

博士論文

論文題目 非小細胞肺癌における転写共役因子 TAZ の機能解析

氏名 野口 智史

目次

要旨	3
背景	4
方法	9
結果	23
考察	76
謝辞	84
参考文献	85

要旨

転写共役因子 TAZ は臓器サイズのコントロールや細胞増殖において重要な役割を果たす Hippo pathway の一因子である。TAZ の非小細胞肺癌（NSCLC）における機能に関してはまだ不明な部分が多い。本研究では公共データベースにおけるマイクロアレイデータのメタ解析を行い、mRNA レベルで TAZ が予後と有意に相関することが示された。また、345 人の NSCLC を含む組織マイクロアレイを用いた免疫組織染色の結果、蛋白レベルでも TAZ の高発現と不良な予後との有意な相関が認められた。気管支上皮細胞株及び肺癌細胞株を用いた TAZ 過剰発現及びノックダウンの実験系において、TAZ は細胞増殖、細胞周期、アポトーシスに関わり、amphiregulin などの ErbB リガンドの発現を制御していることが分かった。TAZ は予後規定因子、さらに治療ターゲットとして有用である可能性が示唆された。

背景

1. 今日の肺癌診療

肺癌は本邦並びに世界的にも癌死の第一位であり、他臓器の癌と比較して治療成績は不良である。肺癌は治療方針の違いから小細胞肺癌と非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer; NSCLC）に分類され、後者は全体の8割を占める。近年遺伝子工学の発達に伴い、一部の肺癌において、特徴的な分子生物学的異常が肺癌発症に関与することが分かり、分子標的治療が著効することが明らかになった。例えば、EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK 融合遺伝子の存在が一部の肺癌で発見され、各々EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）、ALK 阻害剤が著効を示すことが知られている[1, 2]。しかし、これらの異常を有する肺癌は NSCLC の一部であり、残りの肺癌患者においては有効な治療は乏しい。従って、肺癌発症における他の分子生物学的な機序の解明が現在の重要な課題である。

2. TAZ と Hippo pathway

TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) は WWTR1 (WW-domain containing transcription regulator-1) とも呼ばれ、当初 14-3-3 に結合する蛋白として発見された[3]。TAZ 及びそのパラログである YAP (Yes-associated protein) は

Hippo pathway を構成する重要な因子である。Hippo pathway は、その構成因子の多くがショウジョウバエからヒトに至るまで保存されており、臓器サイズのコントロールにおいて重要な役割を果たす[4]。細胞同士の接触がそのシグナル伝達の始まりとなり、MST1/2 が LATS1/2 をリン酸化し、今度は LATS1/2 が TAZ をリン酸化するというリン酸化カスケードを引き起こす。リン酸化された TAZ は 14-3-3 蛋白に結合し、細胞質から核への移行が妨げられる[5]。TAZ は核内では主に転写因子 TEAD ファミリーと共に細胞増殖を促す遺伝子群の発現を引き起こす。細胞増殖のみならず、TAZ は他の生物学的に重要なプロセスに関わることが知られている。例えば、Runx2 または PPAR γ 依存的に間葉系幹細胞の分化を制御したり[6]、Smad の局在をコントロールすることでヒト ES 細胞の自己複製を制御したり[7]、メカノトランスダクション[8]に関わったりすることが近年報告されている。また、protease-activated receptors (PARs)[9]、G-protein-coupled receptor (GPCR)シグナリング[10]、Wnt/ β -catenin シグナリング[11]など他の重要なシグナル伝達経路とのクロストークも知られている。

3. 肺の発生における TAZ の役割

TAZ ノックアウトマウスの表現型は 2 つの大きな病理学的変化を伴う[12]。腎嚢胞性変化及び肺の気腫性変化である。TAZ がノックアウトされると正常な末

梢の肺胞形成が損なわれ、肺胞腔が拡大し、肺のエラスタンスは低下する。また、*Taz-heterozygous* マウスはブレオマイシンによって引き起こされる肺線維化が正常マウスに比べ抑制される。肺発生に深く関わることが知られている CTGF (connective tissue growth factor) が TAZ の直接の標的遺伝子であることが示されており、さらに TAZ は、肺発生に必須の転写因子 TTF-1 (thyroid transcription factor-1) と協同的に作用し、肺サーファクタント産生を促すと報告されている [13]。これらのことから TAZ は肺発生及びホメオスタシスに重要な役割を果たすといえる。

4. TAZ と癌との関連

最近、TAZ が多くの癌において高発現していることが報告されている。TAZ は細胞の増殖、遊走、浸潤、足場非依存性増殖、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) を促進させることにより乳癌の腫瘍形成に貢献する [14, 15]。TAZ は転写因子 TEAD と協同的に働き、このような細胞機能を制御する遺伝子発現を促す [16]。また、悪性神経膠腫の間葉系への分化を引き起こす際にも TAZ と TEAD 両者が直接的に働く [17]。さらに、TAZ は乳癌の癌幹細胞の特性に関与することも知られており、腫瘍形成における TAZ の重要性が示唆される [18]。他にも TAZ の高発現は大腸癌や甲状腺乳頭癌において

も報告されている[19, 20]。

5. 肺癌における TAZ

近年、TAZ が他の癌と同様に NSCLC 細胞においても高発現していることが報告された[21]。その研究では TAZ は正常気道上皮細胞株での発現はほとんど認められず、NSCLC 細胞株において高発現を示した。さらに肺腺癌細胞株である A549 細胞において TAZ をノックダウンすると細胞増殖及び足場非依存性増殖が抑制され、ヌードマウスに皮下注射された異種移植腫瘍は TAZ ノックダウン群で大きさが小さかったことから、TAZ は肺癌の発症や進展に寄与していることが示唆された。さらに別のグループは手術で切除された NSCLC 組織における TAZ の蛋白レベルでの発現を調べ、TAZ 発現は患者の生存における独立した予後因子であることを報告した[22]。しかし、肺癌における TAZ の oncogenic function を規定するメカニズムは解明されていない。また、TAZ の予後に与える影響に関しても、独立した、より大きなサンプルサイズの研究で解析する必要性は高い。

ウプサラ肺癌コホートは、単一施設からなる、世界でも有数の肺癌コホートである。ウプサラコホートでは、肺癌組織の包括的なマイクロアレイ解析（遺伝子発現及び SNP）、高速シーケンサー、免疫組織染色（組織マイクロアレイ）

を用いて、肺癌のゲノム異常や発現プロファイルが解析され、さらに予後や組織型など臨床情報と統合することで、肺癌の臨床及び分子病理学的機序を明らかにする研究が多数報告されている[23-25]。

本研究では、アップサラコホートを用いて、DNA、mRNA、蛋白レベルで肺癌における TAZ の発現を明らかにし、TAZ の予後に与える影響を解析し、さらに *in vitro* 及び *in vivo* モデルで TAZ の肺癌における機能を調べることを目的とした。

方法

1. 肺癌組織のマイクロアレイ解析

臨床情報を有した196人の肺癌患者のコホートを本研究の基盤とした（ウプサラコホート）。1995年から2005年までにUppsala-Örebro Regional Lung Cancer Registerに報告された、外科的に切除されたNSCLC患者を対象とした。研究はSwedish Biobank Legislationに従って行われ、Uppsala Ethical Review Boardで承認された(2006/325)。196個の凍結組織サンプルからRNA及びDNAが抽出され、Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 arrays (54675 probe sets, Affymetrix Inc.)を用いて、遺伝子発現解析がなされた。マイクロアレイのデータセットはGene Expression Omnibus データベース (GSE37745)に登録されている。また、遺伝子コピー数はAffymetrix Gene Chip Mapping 250K Nsp I arraysを用いて解析された [23]。

2. マイクロアレイデータのメタ解析

NCBI の公共データベースから、Affymetrix gene chip U133A または U133 plus 2 array を使用して行われた NSCLC 組織のマイクロアレイデータの 9 個 (GSE37745[24]、GSE14814[26]、GSE3141[27]、GSE19188[28]、GSE4573[29]、GSE31210[30]、Shedden *et al.* 2008[31]、GSE29013[32]、GSE31547) を得た。合

わせて 1339 例の NSCLC 患者（腺癌 938 例、扁平上皮癌 349 例、大細胞癌その他 52 例）、22277 個のオーバーラップした probe set の情報が得られた。

マイクロアレイデータのメタ解析は、R パッケージ “meta” を使用して行った (<http://cran.r-project.org/web/packages/meta/>)。fixed effect model 及び random effects model を用いて、異なる研究間での結果を統合した。結果は forest plot で視覚化した。

3. 組織マイクロアレイ及び免疫組織化学

ウプサラコホートにおいて遺伝子発現マイクロアレイ解析が行われた 196 例のうち 189 例に、さらに 166 例が合わさり、合計 355 例の NSCLC 組織から組織マイクロアレイ (TMA) が作られた。また、18 例の正常肺組織も TMA に組み込まれた。TMA スライドはキシレン中で脱パラフィン化し、順次アルコールで水和した後、抗原賦活化のため pH 6.7 中で 15 分間 microwave 処理をした。0.3% 過酸化水素中に 5 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼをブロックし、Antibody Diluent (S0809, Dako) で希釈した、TAZ (Sigma Aldrich、HPA007415、40 倍希釈) または amphiregulin (AREG; R&D Systems、AF262、10 倍希釈) に対する一次抗体を 30 分間室温で反応させた。phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後、二次抗体 (Dako REAL™ EnVision™、Dako) を 30 分間室温で反応させ、さらに PBS

で洗淨後、diaminobenzidine (DAB) で 10 分間反応させた。最後にヘマトキシレンによる対比染色を 5 分間行った。

免疫染色はその染色度の強さから次の 2 つのスコアの積として 0-9 に分類された。スコアリングは肺病理学者と共に、臨床情報は伏せて blind で行われた。

染色の強さ：陰性(0)、軽度(1)、中等度(2)、強度(3)

腫瘍細胞のうち陽性細胞の割合：0% (0)、1%-9% (1)、10%-49% (2)、50%-100% (3)

生存解析のために TAZ の染色スコアはメディアン値で 2 群（低発現： 0-6、高発現：7-9）に分けられた。

TAZ の発現レベルと臨床病理学上のパラメーターとの相関、そして TAZ と amphiregulin の蛋白レベルでの発現の相関は χ^2 検定で解析した。生存解析で 2 群間の比較は Kaplan-Meier plots で視覚化し、ログランク検定を行った。また、単変量 Cox 回帰分析、及び、確立された予後規定因子である年齢、performance status、臨床病期を組み入れた多変量 Cox 回帰分析を行った。遺伝子-遺伝子間、遺伝子-蛋白間の発現レベルの相関は Spearman correlation coefficient (rho) により評価した。以上の解析は JMP version 9.0.3 (SAS Institute Inc.)を用いて行った。

4. 細胞株

ヒト肺癌細胞株 A549、NCI-H441 (H441) 細胞は American Type Culture Collection

から、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B 細胞は European Collection of Cell Cultures から、293FT 細胞は Invitrogen から得た。培地はすべて譲渡元が推奨する培地を用い、CO₂ インキュベーターで 37°C で培養を行った。

5. Small interfering RNA experiment

TAZ に対する small interfering RNA (siRNA) 及び negative control を Invitrogen から得た (Stealth RNAi, si TAZ #1: HSS119545; si TAZ #2: HSS119546、negative control (si NTC) : #12935-300)。A549、H441 細胞は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて、プロトコール通りに、20nM の siRNA をトランスフェクションした。

6. ヒト TAZ cDNA のクローニング

A549 細胞から total RNA を RNeasy mini kit (Qiagen) を用いてプロトコールに従って抽出した。抽出した 1µg の RNA から、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を使用して、付属のプロトコールに従い、oligo(dT) 20 primer、dNTP mixture を加え、cDNA を合成した。PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara) を使用して、付属のプロトコールに従い、各々制限酵素 BamHI、XhoI の切断部位を取り入れた forward primer、reverse primer を用いて、下記の条件で PCR を行

い、TAZ の open reading frame を増幅した。

98°C 60 秒-(98°C 10 秒, 60°C 15 秒, 72°C 30 秒)×35 サイクル-72°C 7 分

forward primer : AAAAGGATCCCAGAAGATGAATCCGGCCTC

reverse primer : AAAACTCGAGTTACAGCCAGGTTAGAAAGG

PCR 産物を Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) を用いて、付属のプロトコールに従い、精製した。精製後、BamHI 及び XhoI を用いて、37°C 2 時間反応させ、さらに反応産物を同様に精製した。

また、pENTR201-5'-Flag (RIKEN) を、上記と同様に制限酵素 BamHI 及び XhoI を用いて切断後、精製し、両者を Ligation high (東洋紡) を用いて、付属のプロトコールに従い、16°C 3 時間反応させ、ライゲーションを行った。その後 One Shot® TOP10 Chemically Competent *E.Coli* (Invitrogen) を以下のように形質転換した。TOP10 50µL に約 2ng のライゲーション反応産物を加え、30 分氷上でインキュベートした後、42°C 30 秒のヒートショックを行い、その後 2 分間氷上に置いた。250µL の SOC 培地を加え、1 時間 225rpm で振盪培養した後、20µg/mL のカナマイシン入り LB 固形培地にまき、37°C で一晩培養した。コロニーをピックアップし、LB 液体培地で 37°C で一晩培養した後、QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて付属のプロトコールに従い、ミニプレップを行った。得られ

たプラスミドを BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて付属のプロトコールに従い、サイクルシーケンス反応を以下の条件で行った。

94°C 3 分-(94°C 30 秒, 55°C 15 秒, 60°C 4 分)×25 サイクル

シーケンス用 primer 1 : TTGGTACCGAGCTCGGAT

シーケンス用 primer 2 : GTATCCCAGCCAAATCTCGTGATG

Centri-Sep spin column (Invitrogen) を用いて付属のプロトコールに従い、反応物を精製後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzerにより塩基配列を解析し、正しい塩基配列であることを確認した。

Gatewayシステム (Invitrogen) のプロトコール通りに、得られたプラスミドを Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen) 及びdestination ベクターであるCSII-EF-Rfa (RIKEN) と共に25°Cで1時間培養し、LR反応を行わせた。その後、プロテアーゼKを加えて37°Cで10分間培養しLR反応を停止させた。LR反応産物を用いて、上記と同様にOne Shot® Stbl3 Chemically Competent *E.Coli*

(Invitrogen) を形質転換した後、50µg/mLのアンピシリン入りLB固形培地にまき、37°Cで一晩培養した。コロニーをピックアップし、アンピシリン入りLB液体培地で37°Cで一晩培養した後、Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) を用いて、ミディプレップを行い、TAZのレンチウイルス発現ベクターを得た。

7. レンチウイルス感染

得られたレンチウイルスベクターはpCMV-VSV-G-RSV-Rev及びpCAG-HIVgpと共にパッケージング細胞である293FT細胞にLipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いてトランスフェクションを行った。72時間後、レンチウイルスを含む培養上清を採取し、BEAS-2B細胞に感染させた。green fluorescent protein (GFP) 発現ベクターをコントロールとして使用し、形質導入効率はGFP陽性細胞をフローサイトメトリー (EPICS XL System II; Beckman Coulter) で測定することで確認した。

8. Immunoblot 解析

細胞はlysis buffer solution (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40) で溶解し、SDSゲル電気泳動を行った。蛋白はPVDFメンブレンに転写された。TBS-T buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)で希釈された、2% ECL Prime Blocking Reagent (GE Healthcare) で1時間室温でメンブレンのブロッキングを行った。1次抗体としてウサギ抗TAZ抗体 (#2149; Cell Signaling)をTBS-Tで1000倍に希釈し、4°Cで一晩反応させた。TBS-Tで洗浄後、2次抗体としてHRP標識ヤギ抗ウサギ抗体 (Cell Signaling)を

TBS-Tで20000倍に希釈し、室温1時間で反応させた。洗浄後ECL Prime Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)を用いてプロトコール通りに発光を検出した。なお、ローディングコントロールとして1次抗体：マウス抗 α -tubulin抗体 (Sigma-Aldrich、1000倍希釈)、2次抗体：ヤギ抗マウス抗体 (Cell Signaling、20000倍希釈)を同様に反応させ、等量の蛋白のローディングを確認した。写真はCCD camera (EZ-Capture MG; ATTO) を用いて撮影した。

9. 細胞増殖アッセイ

si TAZ または si NTC のトランスフェクションをした 48 時間後の A549、H441 細胞及びレンチウイルス感染 BEAS-2B 細胞を各々 7.5×10^3 /well、 5×10^4 /well、 2×10^4 /well ずつ quadruplicate で 12 ウェルプレートに撒き、2、4、6 日後に顕微鏡下に細胞数を血算板を用いてカウントした。

10. 細胞周期解析

9.と同様の細胞を 4×10^5 /well ずつ triplicate で 6 ウェルプレートに撒き、48 時間後に細胞を採取し、PBS で洗浄後、70% エタノールで 4°C 30 分固定した。0.1mg/mL RNaseA (Sigma-Aldrich) で 37°C 30 分反応させた。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (Sigma-Aldrich) で 4°C 5 分反応させた後、フローサイトメトリーで細胞周期を

解析した。

11. アポトーシスアッセイ

A549、H441細胞をsiRNAのトランスフェクション48時間後、 4×10^5 /wellずつ6ウェルプレートに撒いた。一晚培養後、24時間の血清飢餓によりアポトーシスを誘導した。Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioVision) を用いて、プロトコール通りに、annexin V陽性のアポトーシス細胞をフローサイトメトリーで検出した。

12. 腫瘍形成能アッセイ

6から8週のヌードマウスをCharles River Laboratories Japanから得た。 1×10^7 個のGFPまたはTAZ発現BEAS-2B細胞を100 μ L PBSに懸濁し、1mLシリンジでヌードマウスの背部に皮下注射した (10匹/group)。皮下注射6か月後に腫瘍を摘出した。推定体積は腫瘍の外形から長径と短径を計測し、長径 \times 短径 \times 短径 \times 1/2にて算出した。腫瘍はHE染色で細胞形態を観察した。実験動物であるマウスに無用な苦痛を与えないよう十分配慮した。実験は麻酔下で施行し、腫瘍の摘出時は深麻酔下で放血することにより安楽死を与えた。本マウス実験は東京大学動物実験実施規則及び東京大学動物実験実施マニュアルに準じて行った。

13. 遺伝子発現プロファイリング

si TAZまたはsi NTCをA549、H441細胞にトランスフェクションした48時間後、RNeasy mini kitを用いてRNAを採取した。GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) を用いてプロトコール通りにマイクロアレイ解析を行った。19734個の遺伝子発現データはGeneSpring GX software (Agilent Technologies) を用いて解析された。データセットはGene Expression Omnibus データベース (GSE51270) にアップロードした。

過去の研究も統合し、TAZ をレトロウイルスベクターにより発現させた MCF10A 細胞 (乳腺上皮細胞) において 2 倍以上発現が上昇した遺伝子群[16] と、A549、H441 細胞、さらに SW480 細胞 (大腸癌細胞株) [33] で si TAZ トランスフェクション後 0.67 倍以下に発現が減少した遺伝子群を統合し、最低でも 2 種類の細胞株でオーバーラップした 259 個の遺伝子を TAZ-regulated genes と定義した。

Gene ontology (GO) はフィッシャーの正確確率検定をもとにした Berriz *et al.* による手法で解析した (Funcassociate 2.0:The Gene Set Functionator; <http://llama.mshri.on.ca/funcassociate/>) [34]。

TAZ-regulated genes を gene set としてウプサラコホートのマイクロアレイデー

タをもとに Gene set enrichment analysis (GSEA) を行った[35]。ウプサラコホートは TAZ 発現レベル (202134_s_at) のメディアンで TAZ 高発現群、低発現群の 2 群に、また、生存期間のメディアンで予後不良群、予後良好群の 2 群に分けられた。

14. 定量的 RT-PCR

6.と同様にtotal RNAを細胞から抽出し、SuperScript III Reverse Transcriptaseを用いてcDNAを合成した。定量的 reverse transcription (RT)-PCRは、Mx-3000P (Stratagene) を用いて、QuantiTect SYBR Green PCR ((Qiagen)でプロトコールに沿って行った。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をサンプル間のcDNA量の変動を補正するための内部コントロールとして用いた。PCRで得られたアンプリコンについては、解離曲線とアガロースゲル電気泳動とにより、各ターゲットを目的として作成したプライマーに対する特異的なPCR産物であることを確認した。用いたプライマーを以下に示す。

Gene

AREG	Forward (5' to 3')	CGTGTCCCAGAGACCGAGTT
	Reverse (5' to 3')	AGGTCCAATCCAGCAGCATAATG

EREG	Forward (5' to 3')	CGTGTGGCTCAAGTGTC AAT
	Reverse (5' to 3')	TGGAACCGACGACTGTGATA
NRG1	Forward (5' to 3')	ATGTGTCTTCAGAGTCTCCCAT
	Reverse (5' to 3')	TGGACGTA CTGTAGAAGCTGG
DKK1	Forward (5' to 3')	TAGCACCTTGGATGGGTATT
	Reverse (5' to 3')	ATCCTGAGGCACAGTCTGAT
CCND1	Forward (5' to 3')	GATGCCAACCTCCTCAACGA
	Reverse (5' to 3')	CACTTCTGTTCCCTCGCAGACC
CCND3	Forward (5' to 3')	GACCATCGAAAACTGTGC
	Reverse (5' to 3')	ACAGAGGGCCAAAAAGGTCT
ANKRD1	Forward (5' to 3')	GCCTACGTTTCTGAAGGCTG
	Reverse (5' to 3')	GTGGATTCAAGCATATCACGGAA
SPDEF	Forward (5' to 3')	CCTCAAGGAGTTGCTACTCAAG
	Reverse (5' to 3')	CTGGGAGATGTCTGGCTTCC
ROR1	Forward (5' to 3')	ACCGCACCGTCTATATGGAGTCT
	Reverse (5' to 3')	GCATAGTGGCACAGGGAAGG
TGFB R1	Forward (5' to 3')	GGTCTTGCCCATCTTCACAT
	Reverse (5' to 3')	CACTCTGTGGTTTGGAGCAA

SMAD5	Forward (5' to 3')	CTTCCACCAGCCCAACAAC
	Reverse (5' to 3')	TCATAGGCAACAGGCTGAAC
RASSF2	Forward (5' to 3')	AAGGGGTGGAGAGTGATATGAAGAG
	Reverse (5' to 3')	AGGGACGTTTGGTGGCTGTAGT
GAPDH	Forward (5' to 3')	GGTGAAGGTCGGAGTCAACGGA
	Reverse (5' to 3')	GAGGGATCTCGCTCCTGGAAGA

15. ELISA

A549細胞にsiRNAのトランスフェクションをした48時間後、 1.5×10^5 /wellずつ triplicateで6ウェルプレートに撒いた。その48時間後、無血清培地に交換し、さらに48時間培養した後、培養上清を採取した。レンチウイルス感染BEAS-2B細胞は 1.5×10^5 /wellずつ6ウェルプレートに撒き、epidermal growth factor (EGF)を除いた培地で48時間培養した後、培養上清を採取した。Human Amphiregulin DuoSet (R&D Systems) を用いて、プロトコールに従い、上清中のamphiregulin濃度を測定した。

16. EGFR-TKI への感受性

Cancer Cell Line Encyclopedia データベースから NSCLC 細胞株の EGFR tyrosine

kinase inhibitors (EGFR-TKIs)を含む複数の抗癌剤に対する 50%阻害濃度 (IC50) 及び遺伝子発現マイクロアレイデータから TAZ 発現量に関するデータを得た。IC50 値のメディアンで NSCLC 細胞株を薬剤感受性群、抵抗群の 2 群に分け、2 群間の TAZ 発現量を Wilcoxon rank sum test で比較した。

17. 統計解析

結果は平均±標準誤差 (SEM) で示した。実験は独立して3回行い、代表的なデータを図に示した。2群間の比較にはStudent's *t*-testまたはWilcoxon rank sum testを、3群間の比較にはanalysis of variance (ANOVA)、有意差があった場合にTukey Kramer posttestを用いた。解析ソフトはJMP version 9.0.3を使用した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

NSCLCにおけるTAZの発現と臨床パラメータとの相関

196人のNSCLC患者からなるアップサラコホートを用いて、TAZのNSCLCにおける発現解析を行った。Affymetrix U133 plus 2 arrayでNSCLC組織の遺伝子発現プロファイルが解析された。TAZのprobe setは3種類あり（202132_at、202133_at、202134_s_at）、互いに高い相関を認めた（ $\rho = 0.52-0.83$ ）。TAZの発現と臨床データとの相関を表1に示す。組織型では扁平上皮癌で、また若い年齢の患者群でTAZの発現は高かった（各々 $P = 0.002$ 、 $P = 0.011$ 、表1）。TAZ発現はEGFR遺伝子変異陽性群がEGFR/KRAS遺伝子変異陰性群よりも有意に低かった（ $P = 0.046$ 、図1）。

表1 ウプサラコホートにおけるTAZ発現（202134_s_at）と臨床病理学的パラメーター

Characteristics	TAZ gene expression		Total	P value
	High (n = 98)	Low (n = 98)		
Sex				0.197
male	40	49	89	
female	58	49	107	
Age at diagnosis				0.011
≤ 70	83	68	151	
> 70	15	30	45	
Smoking status				0.199
Current smoker	51	43	94	
Ex smoker	41	41	82	
Never smoker	4	10	14	
Missing data			6	
Stage at diagnosis				0.070
I	59	71	130	
II-IV	39	27	66	
Performance status				0.474
0	50	55	105	
1-4	48	43	91	
Histology				0.002
Squamous cell carcinoma	43	23	66	
Adenocarcinoma	41	65	106	
Large cell carcinoma/NOS ¹	14	10	24	

¹NOS = NSCLC not otherwise specified.

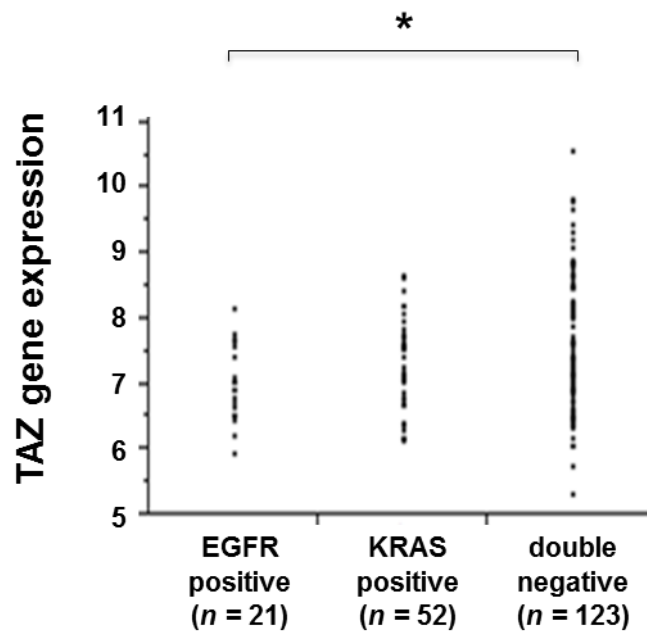


図1 EGFRまたはKRAS遺伝子変異とTAZ発現との相関

ウブサラコホートにおいて、EGFR遺伝子変異陽性群、KRAS遺伝子変異陽性群、EGFR/KRAS遺伝子変異陰性群の3群間でTAZ発現量（probe set : 202134_s_at）を比較した。TAZ発現はEGFR遺伝子変異陽性群がEGFR/KRAS遺伝子変異陰性群よりも有意に低かった（ $P = 0.046$ ）。*: $P < 0.05$ (ANOVA with Tukey *post hoc* test)

その他の臨床パラメーター（性別、喫煙歴、臨床病期、performance status）とTAZ発現との相関は認めなかった（表1）。

次に遺伝子コピー数とTAZ発現との相関を調べた結果、3種類のprobeいずれもTAZ遺伝子locusにあたる部分の遺伝子コピー数とTAZのmRNA発現レベルとの高い相関を認めた（図2）。

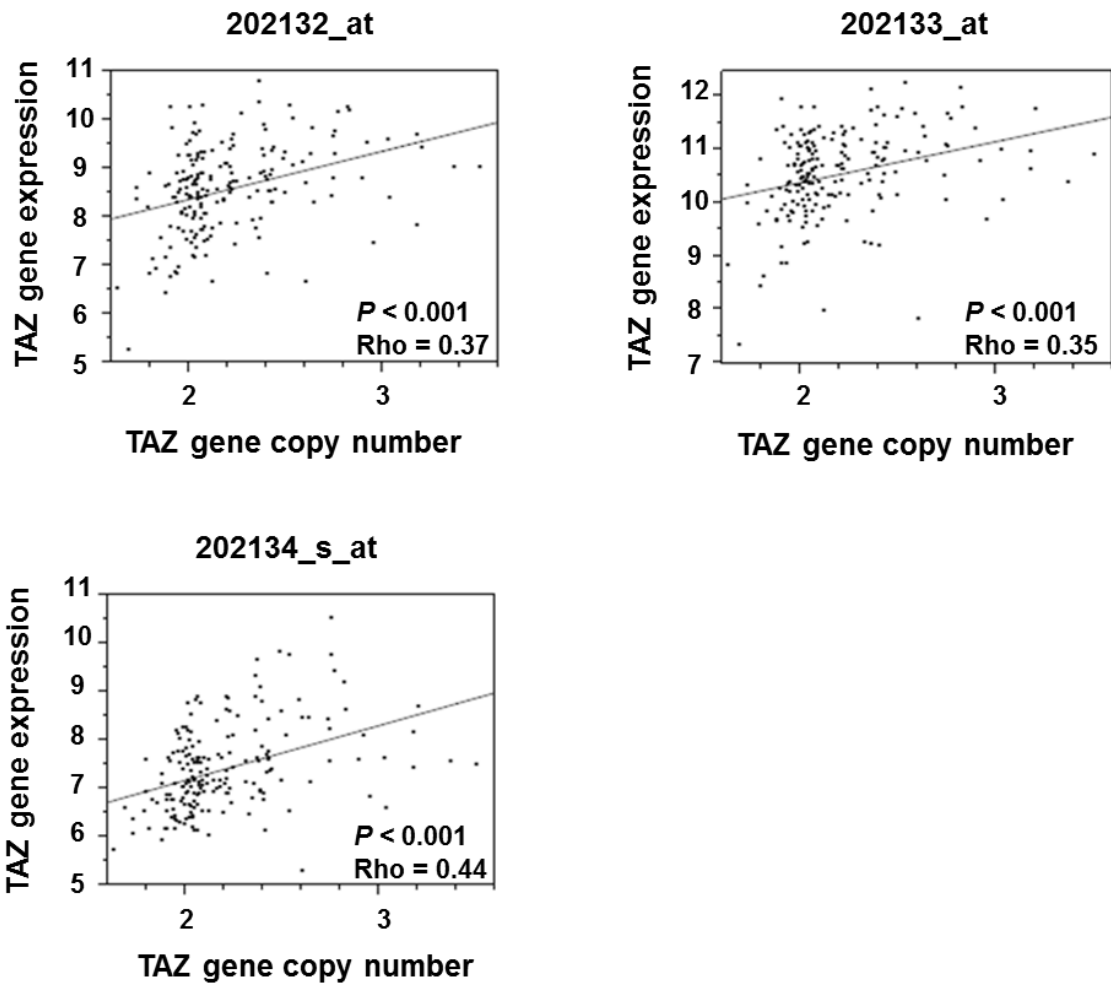


図2 TAZ遺伝子コピー数と遺伝子発現レベルとの相関

ウブサラコホートにおいて、Affymetrix Gene Chip Mapping 250K Nsp I arraysを用いて解析されたTAZ遺伝子locusの遺伝子コピー数とTAZ発現量（probe set: 202132_at, 202133_at, 202134_s_at）の相関を解析した。TAZの遺伝子コピー数とmRNA発現レベルとの高い相関を認めた。Spearman correlation coefficient (rho) 及びP値を示す。

生存解析にて、TAZの3つのprobe setのうちの1つである202134_s_atにおいて、単変量Cox回帰モデルでTAZ高発現と短い生存期間との有意な相関を認めた（ハザード比 HR = 1.25; confidence interval (CI), 1.04-1.50; $P = 0.021$ ）。他の2種類のprobeでは両者の相関は見られなかった（202132_at, $P = 0.489$; 202133_at, $P = 0.339$ ）。probe set 202134_s_atは、他の臨床上重要なパラメーターである、病期、performance status、年齢でadjustした多変量Cox回帰モデルにおいても有意な相関は保たれていた（HR = 1.24; CI, 1.02-1.50; $P = 0.035$ ）。

probe set 202134_s_atの予後との相関はさらにメタ解析で調べられた。公共データベースから得られる全部で9つのNSCLCのマイクロアレイデータを用いたメタ解析の結果、TAZの高発現と不良な予後との相関を認めた（図3a、HR = 1.27; CI, 1.08-1.51; $P = 0.005$ ）。この予後との相関は肺腺癌のみで解析すると特に顕著に見られた（図3b、HR = 1.40; CI, 1.21-1.62; $P < 0.001$ ）。扁平上皮癌のみでの解析では有意差は認められなかった（HR = 1.04; CI, 0.89-1.21; $P = 0.618$ ）。

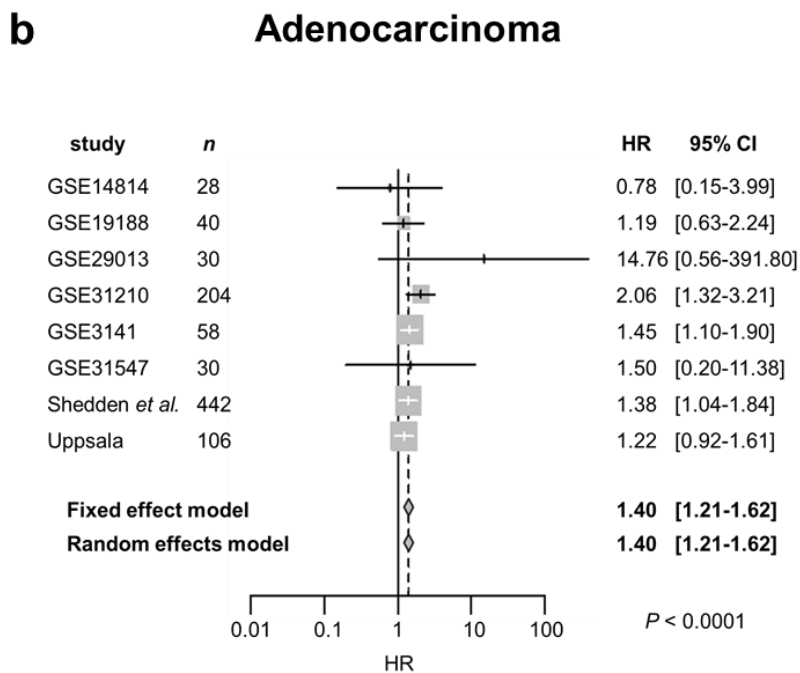
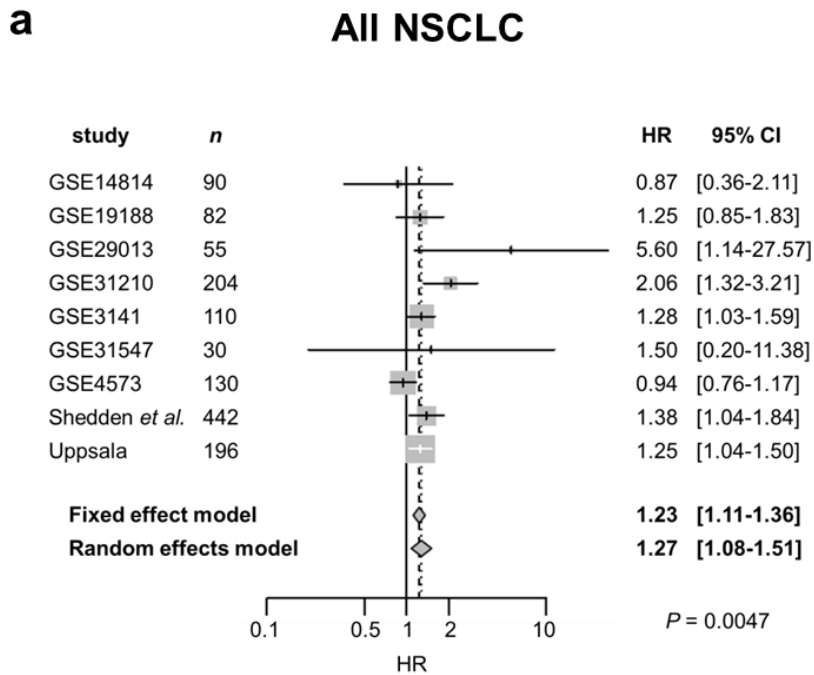


図3 TAZ発現と生存期間との関連（メタ解析）

(a) 全ての組織型を含む、(b) 腺癌のみ

公共データベースから得られる全部で9つのNSCLCのマイクロアレイデータを用いて、メタ解析を行った。その結果、TAZの高発現と不良な予後との相関を認めた。この相関は肺腺癌のみで解析すると特に顕著に見られた。

NSCLCにおけるTAZの蛋白発現

*in situ*での蛋白レベルでのTAZの発現解析をするため、355例のNSCLCからなる組織マイクロアレイを用いて免疫染色を行った。そのうち345例のNSCLCで評価可能であった。正常肺では、肺胞上皮細胞、気管支上皮細胞、さらには血管内皮細胞、線維芽細胞において細胞核優位にTAZが発現していた（図4）。一方、肺癌細胞は、組織型に関わらず、強い陽性から陰性まで様々な染色の強さが見られた（図5a-c）。リンパ球におけるTAZの発現はほとんど認めなかった（図5b）。

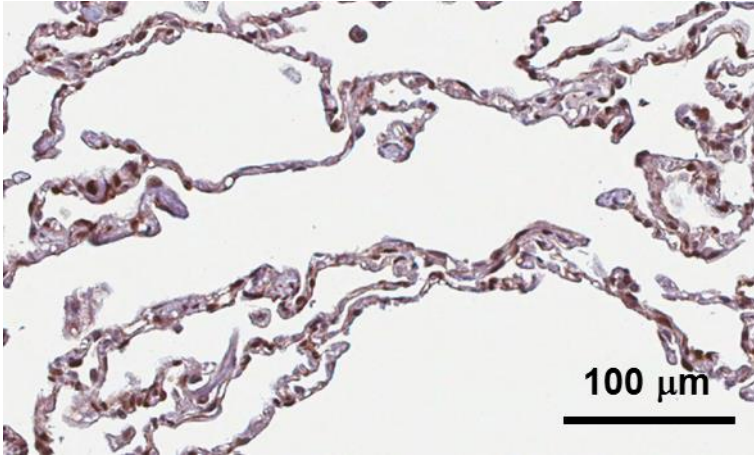


図4 正常肺組織におけるTAZ発現

正常肺組織を用いてTAZの免疫組織染色を行った。代表的な免疫染色の写真を示す。肺胞上皮細胞において細胞核優位のTAZ発現を認めた。

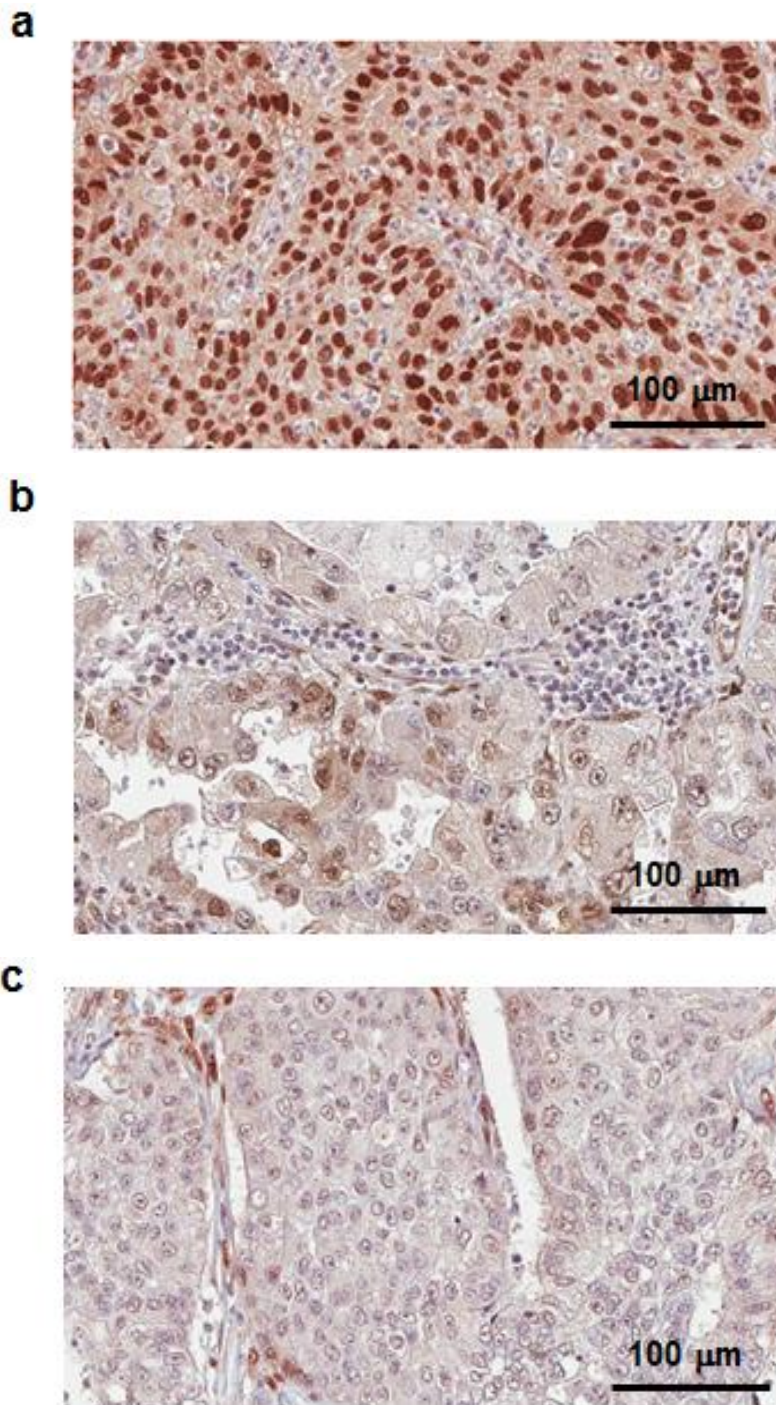


図5 NSCLC組織におけるTAZ蛋白発現

ウブサラコホートにおいて、肺癌組織を用いてTAZの免疫組織染色を行った。肺癌は様々な強さの染色を示した。(a) 強陽性、(b) 弱陽性、(c) 陰性。(b)では間質に存在するリンパ球はほとんど染まっておらず、(c)では線維芽細胞が核優位に染まっている。

免疫染色のスコアは同一サンプルから得られたマイクロアレイによる遺伝子発現レベルと有意に相関していた (図6)。

ウプサラコホートを染色スコアのメディアン値でTAZ高発現群と低発現群の2群に分けて解析をすると、蛋白レベルでのTAZの発現は扁平上皮癌で高い傾向にあった (表2)。EGFRまたはKRAS遺伝子変異ステータス及びその他の臨床パラメーターとTAZ発現との相関は認められなかった。

mRNAレベルでの解析結果と同様に、蛋白レベルでもTAZの高発現と不良な予後との相関を認めた(表3、左：単変量解析、HR = 1.40, CI 1.06-1.82, $P = 0.019$ 、右：多変量解析、HR = 1.34, CI 1.01-1.76, $P = 0.040$)。図7に両群のKaplan-Meier分析の結果を示す。50%生存期間の差は13か月であった。

遺伝子コピー数とTAZ蛋白発現レベルとの相関は、mRNAレベルで見られたのと同様に、有意な相関を認めた ($\rho = 0.17$, $P = 0.025$)。従って、TAZ発現は少なくとも部分的には遺伝子コピー数変化で規定されることが示された。遺伝子コピー数の大小で196例のNSCLC患者を2群に分けると、高コピー数の群で予後が悪い傾向にあったが、有意差は認めなかった ($P = 0.203$)。

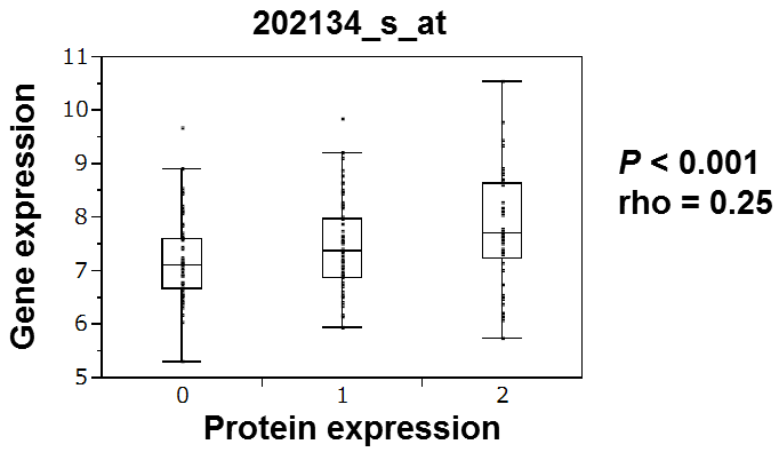
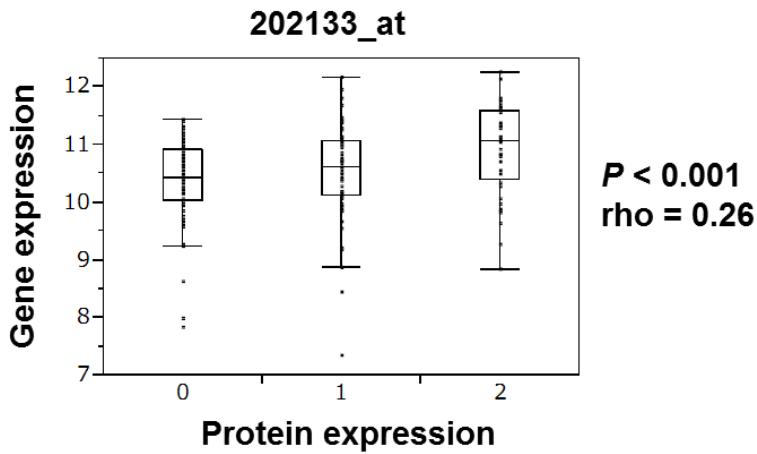
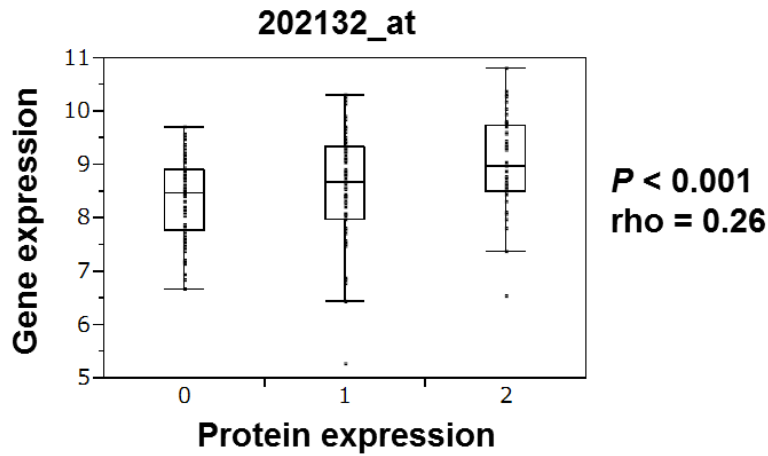


図6 TAZの蛋白発現レベルと遺伝子発現レベルとの相関
 ウプサラコホートにおいて、TAZの免疫染色のスコアと、同一サンプルから得られたマイクロアレイでのTAZ遺伝子発現レベルとの関係を示す。3つのprobe set いずれにおいても、両者は有意に相関していた。
 蛋白発現レベル (0, 染色スコア 0-3; 1, 染色スコア 4-6; 2, 染色スコア 7-9)。
 The middle bar, メディアン; box, inter-quartile range。

表2 ウプサラコホートの組織マイクロアレイにおけるTAZ蛋白発現と臨床病理学的パラメーター

Characteristics	TAZ protein expression		Total	P value
	High (n = 96)	Low (n = 249)		
Sex				0.847
male	52	132	184	
female	44	117	161	
Age at diagnosis				0.325
≤ 70	61	172	233	
> 70	35	77	112	
Smoking status				0.262
Current smoker	41	120	161	
Ex smoker	42	109	151	
Never smoker	12	19	31	
Missing data			2	
Stage at diagnosis				0.378
I	68	164	232	
II-IV	28	85	113	
Performance status				0.500
0	47	132	179	
1-4	49	117	166	
Histology				0.052
Squamous cell carcinoma	42	76	118	
Adenocarcinoma	47	143	190	
Large cell carcinoma/NOS ¹	7	30	37	

¹NOS = NSCLC not otherwise specified.

表3 345例のNSCLC患者の単変量及び多変量Cox回帰モデル（生存解析）

TAZ：高発現（染色スコア 7-9） vs. 低発現（染色スコア 0-6）

stage：II-IV vs. I

performance status：I-III vs. 0

年齢：>70 vs. ≤70 years

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	<i>P</i> value	HR (95% CI)	<i>P</i> value
TAZ	1.40 (1.06-1.82)	0.019	1.34 (1.01-1.76)	0.040
Stage	1.59 (1.21-2.06)	<0.001	1.67 (1.28-2.17)	<0.001
Performance status	1.79 (1.38-2.31)	<0.001	1.68 (1.30-2.18)	<0.001
Age	1.63 (1.25-2.12)	<0.001	1.52 (1.16-1.99)	0.003

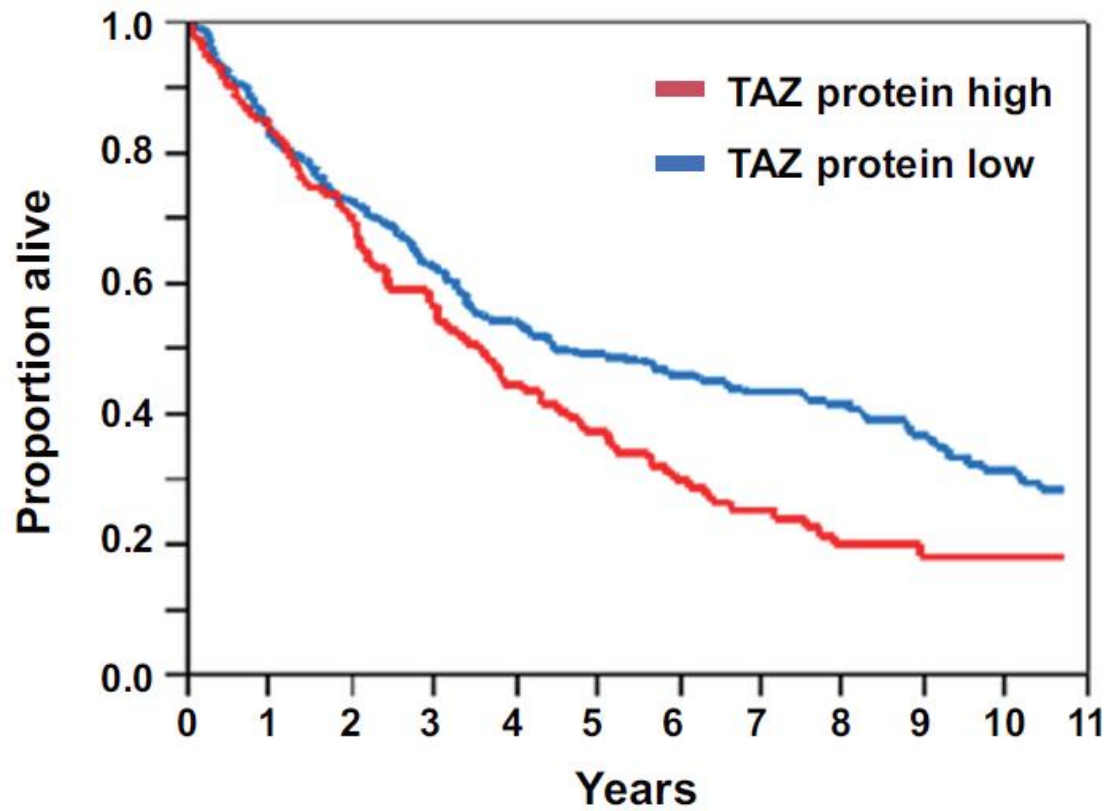


図7 Kaplan Meier 生存曲線

345人の肺癌患者を免疫染色スコアのメディアンでTAZ高発現群と低発現群とに分け、 P 値はログランク検定で計算した。TAZ高発現群で生存期間がより短かった。

細胞株を用いた*In vitro*でのTAZの機能解析

TAZ loss-of-functionモデルとして、内因性TAZ発現を有するヒト肺腺癌細胞株、A549及びH441細胞のTAZ発現をsiRNAでノックダウンした系を、さらにTAZ gain-of-functionモデルとして、内因性TAZ発現レベルが低いヒト気管支上皮細胞株、BEAS-2B細胞にレンチウイルスベクターを用いてTAZの過剰発現を起こす系を構築した。コントロールとして用いたGFP導入細胞において、フローサイトメトリー分析によりGFP発現を95%の細胞に認め、高い形質導入率を確認した。Immunoblotの結果を図8に示す。siRNAのトランスフェクション、レンチウイルスによる形質導入のいずれも細胞形態への変化は来さなかった。

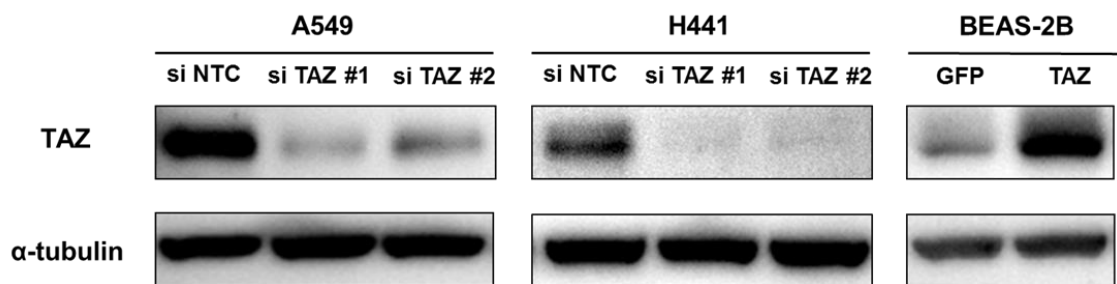


図8 TAZのimmunoblot解析

A549、H441細胞にはsiRNAをトランスフェクションし、BEAS-2B細胞にはレンチウイルスベクターによりTAZ遺伝子の形質導入を行い、immunoblotにより各々TAZノックダウン及び過剰発現を確認した。 α -tubulinはローディングコントロールとして用いた。si NTC : negative controlのsiRNA、si TAZ : TAZのsiRNA。

まず、TAZの細胞増殖における役割を調べた。A549及びH441細胞において、TAZノックダウンは細胞増殖を抑制し、一方、BEAS-2B細胞において、TAZ過剰発現は細胞増殖を促進した（図9）。

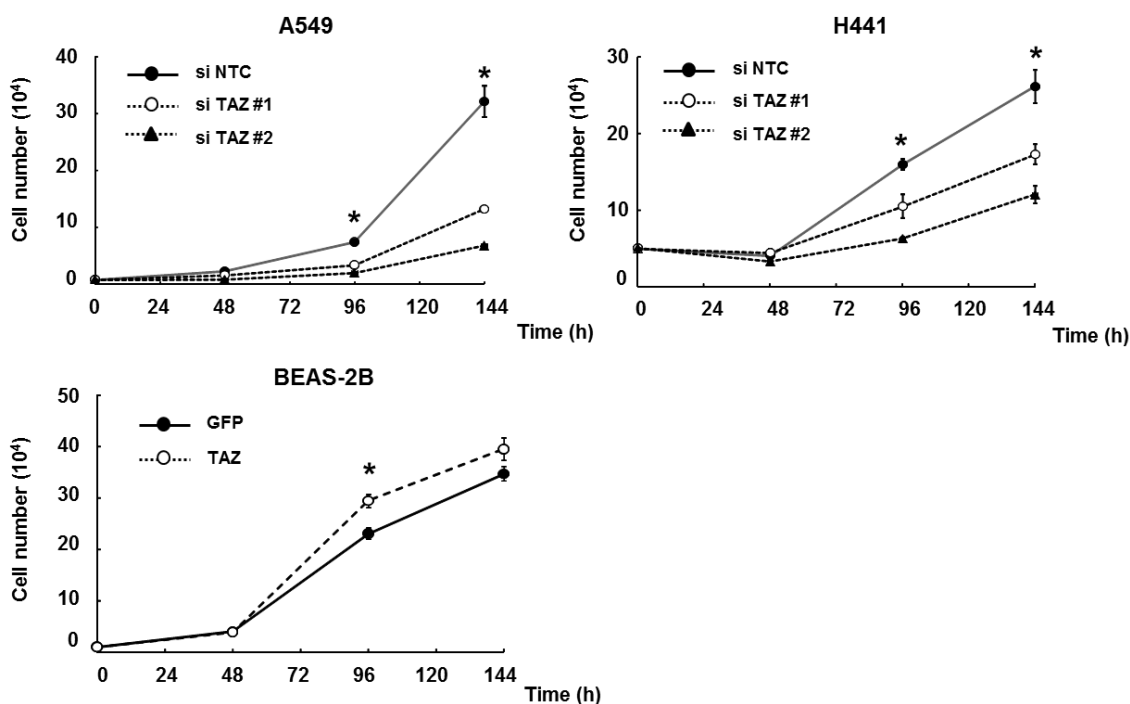


図9 TAZの細胞増殖に与える影響

siRNAでTAZ ノックダウンしたA549、H441細胞、レンチウイルスベクターでTAZを強制発現させたBEAS-2B細胞をまき (day0)、day2、4、6に細胞数をカウントした。A549及びH441細胞では、TAZノックダウンにより細胞増殖が抑制され、一方、BEAS-2B細胞では、TAZ過剰発現により細胞増殖が促進した。*: $P < 0.05$ (Student's *t*-test、A549、H441細胞 : si NTC vs. si TAZ #1 or #2, BEAS-2B細胞 : GFP vs. TAZ)

次に、TAZの細胞周期に与える影響を調べた。細胞増殖の解析結果に対応して、A549細胞においてTAZノックダウンはG0/G1期の細胞を増やし（図10a）、BEAS-2B細胞においてTAZ過剰発現はG1期からS期への移行を促進した（図10b）。

A549

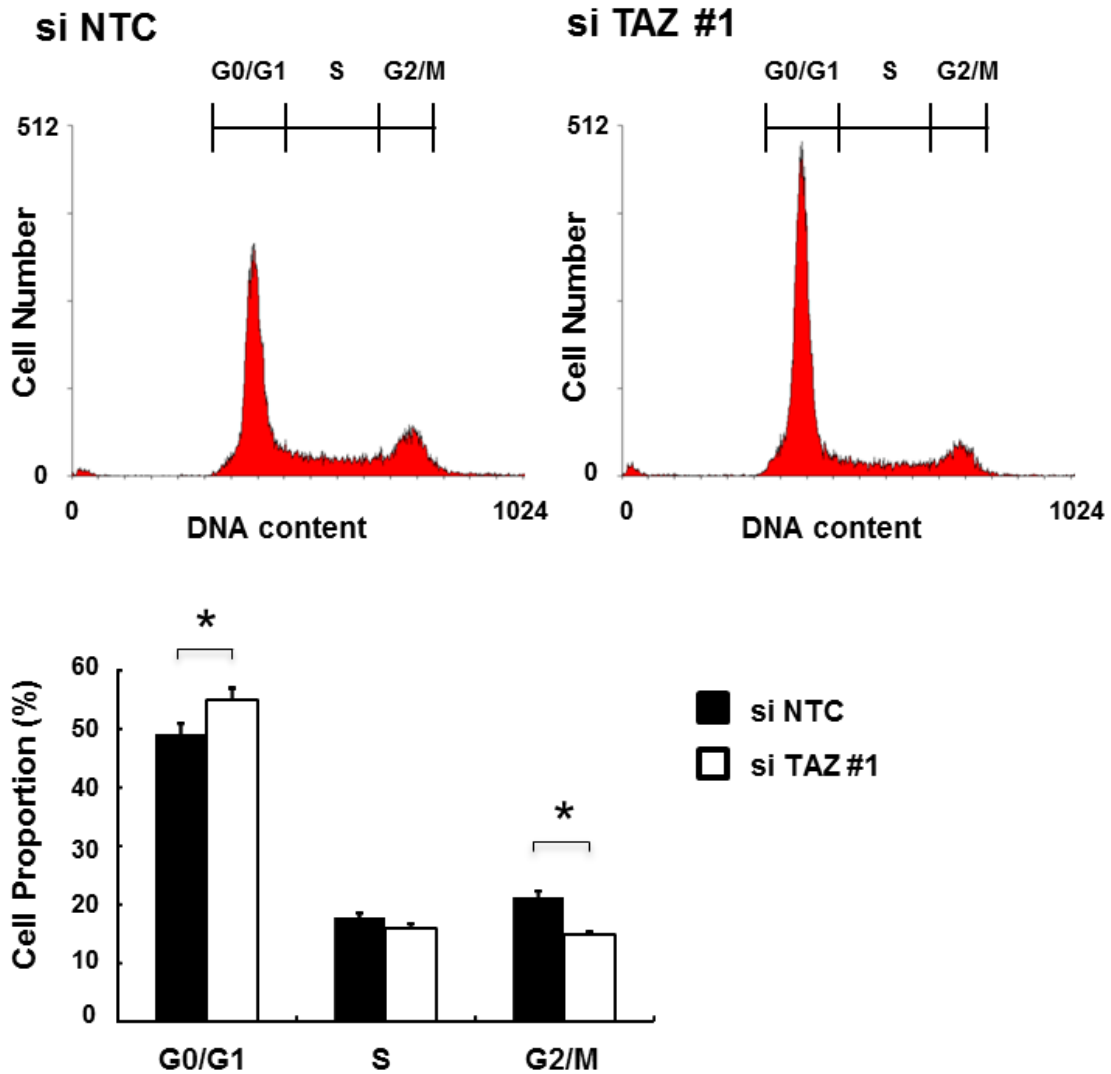


図10 (a) A549細胞におけるTAZ発現の細胞周期に与える影響 (*: $P < 0.05$, Student's t -test)

si TAZ または si NTC のトランスフェクションをした 48 時間後の A549 細胞を 4×10^5 /well ずつ triplicate で 6 ウェルプレートに撒き、48 時間後に細胞を採取し、PBS で洗浄後、70% エタノールで 4°C 30 分固定した。0.1mg/mL RNaseA で 37°C 30 分反応させ、propidium iodide で 4°C 5 分反応させた後、フローサイトメトリーで細胞周期を解析した。TAZ ノックダウンにより G0/G1 期の細胞の割合が増え、G2/M 期の細胞の割合が減った。

BEAS-2B

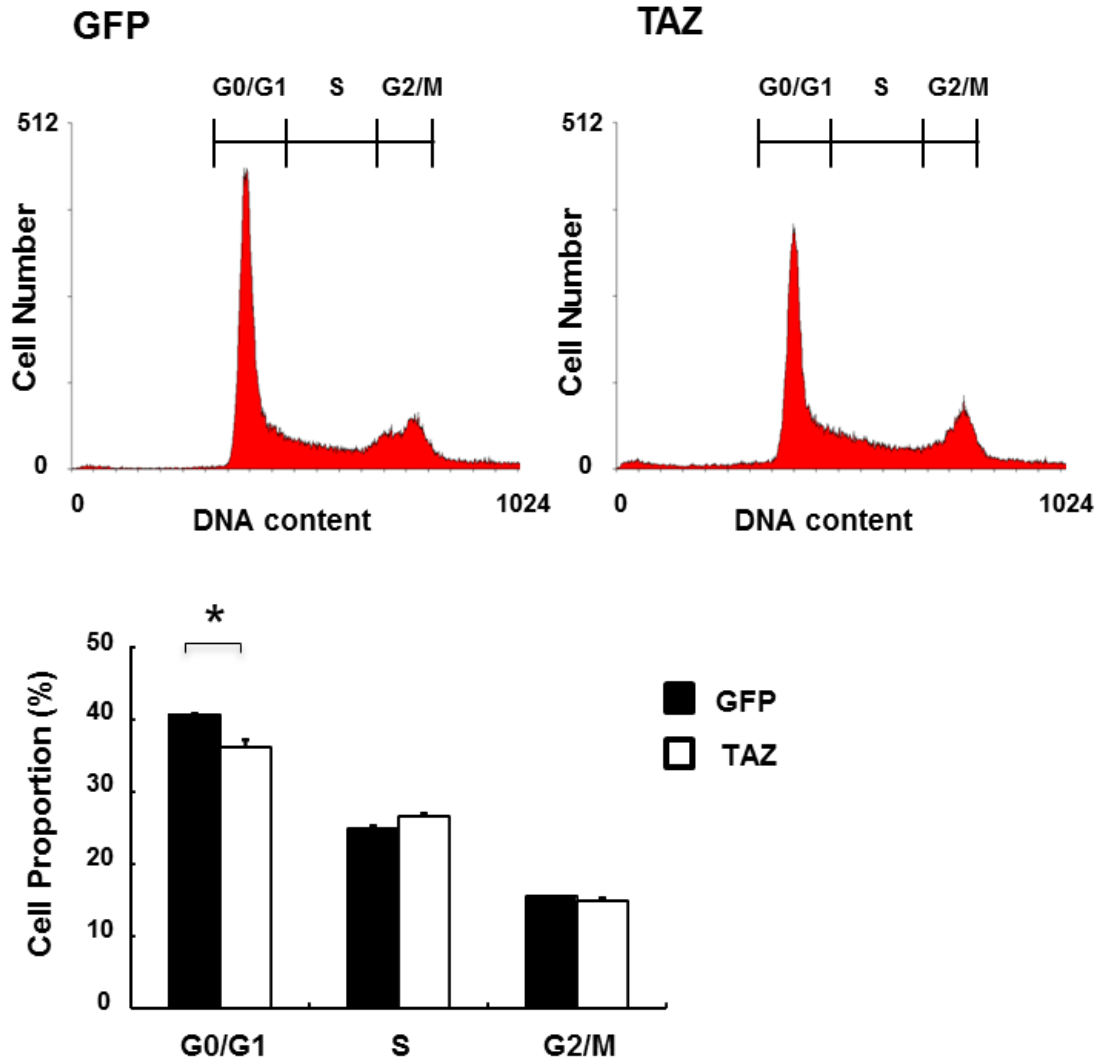


図10 (b) BEAS-2B細胞におけるTAZ発現の細胞周期に与える影響(*: $P < 0.05$ 、Student's *t*-test)

レンチウイルス感染BEAS-2B細胞で (a) と同様の実験を行った。TAZ過剰発現によりG1期からS期への移行が促進した。

次にTAZのアポトーシスにおける関与を調べるために、siRNAをトランスフェクションしたA549及びH441細胞において24時間血清飢餓によりアポトーシスを誘導し、annexin-V陽性アポトーシス細胞を検出した。その結果、A549、H441細胞いずれにおいてもTAZ ノックダウンによりアポトーシス誘導が促進された(図11)。これらの実験結果からTAZは細胞増殖及び生存を促進することが示唆された。

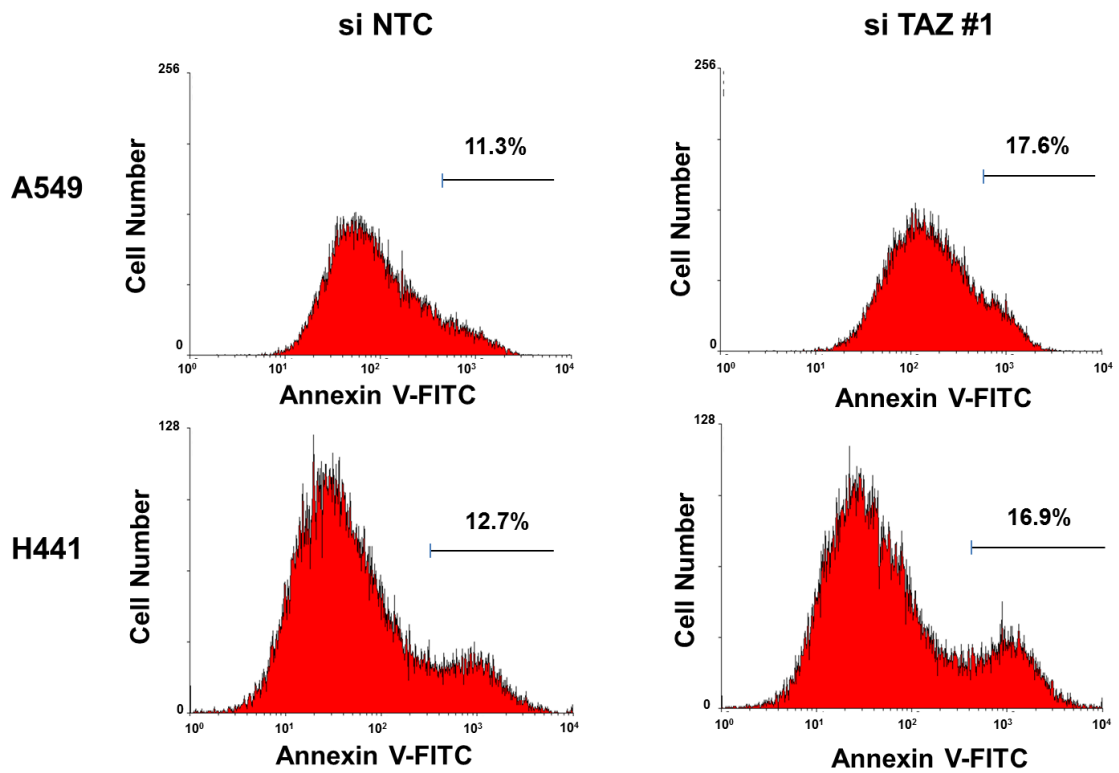
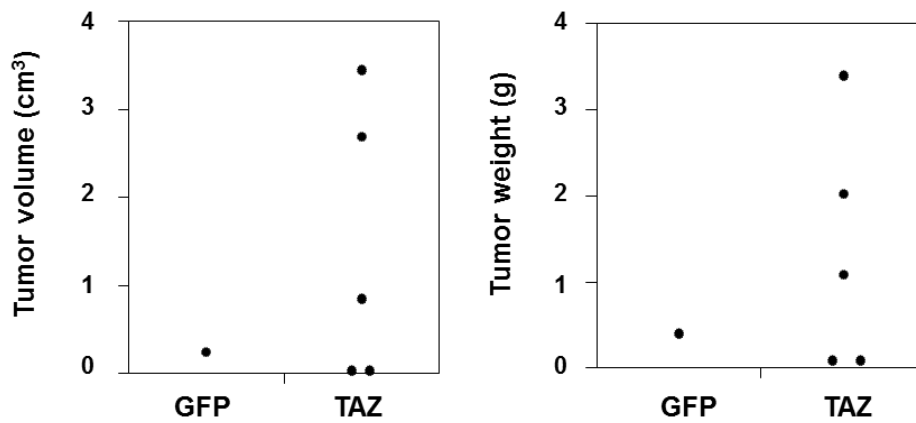


図11 TAZのアポトーシスにおける役割

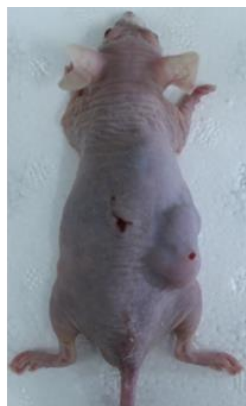
A549、H441細胞をsiRNAのトランスフェクション48時間後、 4×10^5 /wellずつ6ウェルプレートに撒いた。一晚培養後、24時間の血清飢餓によりアポトーシスを誘導し、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kitを用いて、annexin V陽性アポトーシス細胞をフローサイトメトリーで検出した。A549、H441細胞いずれにおいてもTAZノックダウンによりアポトーシス誘導が促進された。

マウスモデルにおけるTAZの腫瘍形成能

*in vivo*でTAZの腫瘍形成における役割を調べるために、ヌードマウスに、レンチウイルスベクターでTAZまたはGFPが形質導入されたBEAS-2B細胞を皮下注射した。6か月後、TAZ導入群では10匹中5匹の腫瘍形成を認める一方、GFP導入群では1匹のみ腫瘍形成を認めた(図12)。HE染色では両方で形態の差は認めず、どちらも高率なmitosisを含む典型的な癌の病理学的特徴を有していた(図13)。



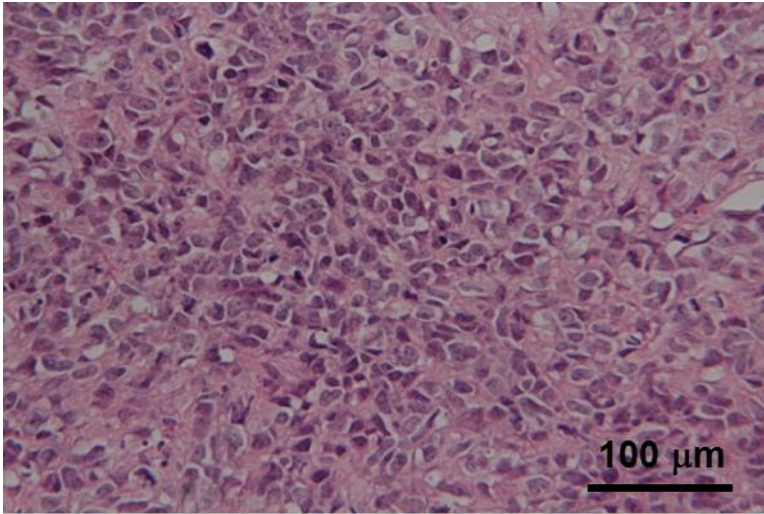
BEAS-2B GFP



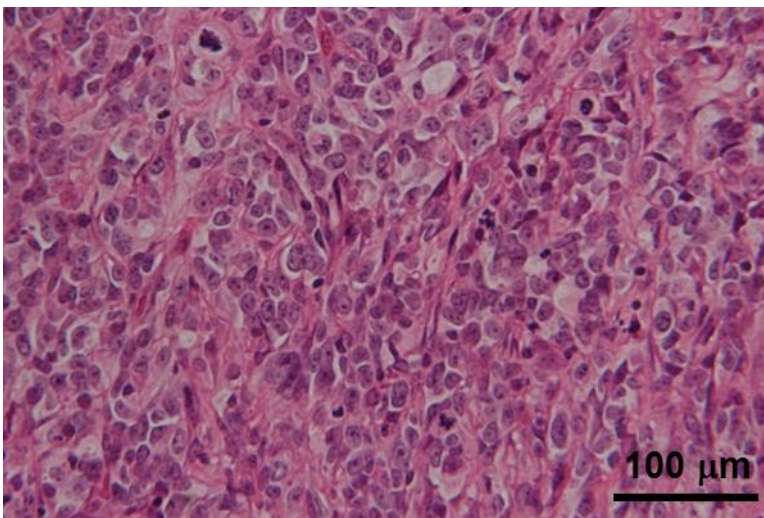
BEAS-2B TAZ

図12 xenograft mouse model

GFPまたはTAZを過剰発現させたBEAS-2B細胞をヌードマウスに皮下注射し、6か月後の腫瘍形成能を調べた。TAZ導入群では10匹中5匹の腫瘍形成を認める一方、GFP導入群では1匹のみ腫瘍形成を認めた。写真は代表的なヌードマウスを示す。



BEAS-2B GFP



BEAS-2B TAZ

図13 xenografted tumorのHE染色

GFPまたはTAZを過剰発現させたBEAS-2B細胞をヌードマウスに皮下注射し、6か月後に形成されたxenografted tumorを摘出し、HE染色を行った。両者で形態の差は認めず、どちらも典型的な癌の病理学的特徴を有していた。代表的な染色像を示す。

肺癌細胞株における遺伝子発現プロファイリング

肺癌細胞におけるTAZの標的遺伝子を調べるために、siRNAをトランスフェクションしたA549細胞において、マイクロアレイ解析をもとに遺伝子発現プロファイリングを行った。TAZノックダウンによりsi NTC群と比べTAZ転写産物は20%まで発現が低下した。TAZノックダウンにより1.5倍以上発現上昇した転写産物は227個、0.67倍以下に発現低下した転写産物は131個あった。気道上皮細胞の分化、生存、増殖にかかわると考えられている主要な遺伝子を図14、表4に示す。

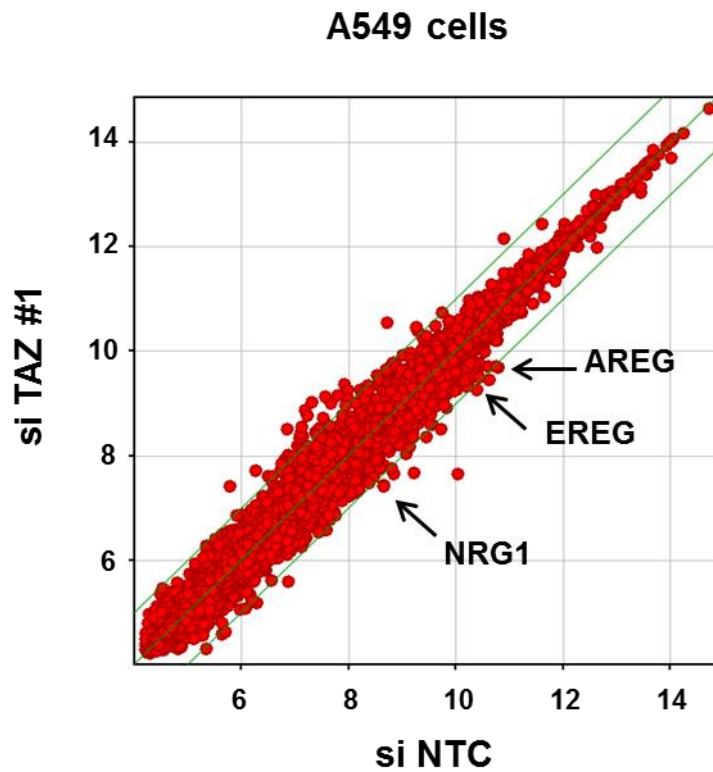


図14 A549細胞におけるマイクロアレイ解析のScatter plot
 縦軸にsi TAZ #1を、横軸にsi NTCをトランスフェクションしたA549細胞の遺伝子発現量を表したScatter plotを示す (AREG, amphiregulin; EREG, epiregulin; NRG1, neuregulin 1)。

表4 A549細胞においてTAZノックダウンにより発現量が変動した遺伝子

Gene symbol	Gene name	Fold change				Pathway involved
		Affymetrix chip	Quantitative RT-PCR		si TAZ#2	
			si TAZ#1	si TAZ#2		
AREG	amphiregulin	0.47	0.51	0.40	cell proliferation	
EREG	epiregulin	0.60	0.52	0.73	cell proliferation	
NRG1	neuregulin 1	0.66	0.53	0.56	cell proliferation	
DKK1	dickkopf homolog 1	0.66	0.39	0.45	Wnt signaling	
CCND1	cyclin D1	0.60	0.60	0.71	cell cycle	
CCND3	cyclin D3	0.56	0.64	0.77	cell cycle	
ANKRD1	ankyrin repeat domain 1	0.41	0.16	0.12	mechanotransduction	
SPDEF	SAM pointed domain containing ets transcription factor	1.61	4.8	3.1	cell differentiation	
ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	1.68	2.5	1.6	cell survival	
TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor 1	1.74	1.9	6.6	TGF-β signaling	
SMAD5	SMAD family member 5	2.09	2.7	2.3	TGF-β signaling	
RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2	1.54	1.9	1.4	apoptosis	

A549細胞と同様にH441細胞でもマイクロアレイ解析を行った結果、TAZノックダウンにより1.5倍以上発現が上昇した転写産物は69個、0.67倍以下に発現が減少した転写産物は138個あった。A549、H441細胞両者でTAZノックダウンにより0.67倍以下に発現が減少した転写産物は30個の遺伝子でオーバーラップしていた。さらに過去の研究や公共データベースのマイクロアレイデータを用いて、他の2つの細胞株でのマイクロアレイ解析の結果を統合し、「方法」で記載したように259個からなるTAZ-regulated genesを得た（表5）。これらの遺伝子の特徴づけるために、まずGO解析を行った。その結果、これらの遺伝子は細胞周期の制御という機能を持つ遺伝子が多くを占めることが分かった（表6）。

表5 TAZ-regulated genes

A549細胞、H441細胞、MCF10A細胞、SW480細胞のうち最低でも2種類の細胞株でオーバーラップした、TAZ依存的な発現変化を来した259個の遺伝子を示す。

AAK1	CTGF	HMGB1	NIP7	SAMHD1	WWTR1
ACSL3	CYR61	HMG2	NIPA2	SAR1B	XPOT
ADM	CYTH3	HSP90AA6P	NMD3	SCARB2	YKT6
ANKRD1	DCTN5	ICMT	NPIPL3	SDPR	YWHAH
ANKRD40	DDAH1	IGF2BP3	NPM1	SEC24A	ZFP36L2
ANLN	DEPDC1	IGFBP3	NR3C1	SERP1	ZFYVE20
ANP32E	DHFR	IPO11	NRG1	SERPINE2	ZNF252
AP1S3	DHX9	ITGA6	NT5E	SERPINH1	ZWILCH
AREG	DKK1	ITGB1BP1	NUP93	SH3RF1	ZWINT
ARHGAP19	DLEU2	KBTBD8	NUP98	SIAE	
ARNTL2	DNAJB4	KCTD5	NUSAP1	SKP2	
ATAD2	DNAJC1	KDEL3	OCRL	SLC12A2	
ATP13A3	DNAJC9	KIAA1147	ODC1	SLC16A6	
ATP7A	DTL	KIAA1524	PAFAH1B1	SLC2A14	
AXL	E2F8	KIF18A	PCGF6	SLC44A2	
B4GALT6	EARS2	KLHDC5	PCNA	SMC1A	
BCL2L1	ECT2	KLHL7	PFAS	SMG7	
BRCA2	EFHD2	KLHL8	PGGT1B	SOCS2	
BRIP1	EIF2B2	LAMC2	PGM3	SPAG1	
BUB1	EIF4B	LANCL1	PHF20L1	SRP72	
C13orf34	ENC1	LIN52	PI3	SRR	
C5orf30	ERLIN1	LMAN1	PIP5K1B	SSR3	
CALM1	ETNK1	LMNB1	PKN2	TAGLN	
CBFB	EXOC6	LSM14A	PLK2	TAP2	
CCDC123	EXPH5	LYN	PMAIP1	TFDP1	
CCND1	FAM111B	MAN2A1	POLE2	TGM2	
CCND3	FBXL5	MAP4K3	POP5	TICAM2	
CCNE2	FBXO45	MAPKAP1	PPIL5	TIMM17A	
CDCA4	FGD6	MAPRE1	PPM1A	TIPIN	
CDCA7	FGFR1OP	MCM10	PPP3R1	TMED2	
CDCA8	FH	MCM4	PRC1	TMEM168	
CDK1	FOSL1	MCM6	PRDX6	TMEM39A	
CENPA	GABPB2	MCM8	PRIM1	TMPO	
CENPI	GART	ME2	PRKAG2	TNFRSF12A	
CENPL	GAS5	MEST	PSAT1	TOM1L2	
CENPQ	GFPT1	MFAP3	PSPH	TOMM22	
CEP55	GINS2	MGAT2	PTAR1	TOR1AIP2	
CFLAR	GK5	MND1	PTPLB	TPM1	
CHAC2	GLS	MRPL15	PTS	TTC26	
CHCHD3	GPD2	MRPL19	PURB	TTF2	
COL4A1	GPR126	MRPL3	PUS7	TYMS	
COQ7	GPRC5A	MT1E	PUS7L	UBE2W	
CORO1C	GSTCD	MT1F	QSER1	UHMK1	
COX7B	GTF2A1	MT1G	RAB28	UHRF1	
CREM	H2AFV	MTHFD2	RAPH1	UPP1	
CRIM1	HCCS	MTPN	RBM25	USP10	
CSRP1	HDGFRP3	MTX3	RETSAT	USP38	
CST6	HIST1H2BC	NECAP1	RFC1	VANGL1	
CSTF2	HIVEP2	NEK6	RFC3	WDHD1	
CTDSP2	HMGA2	NETO2	RRN3	WDR33	

表6 TAZ-regulated genesのgene ontology解析

Rank	Name	Gene Ontology ID	<i>P</i> value
1	mitotic cell cycle	GO:0000278	3.462E-18
2	cell cycle process	GO:0022402	2.457E-15
3	cell cycle process	GO:0007049	2.563E-15
4	cell cycle phase	GO:0022403	1.932E-12
5	mitotic prometaphase	GO:0000236	3.464E-10
6	regulation of cell cycle	GO:0051726	6.886E-10
7	regulation of cell cycle process	GO:0010564	9.157E-10
8	M phase of mitotic cell cycle	GO:0000087	1.111E-9
9	M phase	GO:0000279	1.460E-9
10	cell cycle checkpoint	GO:0000075	9.838E-9

さらにこの遺伝子セットを用いて、ウブサラコホートにおいて、GSEAを行った結果、TAZ-regulated genesはTAZ高発現群で有意に発現が上昇していることが示唆された（図15）。また、同遺伝子セットは予後不良群で有意に発現が上昇していた（図16）。

Gene set: TAZ-regulated genes
TAZ-high vs. TAZ-low, $P = 0.002$

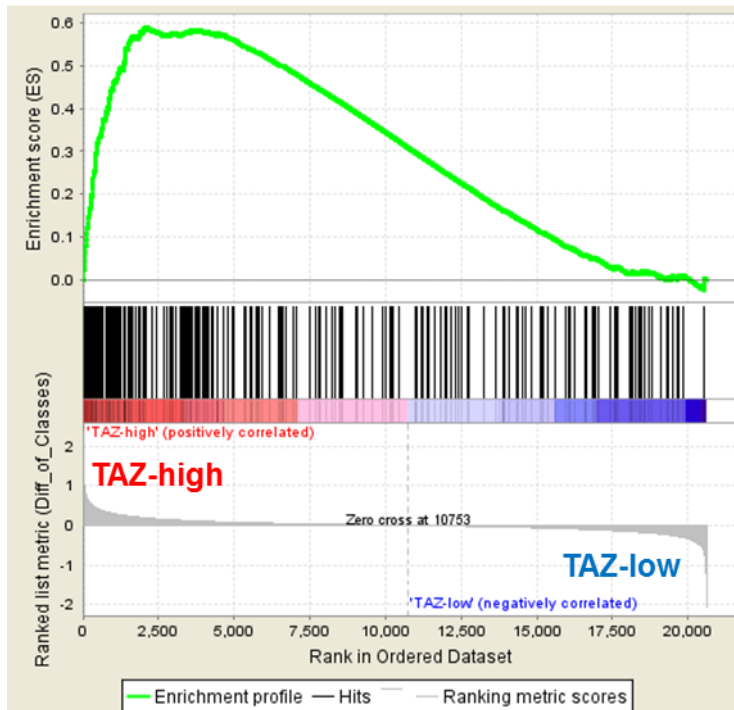


図15 TAZ-regulated genesを用いたGSEA (TAZ-high vs. TAZ-low)

ウブサラコホートにおいてTAZ発現量 (202134_s_at) によりTAZ高発現群、低発現群の2群に分け、TAZ-regulated genesを用いてGSEAを行った。TAZ-regulated genesはTAZ高発現群で有意に発現が上昇していた。赤色のバーはTAZ高発現群と、青色のバーはTAZ低発現群との相関を示す。相関の強さに応じてマイクロアレイ中の全遺伝子がランク付けされ (下部、gray figure)、用いたgene set中の遺伝子の中でどの位置に当たるかが示され (中部、黒色縦棒)、その密度に応じて、enrichment score (上部、緑色曲線) が描かれている。

Gene set: TAZ-regulated genes
poor prognosis vs. good prognosis, $P = 0.014$

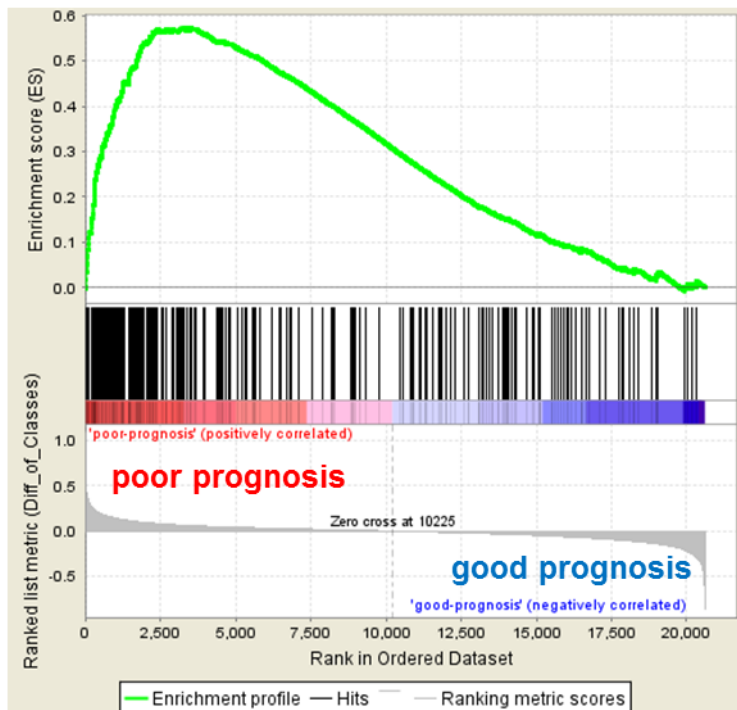


図16 TAZ-regulated genesを用いたGSEA (予後不良 vs. 予後良好)
ウブサラコホートにおいて生存期間のメディアンで予後不良群、予後良好群の2群に分け、TAZ-regulated genesを用いてGSEAを行った。TAZ-regulated genesは予後不良群で有意に発現が上昇していた。

TAZのErbBリガンド発現制御

マイクロアレイ解析でA549細胞におけるErbBリガンド（amphiregulin、epiregulin、neuregulin 1）がTAZノックダウンで発現低下を認めていたため、定量的RT-PCRでその結果を確認した（図17上）。BEAS2B細胞でもTAZ高発現によりErbBリガンド発現が誘導された（図17下）。TAZによるamphiregulin発現制御はELISAにより培養上清での蛋白レベルでも確認された（図18）。

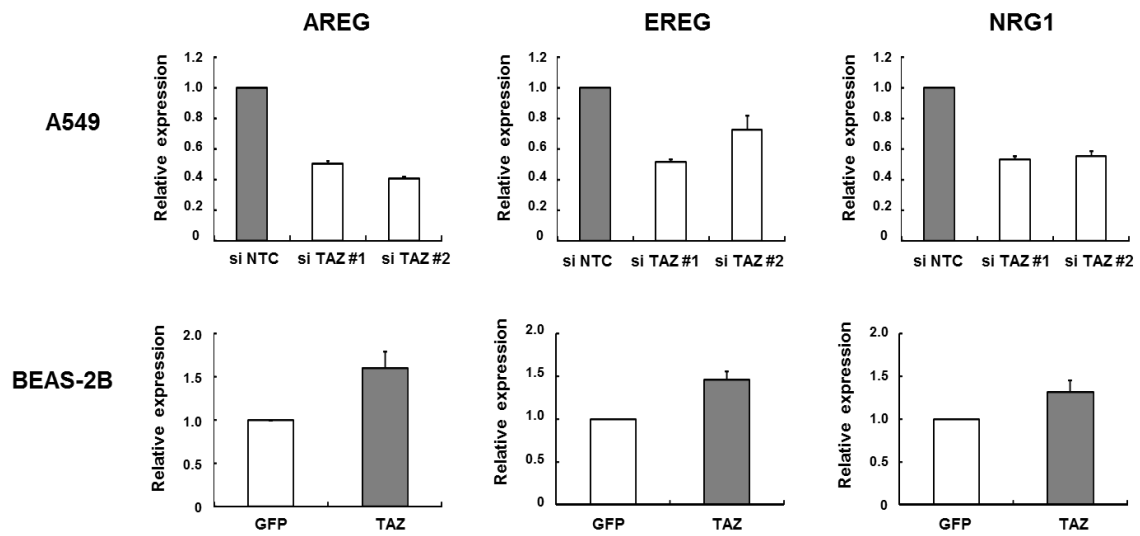


図17 TAZによるErbBリガンド発現制御 (mRNAレベル)

TAZをノックダウンしたA549細胞、GFPまたはTAZを強制発現させたBEAS-2B細胞におけるErbBリガンドの発現を定量的RT-PCRで調べた。いずれのErbBリガンドも、A549細胞において、TAZノックダウンにより発現が低下し、一方、BEAS-2B細胞において、TAZ過剰発現により発現は上昇した。

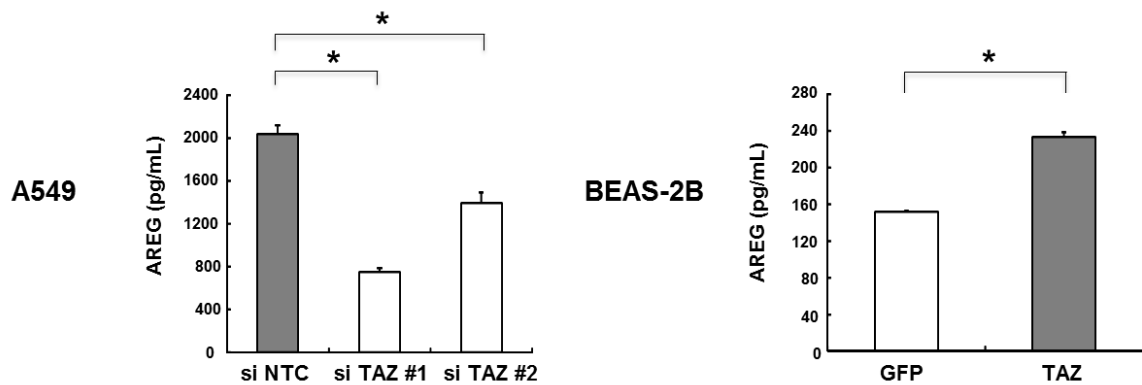


図18 TAZによるamphiregulin発現制御（蛋白レベル）

TAZをノックダウンしたA549細胞、GFPまたはTAZを強制発現させたBEAS-2B細胞におけるamphiregulinの発現をELISAで調べた。培養上清における、100万個の細胞当たりのamphiregulin濃度を示す。A549細胞において、TAZノックダウンによりamphiregulin濃度は低下し、一方、BEAS-2B細胞において、TAZ過剰発現によりamphiregulin濃度は上昇した。*: $P < 0.05$ 、Student's *t*-test

NSCLCにおけるTAZとErbBリガンド発現との相関

次に、NSCLCにおいてTAZとErbBリガンドの発現に相関が見られるかどうか調べた。公共データベースから得たNSCLC細胞株のマイクロアレイデータセット（GSE4127、GSE4824）において、図19、20に示す通り、両者の発現の相関を認めた（但し、GSE4127においてはneuregulin 1は、傾向のみで、有意差は認めなかった）。

さらに、amphiregulinに関しては、蛋白レベルでの相関を調べるために、ウブサラコホートのTMAを用いて免疫染色を行った。その結果、TAZ及びamphiregulin両者の染色が評価可能なNSCLC例は344例あり（図21）、両者の発現の有意な相関を認めた（表7、 $P < 0.001$ ）。amphiregulin陽性（染色スコア1以上）、陰性（染色スコア0）は各々172例ずつあり、両群間で生存期間に有意な差は認めなかった（単変量解析、HR = 0.97, CI 0.75-1.25, $P = 0.82$ 、AREG 陽性 vs. 陰性）。

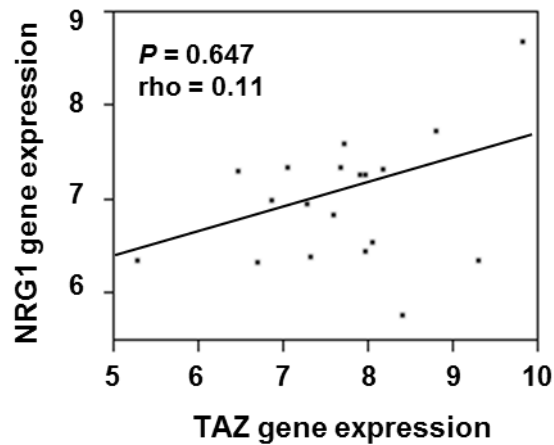
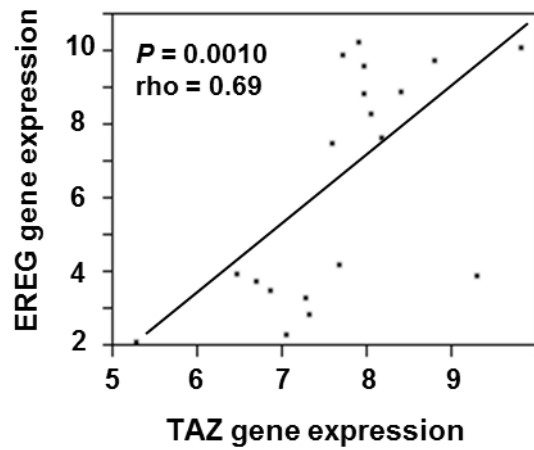
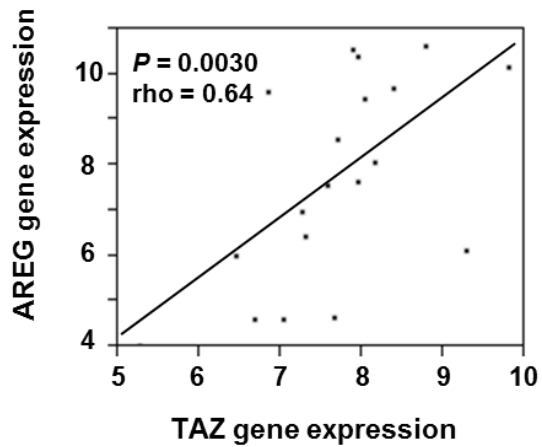


図19 NSCLC細胞株におけるTAZとErbBリガンド発現の相関 (GSE4127、 $n = 19$)
 公共データベースから得たNSCLC細胞株のマイクロアレイデータセットを用いて、TAZ遺伝子発現とErbBリガンド遺伝子発現との相関を調べた結果、両者の発現レベルの正の相関を認めた。Spearman correlation coefficient (ρ) 及び P 値を示す (Probe set, TAZ: 202132_at; amphiregulin: 205239_at; epiregulin: 205767_at; neuregulin 1: 208241_at)。

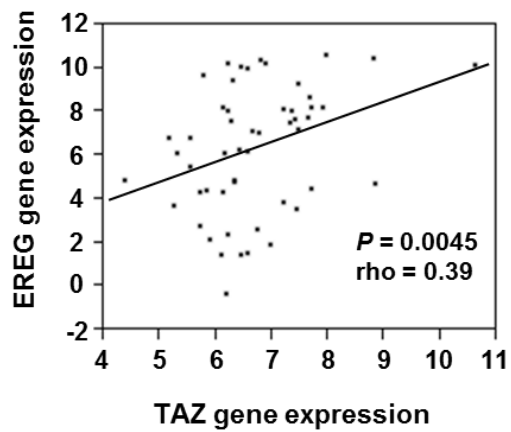
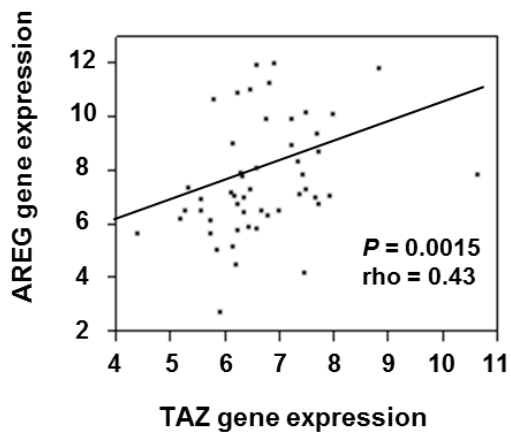
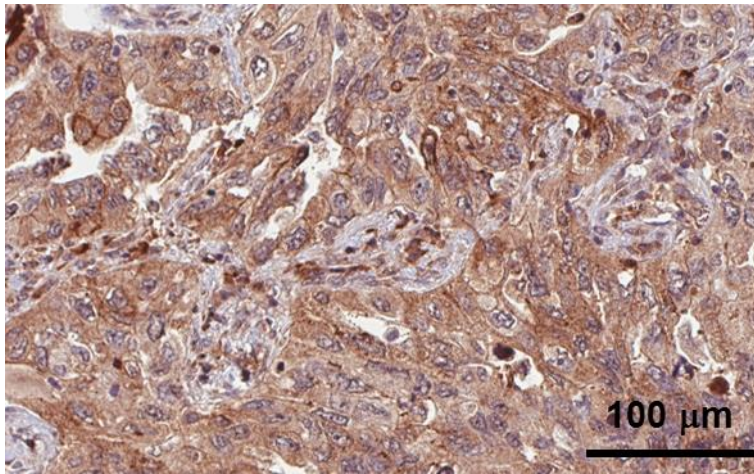


図20 NSCLC細胞株におけるTAZとErbBリガンド発現の相関 (GSE4824、 $n = 52$)
 図19で用いたデータセットとは独立した、別のNSCLC細胞株のマイクロアレイ
 データセットを用いて、同様の解析を行ったところ、同様にTAZとErbBリガ
 ンド発現の正の相関を認めた。

Spearman correlation coefficient (ρ) 及びP値を示す (Probe set, TAZ: 202132_at;
 amphiregulin: 205239_at; epiregulin: 205767_at; neuregulin 1: 208241_at)。

a



b

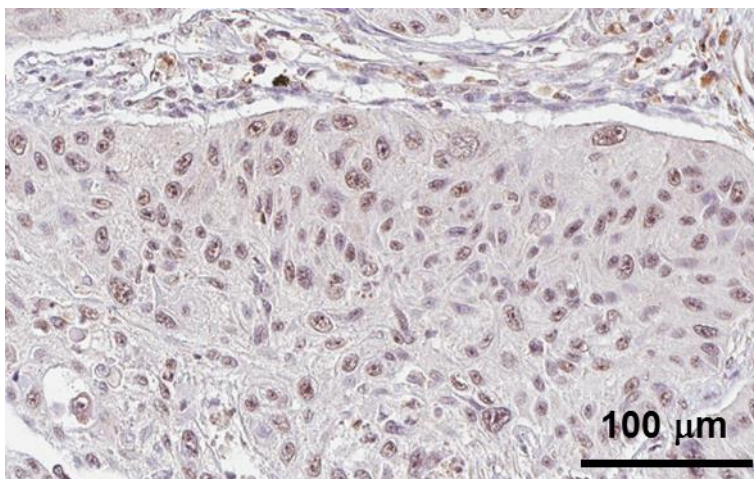


図21 NSCLC組織におけるamphiregulin蛋白発現

ウブサラコホートのNSCLC組織を用いてamphiregulinの免疫組織染色を行った。代表的な免疫染色の写真を示す（a：強陽性、b：陰性）。（a）では癌細胞において細胞質優位なamphiregulinの発現を認めた。

表7 NSCLC組織におけるTAZとamphiregulin蛋白発現の相関

ウプサラコホートの組織マイクロアレイにおける、TAZとamphiregulinの蛋白発現レベルの相関を以下に示す。

<i>n</i> (%)	AREG staining score			Total	
	0	1-2	≥3		
TAZ staining score	0-3	89 (66.4%)	20 (14.9%)	25 (18.7%)	134 (100%)
	4-6	55 (48.3%)	29 (25.4%)	30 (26.3%)	114 (100%)
	7-9	28 (29.2%)	30 (31.2%)	38 (39.6%)	96 (100%)
Total		172	79	93	344

TAZは転写因子TEADと協同して、標的とする遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写活性を制御することが知られている。ErbBリガンドのプロモーター領域を解析した結果、TEADの結合部位が存在することが示された（図22）。

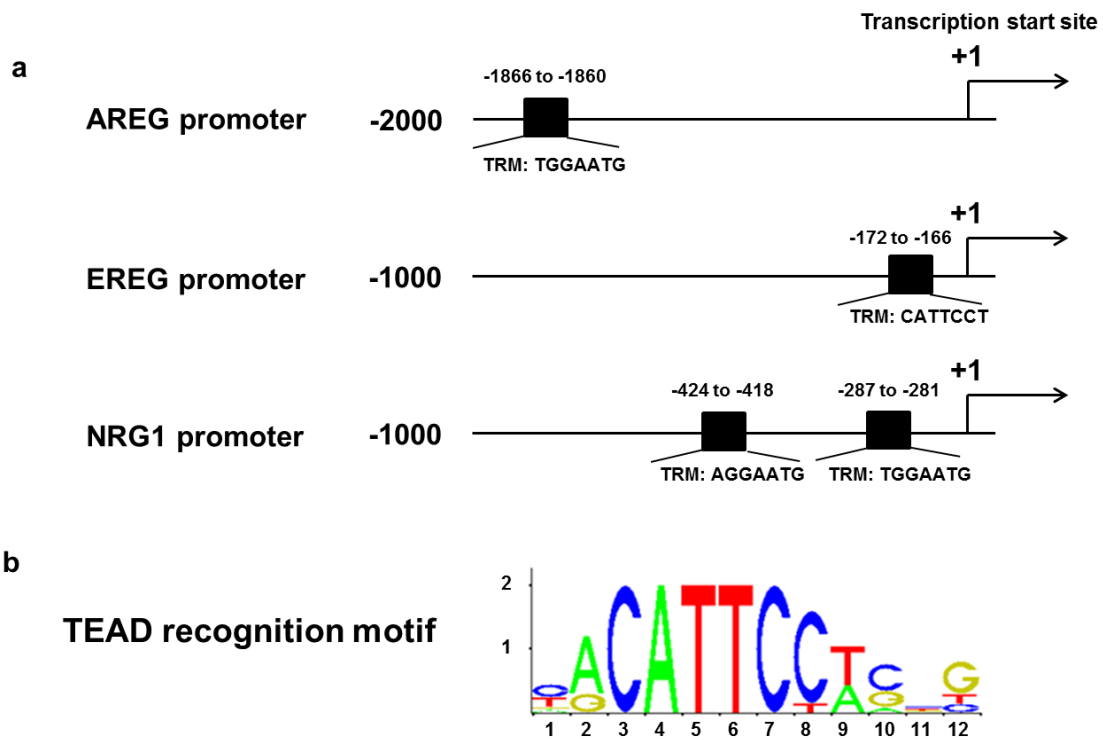


図22 ErbBリガンドのプロモーター解析

(a) ErbBリガンドのプロモーター領域にTEAD recognition motif (TRM) が存在した。

(b) JASPAR データベース (<http://jaspar.cgb.ki.se/>) から得たTRMを示す。

次にGSEAによりTAZ高発現NSCLCにおいてEGFRシグナリングが活性化しているかどうか検討した。過去の研究からEGFRシグナリング関連遺伝子セットを得て、それらを用いて、UPSアラコホートをTAZ高発現、低発現群に分け、GSEAを行った。その結果、EGFRシグナリング関連遺伝子はTAZ高発現群で発現が上昇していることが分かった (図23a-d)。

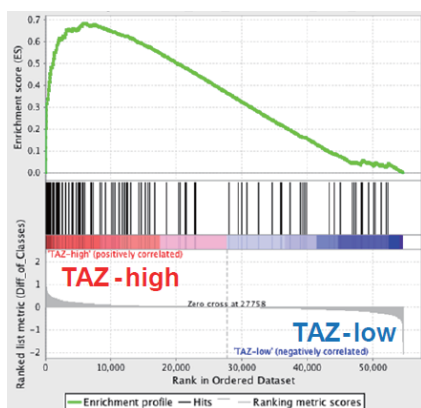


図23 (a) TAZ発現とEGFRシグナリング活性化 (Amit *et al.*、 $P = 0.004$)

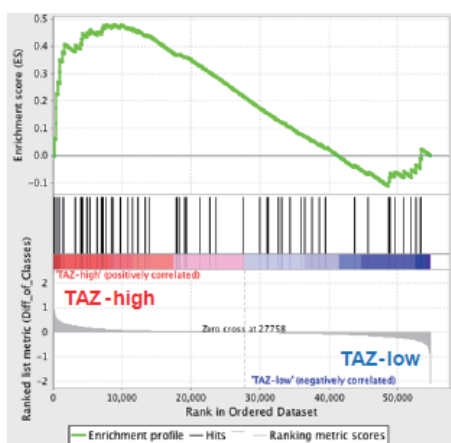


図23 (b) TAZ発現とEGFRシグナリング活性化 (Zwang *et al.*、 $P = 0.082$)

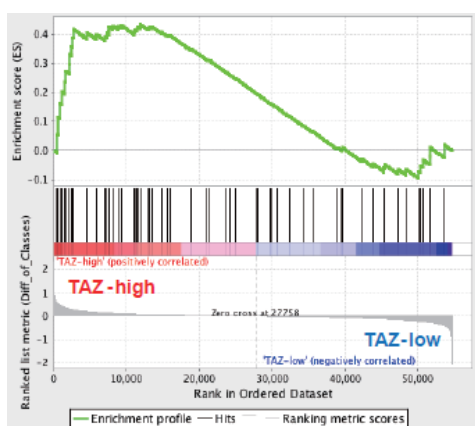


図23 (c) TAZ発現とEGFRシグナリング活性化 (Reactome データベース、 $P = 0.282$)

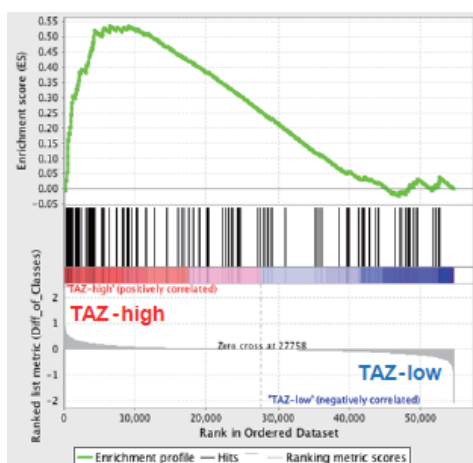


図23 (d) TAZ発現とEGFRシグナリング活性化 (Nagashima *et al.*、 $P = 0.279$)

アップサラコホートをTAZ高発現群、低発現群に分け、EGFRシグナリング関連遺伝子を用いてGSEAを行った。その結果、いずれのEGFRシグナリング関連遺伝子もTAZ高発現群で発現が上昇していた。

EGFRシグナリング関連遺伝子

- (a) MCF10A細胞でEGF投与により発現上昇した遺伝子群 (Amit *et al.*[36])
- (b) 184A1細胞でEGF投与により発現上昇した遺伝子群 (Zwang *et al.*[37])
- (c) Reactome database (<http://www.reactome.org/ReactomeGWT/entrypoint.html>)から得た活性化型EGFRによるシグナリングに関与する遺伝子群
- (d) MCF7細胞でEGF投与により発現上昇した遺伝子群 (Nagashima *et al.*[38])

TAZ発現とEGFR-TKIへの感受性

Cancer Cell Line Encyclopedia データベースからNSCLC細胞株のTAZ発現及び各薬剤に対する感受性（IC50）を調べた結果、2種類のEGFR-TKIにおいて、sensitive群においてTAZ発現量が高い傾向にあった。他の薬剤はsensitive群とresistant群で同程度の発現量だった（図24）。

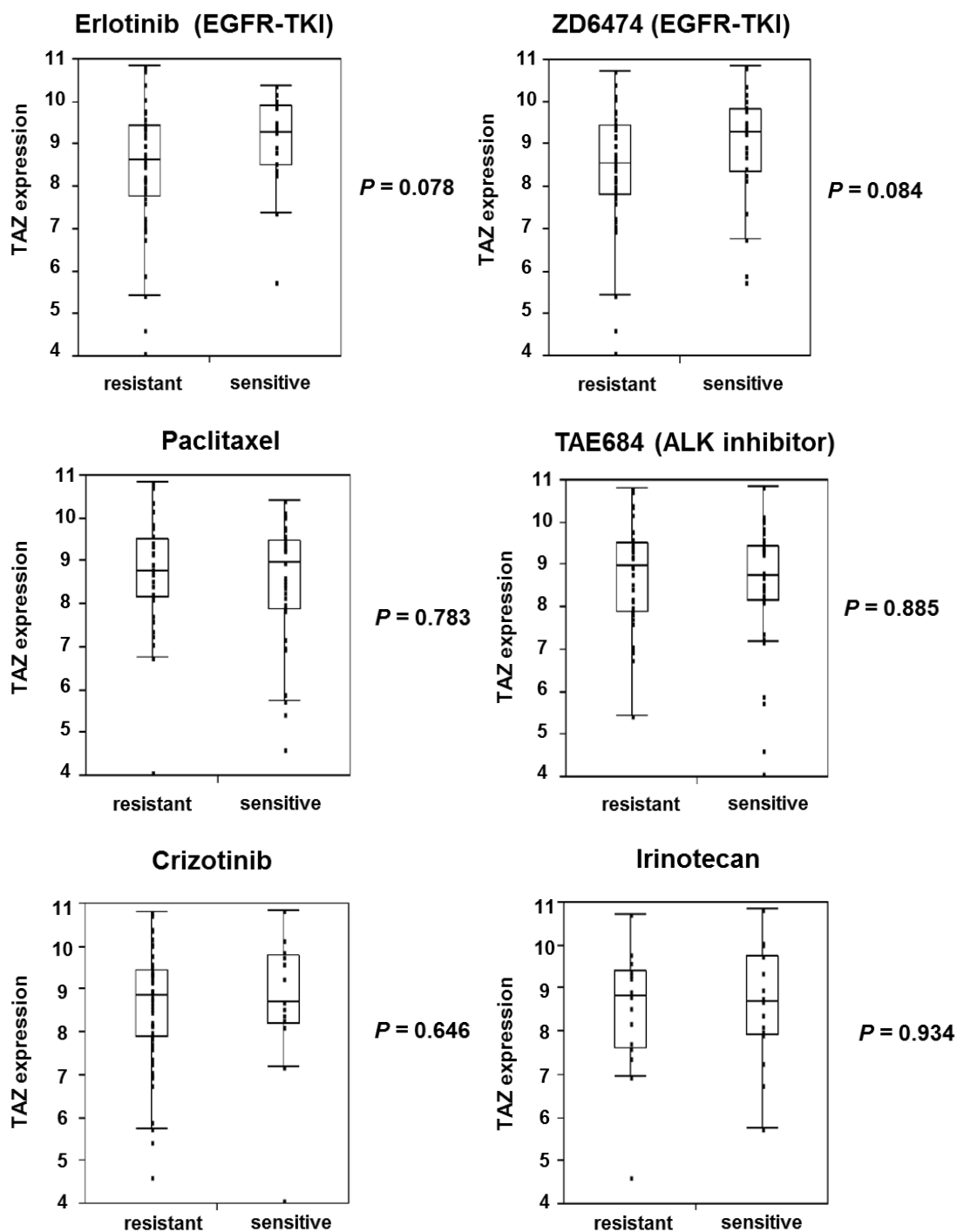


図24 TAZ発現と薬剤感受性

肺癌細胞株において薬剤のIC50により drug sensitive、resistant群に分け、TAZ発現を比較した。Wilcoxon rank sum testによりP値を計算した。2種類のEGFR-TKIにおいて、sensitive群においてTAZ発現量が高い傾向にあった。一方、他の薬剤はsensitive群とresistant群で同程度の発現量だった。The middle bar, メディアン; box, inter-quartile range.

最後に、 gefitinib sensitive genes（ヒト初代培養肺胞上皮細胞株において、EGFが投与された状態から、さらに gefitinib が追加投与されることで遺伝子発現が有意に変化した遺伝子群[39]）を用いて、ウプサラコホートでGSEAを行ったところ、TAZ高発現群で有意にその遺伝子群の発現が上昇していることが示唆された（図25）。

Gene set: Gefitinib sensitive genes
TAZ-high vs. TAZ-low, $P = 0.020$

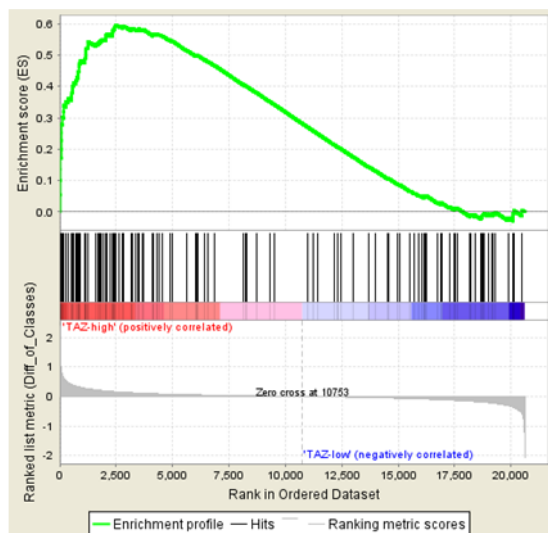


図25 TAZ発現とgefitinib感受性

アップサラコホートにおいてTAZ発現量 (202134_s_at) によりTAZ高発現群、低発現群の2群に分け、gefitinib sensitive genesを用いてGSEAを行った。TAZ高発現群で有意にgefitinib sensitive genesの発現が上昇していた。

考察

本研究では、単一施設における、臨床情報及び遺伝子発現情報を有する NSCLC patient cohort の最も大きなものの一つであるウプサラコホートにおいて、ゲノム、mRNA、蛋白レベルで TAZ 発現を統合的に解析することで、TAZ の NSCLC における臨床的意義を明らかにした。マイクロアレイデータのメタ解析及び組織マイクロアレイの結果、TAZ は NSCLC において独立した予後因子の一つであることが示された。この結果に対応して、TAZ は *in vitro* で肺癌及び気道上皮細胞の増殖を促進し、*in vivo* のマウスモデルで腫瘍形成を促進した。その機序として、TAZ は細胞周期やアポトーシスの制御、EGFR シグナリングの活性化に関与することが示唆された。

TAZ とそのパラログである YAP は Hippo pathway によって制御され、両者は同様の機序で転写共役因子として働く [5]。しかし、両者にはいくつか明らかな違いがある。例えば、YAP ノックアウトマウスは胎生期に死亡するのに対し、TAZ ノックアウトマウスは末梢の肺胞形成が阻害され、肺気腫類似の肺病理所見を呈する [12]。また、YAP ではなく TAZ の高発現が乳癌細胞株及び乳癌組織で見られたという報告がある [14]。さらに Zhou らは、TAZ は肺癌細胞株で高発現、正常気管支上皮細胞株で比較的低発現なのに対し、YAP は両者で同程度の発現を認めると報告した [21]。これらのことから YAP よりも TAZ の方が肺の発

生や腫瘍形成において重要な役割を果たすことが推測される。

本研究で示された、NSCLC患者におけるTAZの高発現と短い生存期間との関連はXieらによる報告と同様である[22]。しかし、本研究と彼らの研究結果とはいくつか相違点が存在する。まず、本研究では正常肺において、TAZの発現は肺胞上皮、気道上皮、線維芽細胞などの間葉系細胞でも認められたが、Xieらの研究では肺癌以外の細胞でのTAZ発現は見られなかった。本研究の免疫組織染色で認められた、正常肺でのTAZ発現陽性、リンパ球でのTAZ発現陰性という発現パターンは、human protein atlasデータベース (<http://www.proteinatlas.org/>) から得られるRNA sequencingの結果と一貫しており、本研究の免疫染色の妥当性を示唆している。次に、TAZ発現は本研究では扁平上皮癌で高い傾向にあったが、Xieらの研究では腺癌に高い傾向にあった。他のNSCLCのマイクロアレイデータ解析からは本研究と同様に、扁平上皮癌優位のTAZ発現が確認されている。これらの相違の理由として、患者の特性（人種など）や免疫染色の方法（抗体など）の違いが挙げられる。

TAZ は多くの種類の癌で高発現しており、腫瘍の増殖、遊走、浸潤などに関わると考えられているが、癌細胞で TAZ の活性化が起きるメカニズムについてはほとんど分かっていない。実際に Hippo pathway を構成する蛋白の DNA レベルでの変異はほとんど報告されていない。数少ない例外は、TAZ をリン酸化す

る LATS を活性化する NF2 (neurofibromin 2) 遺伝子で、神経線維腫症において高率に遺伝子変異を来している[40]。また、LATS2 も悪性中皮腫において遺伝子変異を高頻度で認め[41]、これらの変異により Hippo pathway の最終ターゲットである TAZ の活性化を生じ、腫瘍形成が促進される。しかし、現時点では癌において TAZ 自身の activating mutation は報告されていない。本研究では、著明な増幅ではないものの、一部の肺癌において DNA コピー数が増加しており、それと相関して、TAZ 蛋白発現の上昇を認めた。TAZ や YAP の遺伝子増幅は肝細胞癌、乳癌などいくつかの癌で報告されている[42, 43]。しかし、肝細胞癌や乳癌での遺伝子増幅の割合は低く、肝細胞癌の 60% で YAP の過剰発現が、乳癌の 80% で TAZ の過剰発現が見られるという報告[14, 44]からは、主に遺伝子増幅以外のメカニズムが TAZ/YAP の蛋白発現を制御していると考えられる。例えば、TAZ/YAP のプロモーター領域のメチル化などエピジェネティックな制御や TAZ/YAP 自体の転写制御[45, 46]、さらにマイクロ RNA による転写後制御[47]など多くの要素が関わっていると考えられる。また、TAZ は細胞質においてユビキチン-プロテアソーム系で分解される蛋白であり、蛋白としての安定性も重要な要素である。実際に、本研究では、肺癌組織において mRNA レベルと蛋白レベルでの TAZ 発現において軽度の正の相関が見られたただけであった。mRNA は癌以外の細胞（間葉系細胞など）も含めてマイクロアレイ解析がなさ

れており、一方 TAZ 蛋白は癌細胞のみで免疫染色で発現量がスコアリングされており、この違いが本研究における両者の相関を過少評価している可能性はある。しかし、TAZ のリン酸化に至るまでの上流シグナル分子が TAZ 発現に大きな影響を与える可能性は高く、今後肺癌における、それらの上流因子を含めた TAZ 活性化のメカニズムを明らかにする必要がある。

Zhou らは、A549 細胞における TAZ ノックダウンにより腫瘍形成が抑制されることを示した[21]。これは TAZ を過剰発現させた BEAS-2B 細胞において腫瘍形成が高頻度に見られたという本研究の結果と矛盾しない。しかし、本研究ではサンプルサイズが小さく、腫瘍の大きさの統計学的な比較ができなかった。さらに腫瘍の HE 染色は BEAS-GFP 群と BEAS-TAZ 群とで形態上の相違は見られなかった。そもそも BEAS-2B 細胞は正常気管支上皮細胞にウイルス導入で不死化した細胞株であることも考えると、今回のレンチウイルスベクター自体が癌形成に関与する遺伝子の染色体部位に組み込まれ、遺伝子変異を引き起こし、癌化した可能性も否定はできない。*in vivo* における TAZ の腫瘍形成能に関しては、今後さらなる研究が必要である。

TAZ の細胞増殖や細胞生存への作用の分子機構を探るために、2 種類の肺腺癌細胞株である A549 細胞と H441 細胞を用いて、TAZ ノックダウン前後の RNA を採取し、マイクロアレイ解析を行った結果、ErbB リガンドやサイクリンなど

細胞周期に関わるいくつかの遺伝子の発現が TAZ によって制御されていることが分かった。A549 細胞及び H441 細胞の両方で TAZ ノックダウンにより発現が低下した遺伝子は全部で 30 個あったが、GO 解析をしても有意な結果は得られなかった。本研究では肺以外の組織からの細胞株である MCF10A 細胞及び SW480 細胞を合わせて 259 個の TAZ-regulated genes を定義し、GO 解析や GSEA を行い、細胞周期に関わる遺伝子が多く含まれることが分かったが、Hippo pathway は臓器特異性・細胞特異的な制御機構を有しており[48]、今後、肺特異的な TAZ ターゲット遺伝子についてのさらなる研究が必要である。転写因子 TTF-1 は肺や甲状腺などに特異的に発現される蛋白であり、TAZ は TTF-1 と協同して肺サーファクタント産生を促すことがマウスモデルで示されており[13]、今後ヒトにおける TAZ と TTF-1 との関係を明らかにすることで肺特異的な TAZ 制御ネットワークが明らかになるかもしれない。

本研究では TAZ が肺癌細胞株及び気管支上皮細胞株で amphiregulin をはじめ、ErbB リガンド発現を制御することが示された。臨床検体でも両者の発現の相関が見られた。EGFR リガンドである amphiregulin は肺癌を含む多くの癌の進行に寄与することが報告されている[49]。TAZ は乳腺上皮細胞からの amphiregulin 分泌を亢進させ[50]、また、YAP も乳腺上皮細胞において、直接 amphiregulin 遺伝子のプロモーター領域に結合することで、発現を亢進させると報告されている

[51]。ErbB リガンドのプロモーター領域には TAZ と結合する最も主要な転写因子である TEAD の結合部位があることが予測され、今後ルシフェラーゼアッセイやクロマチン免疫沈降法などにより、TAZ が直接それらの遺伝子発現を制御しているのかどうか明らかにする必要があるだろう。

ウプサラコホートにおいて、TAZ は amphiregulin と蛋白発現レベルで正の相関を認め、また TAZ の高発現と不良な予後との相関も認められたが、amphiregulin の蛋白発現と予後との有意な相関は認められなかった。Fontanini らは 1991 年から 1994 年の間に切除された 195 例の NSCLC 組織で、amphiregulin が高発現だと生存期間が有意に短かったと報告しており [52]、本研究と異なる結果であった。患者特性の違い、昔と近年との肺癌術後治療の違い、抗体を含めた免疫染色の方法の違いなどが理由として挙げられる。ウプサラコホートにおいて TAZ 高発現で予後不良となったのは、amphiregulin 以外の TAZ の標的遺伝子による影響も大きいと考えられる。しかし、GSEA にて、TAZ 高発現 NSCLC において EGFR シグナリングが活性化していることが示唆され、またリン酸化 EGFR は NSCLC 患者において不良な予後と相関するという報告があり [53]、TAZ が EGFR シグナリングを活性化することで NSCLC 患者の予後に影響を与えた可能性も十分考えられる。

EGFR-TKIは近年EGFR遺伝子変異陽性NSCLC患者に対する効果的な治療法と

して確立されている[54]。一方、EGFR遺伝子変異陰性患者においても時々有効となることが知られているが、その理由はよくわかっていない[55]。TAZはNSCLCにおいてEGFRリガンドであるamphiregulinの発現を制御していることが本研究で示された。YonesakaらはEGFR遺伝子変異陰性患者において、amphiregulin発現が高いほど、EGFR-TKIへの感受性が高かったと報告しており[56]、TAZ発現はEGFR遺伝子変異陰性患者におけるEGFR-TKI感受性を規定する一因子となりうるかもしれない。実際、*in vitro*ではEGFR-TKIに感受性のあるNSCLC細胞株においてTAZ発現が高い傾向にあり、TAZ発現とEGFR-TKI感受性との関連が実際の肺癌患者で見られるか、将来の臨床研究が待たれる。

本研究では、TAZのErbBリガンド発現への影響に焦点を絞ったが、4つの細胞株における統合的なマイクロアレイ解析から、TAZは、Axl、CTGF、Cyr61、cyclin (CCND1やCCND3) といった細胞増殖促進に関与する遺伝子の発現制御を通じ、腫瘍形成を促進するという可能性も考えられる。さらに前述したとおり、Hippo pathwayは、WntシグナリングやTGF- β -Smadシグナリングなど癌における他の重要なシグナル伝達経路とのクロストークも報告されており、これらの複雑なネットワークの全容を解明することで、より一層TAZのNSCLCにおける重要な役割が明らかになるだろう。

TAZのoncogenic functionを考えると、TAZは癌治療のターゲットとなりうる。

近年Liu-ChittendenらはYAP-TEADの複合体形成を阻害することが妥当な治療法になりうることを示した[57]。彼らはTEADのdominant-negative変異体を用いて、YAP過剰発現からくる肝腫大/腫瘍形成を阻害した。さらにポルフィリンファミリーの一つであるverteporfinがYAP-TEADの複合体形成を阻害する小分子として同定された。verteporfinは加齢黄斑変性の光線力学的治療にすでに実臨床で使われており、YAP/TAZをターゲットとした癌治療の選択肢の一つとして今後のさらなる研究が待たれる。また、Rho、Rock阻害剤や、GPCRアゴニスト/アンタゴニスト、WNT阻害剤など、TAZ/YAP制御の上流シグナルやHippo pathwayとクロストークする他のシグナル伝達経路も重要な治療ターゲットとして挙げられる。

本研究によって、TAZはNSCLCの予後規定因子として、さらには治療ターゲットの候補として、大きな可能性を持った重要な因子であることが明らかとなった。

謝辞

本研究にあたり、多大なる御高配と御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科 器官病態内科学講座 呼吸器内科学 長瀬隆英教授に深く感謝いたします。

また、本研究全般にわたり直接の御指導、御鞭撻を頂きました呼吸器内科 齋藤朗先生、留学中に御指導頂きましたUppsala大学Rudbeck研究所のPatrick Micke准教授、本研究の遂行にご協力頂きました東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学 鈴木洋特任助教、森下保幸氏に感謝いたします。

最後に、本研究に数々の御助言、御協力を賜りました呼吸器内科517研究室の先生方、実験助手の坂本真紀子氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-2139, 2004.
- 2 Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Janne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363:1693-1703, 2010.
- 3 Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, Hisaminato A, Fujiwara T, Ito Y, Cantley LC, Yaffe MB. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J* 19:6778-6791, 2000.
- 4 Mauviel A, Nallet-Staub F, Varelas X. Integrating developmental signals: a

- Hippo in the (path)way. *Oncogene* 31:1743-1756, 2012.
- 5 Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 19:491-505, 2010.
- 6 Hong JH, Hwang ES, McManus MT, Amsterdam A, Tian Y, Kalmukova R, Mueller E, Benjamin T, Spiegelman BM, Sharp PA, Hopkins N, Yaffe MB. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 309:1074-1078, 2005.
- 7 Varelas X, Sakuma R, Samavarchi-Tehrani P, Peerani R, Rao BM, Dembowy J, Yaffe MB, Zandstra PW, Wrana JL. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat Cell Biol* 10:837-848, 2008.
- 8 Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474:179-183, 2011.
- 9 Mo JS, Yu FX, Gong R, Brown JH, Guan KL. Regulation of the Hippo-YAP pathway by protease-activated receptors (PARs). *Genes Dev* 26:2138-2143, 2012.
- 10 Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH, Zhao J, Yuan H,

- Tumaneng K, Li H, Fu XD, Mills GB, Guan KL. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 150:780-791, 2012.
- 11 Varelas X, Miller BW, Sopko R, Song S, Gregorieff A, Fellouse FA, Sakuma R, Pawson T, Hunziker W, McNeill H, Wrana JL, Attisano L. The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Dev Cell* 18:579-591, 2010.
- 12 Mitani A, Nagase T, Fukuchi K, Aburatani H, Makita R, Kurihara H. Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif is essential for normal alveolarization in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 180:326-338, 2009.
- 13 Park KS, Whitsett JA, Di Palma T, Hong JH, Yaffe MB, Zannini M. TAZ interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-C. *J Biol Chem* 279:17384-17390, 2004.
- 14 Chan SW, Lim CJ, Guo K, Ng CP, Lee I, Hunziker W, Zeng Q, Hong W. A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer Res* 68:2592-2598, 2008.
- 15 Lei QY, Zhang H, Zhao B, Zha ZY, Bai F, Pei XH, Zhao S, Xiong Y, Guan KL. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol* 28:2426-2436, 2008.
- 16 Zhang H, Liu CY, Zha ZY, Zhao B, Yao J, Zhao S, Xiong Y, Lei QY, Guan KL.

- TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 284:13355-13362, 2009.
- 17 Bhat KP, Salazar KL, Balasubramaniyan V, Wani K, Heathcock L, Hollingsworth F, James JD, Gumin J, Diefes KL, Kim SH, Turski A, Azodi Y, Yang Y, Doucette T, Colman H, Sulman EP, Lang FF, Rao G, Copray S, Vaillant BD, Aldape KD. The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes Dev* 25:2594-2609, 2011.
- 18 Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, Inui M, Montagner M, Parenti AR, Poletti A, Daidone MG, Dupont S, Basso G, Bicciato S, Piccolo S. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 147:759-772, 2011.
- 19 Wang L, Shi S, Guo Z, Zhang X, Han S, Yang A, Wen W, Zhu Q. Overexpression of YAP and TAZ Is an Independent Predictor of Prognosis in Colorectal Cancer and Related to the Proliferation and Metastasis of Colon Cancer Cells. *PLoS One* 8:e65539, 2013.
- 20 de Cristofaro T, Di Palma T, Ferraro A, Corrado A, Lucci V, Franco R, Fusco A, Zannini M. TAZ/WWTR1 is overexpressed in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Cancer* 47:926-933, 2011.

- 21 Zhou Z, Hao Y, Liu N, Raptis L, Tsao MS, Yang X. TAZ is a novel oncogene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 30:2181-2186, 2011.
- 22 Xie M, Zhang L, He CS, Hou JH, Lin SX, Hu ZH, Xu F, Zhao HY. Prognostic significance of TAZ expression in resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 7:799-807, 2012.
- 23 Micke P, Edlund K, Holmberg L, Kultima HG, Mansouri L, Ekman S, Bergqvist M, Scheibenflug L, Lamberg K, Myrdal G, Berglund A, Andersson A, Lambe M, Nyberg F, Thomas A, Isaksson A, Botling J. Gene copy number aberrations are associated with survival in histologic subgroups of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6:1833-1840, 2011.
- 24 Botling J, Edlund K, Lohr M, Hellwig B, Holmberg L, Lambe M, Berglund A, Ekman S, Bergqvist M, Ponten F, Konig A, Fernandes O, Karlsson M, Helenius G, Karlsson C, Rahnenfuhrer J, Hengstler JG, Micke P. Biomarker discovery in non-small cell lung cancer: integrating gene expression profiling, meta-analysis, and tissue microarray validation. *Clin Cancer Res* 19:194-204, 2013.
- 25 Edlund K, Lindskog C, Saito A, Berglund A, Ponten F, Goransson-Kultima H, Isaksson A, Jirstrom K, Planck M, Johansson L, Lambe M, Holmberg L, Nyberg F, Ekman S, Bergqvist M, Landelius P, Lamberg K, Botling J, Ostman A, Micke

- P. CD99 is a novel prognostic stromal marker in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 131:2264-2273, 2012.
- 26 Zhu CQ, Ding K, Strumpf D, Weir BA, Meyerson M, Pennell N, Thomas RK, Naoki K, Ladd-Acosta C, Liu N, Pintilie M, Der S, Seymour L, Jurisica I, Shepherd FA, Tsao MS. Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 28:4417-4424, 2010.
- 27 Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, Joshi MB, Harpole D, Lancaster JM, Berchuck A, Olson JA, Jr., Marks JR, Dressman HK, West M, Nevins JR. Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 439:353-357, 2006.
- 28 Hou J, Aerts J, den Hamer B, van Ijcken W, den Bakker M, Riegman P, van der Leest C, van der Spek P, Foekens JA, Hoogsteden HC, Grosveld F, Philipsen S. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PLoS One* 5:e10312, 2010.
- 29 Raponi M, Zhang Y, Yu J, Chen G, Lee G, Taylor JM, Macdonald J, Thomas D, Moskaluk C, Wang Y, Beer DG. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res*

66:7466-7472, 2006.

- 30 Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Iwakawa R, Furuta K, Tsuta K, Shibata T, Yamamoto S, Watanabe S, Sakamoto H, Kumamoto K, Takenoshita S, Gotoh N, Mizuno H, Sarai A, Kawano S, Yamaguchi R, Miyano S, Yokota J. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 72:100-111, 2012.
- 31 Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, Tsao MS, Yeatman TJ, Gerald WL, Eschrich S, Jurisica I, Giordano TJ, Misek DE, Chang AC, Zhu CQ, Strumpf D, Hanash S, Shepherd FA, Ding K, Seymour L, Naoki K, Pennell N, Weir B, Verhaak R, Ladd-Acosta C, Golub T, Gruidl M, Sharma A, Szoke J, Zakowski M, Rusch V, Kris M, Viale A, Motoi N, Travis W, Conley B, Seshan VE, Meyerson M, Kuick R, Dobbin KK, Lively T, Jacobson JW, Beer DG. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med* 14:822-827, 2008.
- 32 Xie Y, Xiao G, Coombes KR, Behrens C, Solis LM, Raso G, Girard L, Erickson HS, Roth J, Heymach JV, Moran C, Danenberg K, Minna JD, Wistuba, II. Robust gene expression signature from formalin-fixed paraffin-embedded

- samples predicts prognosis of non-small-cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 17:5705-5714, 2011.
- 33 Azzolin L, Zanconato F, Bresolin S, Forcato M, Basso G, Bicciato S, Cordenonsi M, Piccolo S. Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* 151:1443-1456, 2012.
- 34 Berriz GF, Beaver JE, Cenik C, Tasan M, Roth FP. Next generation software for functional trend analysis. *Bioinformatics* 25:3043-3044, 2009.
- 35 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545-15550, 2005.
- 36 Amit I, Citri A, Shay T, Lu Y, Katz M, Zhang F, Tarcic G, Siwak D, Lahad J, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Vaisman N, Segal E, Rechavi G, Alon U, Mills GB, Domany E, Yarden Y. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat Genet* 39:503-512, 2007.
- 37 Zwang Y, Sas-Chen A, Drier Y, Shay T, Avraham R, Lauriola M, Shema E, Lidor-Nili E, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Lu Y, Mills GB, Rechavi G, Oren M, Domany E, Yarden Y. Two phases of mitogenic signaling unveil roles for p53

- and EGR1 in elimination of inconsistent growth signals. *Mol Cell* 42:524-535, 2011.
- 38 Nagashima T, Shimodaira H, Ide K, Nakakuki T, Tani Y, Takahashi K, Yumoto N, Hatakeyama M. Quantitative transcriptional control of ErbB receptor signaling undergoes graded to biphasic response for cell differentiation. *J Biol Chem* 282:4045-4056, 2007.
- 39 Yamauchi M, Yamaguchi R, Nakata A, Kohno T, Nagasaki M, Shimamura T, Imoto S, Saito A, Ueno K, Hatanaka Y, Yoshida R, Higuchi T, Nomura M, Beer DG, Yokota J, Miyano S, Gotoh N. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase defines critical prognostic genes of stage I lung adenocarcinoma. *PLoS One* 7:e43923, 2012.
- 40 Asthagiri AR, Parry DM, Butman JA, Kim HJ, Tsilou ET, Zhuang Z, Lonsler RR. Neurofibromatosis type 2. *Lancet* 373:1974-1986, 2009.
- 41 Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T, Fujii M, Ishiguro F, Fukui T, Akatsuka S, Horio Y, Hida T, Kondo Y, Toyokuni S, Osada H, Sekido Y. LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res* 71:873-883, 2011.
- 42 Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, Deng CX, Brugge JS, Haber DA. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on

- the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12405-12410, 2006.
- 43 Zender L, Spector MS, Xue W, Flemming P, Cordon-Cardo C, Silke J, Fan ST, Luk JM, Wigler M, Hannon GJ, Mu D, Lucito R, Powers S, Lowe SW. Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* 125:1253-1267, 2006.
- 44 Xu MZ, Yao TJ, Lee NP, Ng IO, Chan YT, Zender L, Lowe SW, Poon RT, Luk JM. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 115:4576-4585, 2009.
- 45 Konsavage WM, Jr., Kyler SL, Rennoll SA, Jin G, Yochum GS. Wnt/beta-catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem* 287:11730-11739, 2012.
- 46 Zhang T, Zhang J, You X, Liu Q, Du Y, Gao Y, Shan C, Kong G, Wang Y, Yang X, Ye L, Zhang X. Hepatitis B virus X protein modulates oncogene Yes-associated protein by CREB to promote growth of hepatoma cells. *Hepatology* 56:2051-2059, 2012.
- 47 Lin CW, Chang YL, Chang YC, Lin JC, Chen CC, Pan SH, Wu CT, Chen HY, Yang SC, Hong TM, Yang PC. MicroRNA-135b promotes lung cancer

- metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. *Nat Commun* 4:1877, 2013.
- 48 Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 13:63-79, 2014.
- 49 Busser B, Sancey L, Brambilla E, Coll JL, Hurbin A. The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1816:119-131, 2011.
- 50 Yang N, Morrison CD, Liu P, Miecznikowski J, Bshara W, Han S, Zhu Q, Omilian AR, Li X, Zhang J. TAZ induces growth factor-independent proliferation through activation of EGFR ligand amphiregulin. *Cell Cycle* 11:2922-2930, 2012.
- 51 Zhang J, Ji JY, Yu M, Overholtzer M, Smolen GA, Wang R, Brugge JS, Dyson NJ, Haber DA. YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nat Cell Biol* 11:1444-1450, 2009.
- 52 Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR, Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G, Ciardiello F. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and

- receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-III non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res* 4:241-249, 1998.
- 53 Sonnweber B, Dlaska M, Skvortsov S, Dirnhofer S, Schmid T, Hilbe W. High predictive value of epidermal growth factor receptor phosphorylation but not of EGFRvIII mutation in resected stage I non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Pathol* 59:255-259, 2006.
- 54 Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, Zhang S, Wang J, Zhou S, Ren S, Lu S, Zhang L, Hu C, Luo Y, Chen L, Ye M, Huang J, Zhi X, Zhang Y, Xiu Q, Ma J, You C. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 12:735-742, 2011.
- 55 Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353:123-132, 2005.

- 56 Yonesaka K, Zejnullahu K, Lindeman N, Homes AJ, Jackman DM, Zhao F, Rogers AM, Johnson BE, Janne PA. Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin Cancer Res* 14:6963-6973, 2008.
- 57 Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee SJ, Anders RA, Liu JO, Pan D. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev* 26:1300-1305, 2012.