

# 研究報告書

平成30年度：A課題

令和2年4月10日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 千葉大学大学院薬学研究院

住所 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1

研究者氏名 山口憲孝



(研究課題)

新規 EMT 誘導因子 VGLL3 の癌悪性化における役割解析

---

平成31年2月5日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 【研究の背景】

上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT) は、上皮細胞が接着や極性を失って間葉細胞様に変化する現象であり、癌細胞の転移浸潤能や薬剤耐性の獲得に深く関わっている。従って EMT は癌悪性化の重要な原因の1つであり、その分子機構の解明は癌治療薬の開発に役立つと考えられる。

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )は、転写因子 Smad の活性化を介して EMT を誘導するサイトカインである。これまでに、我々は、TGF- $\beta$  による EMT 誘導の分子機構の解明を目的に、TGF- $\beta$  刺激下における遺伝子発現のデータベースを解析し、TGF- $\beta$  刺激によって発現誘導される機能未解明の遺伝子を約 10 種特定した。これらを上皮様ヒト肺癌細胞株 A549 に安定発現したところ、これらの1つである Vestigial-like family member 3 (VGLL3)を安定発現する細胞では、無刺激下においても間葉細胞の特徴である紡錘状の形態変化と細胞の運動性の上昇が観察された。さらに、上皮マーカー E-cadherin の低下と間葉マーカーの SNAIL, SLUG の上昇も認められ、VGLL3 の安定発現にて EMT が誘導されることがわかった。また、内在性 VGLL3 の発現を RNAi によって抑制すると、TGF- $\beta$  刺激による EMT が抑制されることもわかった。これらのことから、VGLL3 が TGF- $\beta$  によって発現誘導され EMT を促進する新規機能分子であることが明らかとなった。

癌悪性化と VGLL3 との関連を調べるために、ヒト癌細胞株の遺伝子発現データベースを解析したところ、間葉系の大腸癌細胞株 LoVo や乳癌細胞株 BT549 において VGLL3 が高発現しており、この VGLL3 をノックダウンすると上皮細胞様に性質が変化して運動性の低下や E-cadherin の回復が認められた。また、ヒト癌患者予後のデータベース (PROGgeneV2)

を解析したところ、大腸癌や乳癌において VGLL3 高発現の患者は有意に予後が不良であることもわかった。これらの結果から、VGLL3 が EMT を誘導して癌悪性を促進することが明らかとなった。

#### 【結果・考察】

VGLL3 は、ショウジョウバエにおいて翅の形成に関わる転写共役因子 Vestigial のオルソログであるが、ヒトやマウスなど哺乳細胞における機能はほとんどわかっていなかった。そこで本研究では、VGLL3 の分子機能の解明を進めた。ショウジョウバエの Vestigial は、転写因子 TEA domain transcription factor (TEAD) の転写共役因子であるため、まず、VGLL3 が TEAD に結合するかどうかを免疫沈降により解析した。その結果、確かに VGLL3 は TEAD と結合することがわかった。次に、VGLL3 による EMT 誘導に TEAD が関与するかどうかを確認するために、VGLL3 安定発現株における TEAD の発現を RNAi によって抑制した。その結果、VGLL3 安定発現株における E-cadherin 低下が回復し、運動性の低下も認められた。このことから、VGLL3 は TEAD に結合し、TEAD の活性化を介して EMT を誘導することがわかった。

次に、EMT 誘導に関わる VGLL3-TEAD の標的遺伝子を特定するために、RNA-seq により VGLL3 安定発現株における遺伝子発現を解析した。その結果、幹細胞因子 High-mobility AT-hook 2 (HMGA2) の発現が上昇していることがわかり、HMGA2 に着目して解析を進めた。VGLL3 安定発現株において TEAD をノックダウンすると HMGA2 の発現が低下し、さらに HMGA2 をノックダウンすると E-cadherin の回復や運動性の低下が認められた。また、内在性に VGLL3 が高発現する癌細胞株においても、TEAD のノックダウンによる HMGA2 の発現低下と、HMGA2 ノックダウンによる E-cadherin の回復や運動性の低下が観察された。これらのことから、VGLL3 は、TEAD の転写共役因子としてはたらき、HMGA2 の発現を誘導して EMT を促進することが明らかとなった（論文準備中）。

TEAD の転写共役因子としては YAP/TAZ が広く知られており、YAP/TAZ の結合により活性化した TEAD は細胞増殖や組織成長を促進する。YAP/TAZ は Hippo シグナル伝達系によって抑制されており、Hippo シグナル伝達系の破綻は YAP/TAZ の異常活性化を導き発癌に寄与することが知られている。我々は、TEAD の転写共役因子として機能する VGLL3 について、YAP/TAZ や Hippo シグナル伝達系との関連を解析した。その結果、VGLL3 安定株では Hippo 経路が活性化し YAP/TAZ が抑制されていることがわかった。さらに、レポーター解析によって YAP/TAZ-TEAD と VGLL3-TEAD が類似した DNA 配列を認識するのかについて調べたところ、YAP/TAZ-TEAD と VGLL3-TEAD は異なった配列に結合することがわかった。これらのことから、VGLL3 は、YAP/TAZ と競合的に TEAD に結合し、がん抑制経路として知られる Hippo 経路の活性化を伴って癌悪性を促進する機能を持つと考えられる（論文投稿中）。

#### 【論文】

Vestigial-like family member 3 (VGLL3), a cofactor for TEAD transcription factor, promotes cell proliferation through Hippo pathway activation. (In revision)

Hori N., Okada K., Takakura Y., Takano H., Yamaguchi N., and Yamaguchi N.\*

#### 【学会発表】

上皮間葉転換誘導因子による炎症反応とその役割

第 93 回日本薬理学会年会 (2020.3.16-18)

山口憲孝, 山口直人, 高野博之

The transcriptional cofactor VGLL3 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in tumor cells.

The 2019 ASCB/EMBO Meeting (2019.12.7-11)

Yamaguchi N., Takano H., and Yamaguchi N.