

論文の内容の要旨

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

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 は主に転写因子 TEAD family と共に働き、細胞増殖を促す遺伝子群の発現を引き起こす。TAZ 欠損マウスは末梢肺において正常な肺胞形成が抑制され、肺気腫類似の病理所見を呈するとの報告から、TAZ の肺発生における重要性が示唆されている。そして、近年 TAZ が乳癌や大腸癌など多くの癌で高発現していることが示され、非小細胞肺癌 (NSCLC) においても細胞増殖を促進する作用が報告された。しかし、TAZ の NSCLC における役割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 NSCLC のマイクロアレイデータの解析、さらに組織マイクロアレイを用いて免疫組織染色を行い、TAZ 発現と臨床病理学的パラメーターや予後との関連を解析した。そして細胞株を用いて TAZ 過剰発現及びノックダウンの実験系を構築し、TAZ の NSCLC における機能を調べた。

まず、196例のNSCLC患者からなるウプサラ肺癌コホートにおいて、遺伝子発現マイクロアレイでNSCLC組織の遺伝子発現プロファイルを解析した。TAZのprobe setの一つである202134_s_atの発現データを用いて、単変量解析、そして、病期、performance status、年齢でadjustした多変量解析を行ったところ、いずれにおいてもTAZ高発現と短い生存期間との有意な相関を認めた

(各々 $P = 0.021$ 、 $P = 0.035$)。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 (合わせて1339例のNSCLC) 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が示された ($P = 0.005$)。さらに組織マイクロアレイ (TMA) を用いた免疫組織染色の結果、345例のNSCLC患者において、TAZの高発現と不良な予後との相関が蛋白レベルでも確認された ($P = 0.016$)。組織型では扁平上皮癌でTAZ発現が高い傾向にあった。TAZのDNAコピー数とTAZ発現レベルはmRNAレベル、蛋白レベルいずれも有意に相関しており (各々 $P < 0.001$ 、 $P = 0.025$)、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。

次にTAZ loss-of-function model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 model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。まず、細胞増殖におけるTAZの役割を調べたところ、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。細胞周期解析では、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、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。さらに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、アネキシン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。

次に、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、腫瘍形成能を調べた。その結果、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。

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。amphiregulin、epiregulin、neuregulin 1といったErbBリガンドやcyclin D1、D3といった細胞周期に関わる遺伝子がTAZによって発現制御を受けることが分かった。また、H441細胞でも同様の遺伝子発現プロファイリングを行い、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、MCF10A細胞（乳腺上皮細胞株）とSW480細胞（大腸癌細胞株）でのマイクロアレイ解析の結果を統合し、259個からなるTAZ-regulated gene setを得た。この遺伝子セットを用いてgene ontology解析を行った結果、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。

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たため、定量的RT-PCRでその結果を確認した結果、同様の結果が得られた。さらに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。

次にNSCLCにおいてTAZとそれらの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られたNSCLC細胞株のマイクロアレイデータセット（GSE4127、

GSE4824) を用いて解析した結果、TAZとErbBリガンドの発現の有意な相関を認めた。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、ウプサラコホートのTMAを用いて免疫組織染色を行った。その結果、TAZとamphiregulinの発現の有意な相関を認めた。また、TAZ高発現NSCLCにおいてepidermal growth factor receptor (EGFR) シグナリングが活性化しているかどうか調べるため、EGFRシグナリング関連遺伝子セットを用いて、ウプサラコホートで、gene set enrichment analysis (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た。

以上まとめると、本研究ではゲノム、mRNA、蛋白レベルでの統合的な解析の結果、TAZ発現はNSCLCにおいて独立した予後因子の一つであることが分かった。この結果に対応して、TAZは肺癌及び気道上皮細胞の増殖を促進し、その機序として、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わることが示唆された。TAZはNSCLCの予後規定因子、さらには治療ターゲットの候補となりうるだろう。