を阻害する化合物の同定、第 54 回日本薬学会東北支部総会、矢巾、平成 27 年 9 月 26 日 ポスター発表

小川真実、片山綜太、清水優依、奥裕介、上原至雅、西谷直之、アゾール系抗真菌薬による Wnt/beta-catenin 経路阻害の作用機序の解析、第 54 回日本薬学会東北支部総会、矢巾、平成 27 年 9 月 26 日 ポスター発表

Nishiya, N., Oku, Y., Uehara, Y. Self-floating breast cancer cells elevate aldehyde dehydrogenase activity and show drug resistance. 2015 Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Stockholm, Sweden、平成 27 年 6 月 25 日 ポスター発表

Otsu, K., Oku, Y., Nishiya, N., Fujiwara, N., Harada, H. Regulation of stemness of dental epithelial stem cells by Rho signaling. 2015 Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Stockholm, Sweden、平成 27 年 6 月 25 日 ポスター発表

奥裕介、西谷直之、上原至雅、YAP・TAZ がん遺伝子産物の機能を阻害する化合物の探索、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会、松山、平成 27 年 6 月 11 日 ポスター発表(ポスター賞受賞)

西谷直之、奥裕介、上原至雅、アゾール系抗真菌薬による Wnt/beta-catenin 経路阻害を介した抗腫瘍活性、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会 松山、平成 27 年 6 月 11 日. ポスター発表

西谷直之、片山綜太、清水優依、小川真実、工藤紫乃、堀籠宏稀、奥裕介、上原至雅、アゾール系抗真菌薬による Wnt/beta-catenin 経路阻害作用 第 135 年会日本薬学会、神戸、2015 年 3 月 26 日. ポスター発表

Nishiya, N., Oku, Y., Uehara, Y., A zebrafish chemical suppressor screening identifies antifungal azoles as inhibitors of the Wnt/beta-catenin pathway., 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜)、2014 年 9 月 25 日. ポスター発表

西谷直之、奥裕介、上原至雅、がん細胞-微小環境間相互作用の薬理的制御を志向した探索研究、未来医療開発プロジェクト研究成果発表会(矢巾) 2014 年 8 月. ポスター発表

奥裕介、西谷直之、上原至雅、フルバスタチンによる YAP がん遺伝子産物の不活性化と、その乳がん治療薬としての応用の可能性、第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会(仙台) 2014 年 6 月 26 日. ポスター発表

西谷直之、奥裕介、上原至雅、アゾール系抗真菌薬による Wnt/beta-catenin 経路への阻害効果、第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会(仙台) 2014 年 6 月 26 日. ポスター発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥裕介 (OKU, Yusuke)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50626843