



N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine inhibits bladder cancer progression by suppressing YAP1/TAZ

白石，祐介

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2022-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8487号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482235>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazol-

1-amine inhibits bladder cancer progression by suppressing

YAP1/TAZ

N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazol-1-amine は
YAP1/TAZ を抑制して膀胱癌の進行を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

腎泌尿器科学

指導教員：黒田 良祐 教授

白石 祐介

【緒言】

膀胱癌は、泌尿器系の一般的な悪性腫瘍であり、先進国では有病率が高い。新規診断患者の約70~80%は「非筋層浸潤性膀胱癌」(NMIBC)と呼ばれる表在性乳頭癌を呈し、これらの症例の30~80%は切除後に再発し、10~30%は筋層浸潤性膀胱癌(MIBC)に進行する。MIBC患者は、膀胱摘出術およびプラチナベースの化学療法で治療されるが、多くの患者はプラチナ製剤に耐性となる。多くの免疫チェックポイント阻害剤が、プラチナ製剤不適格患者の第一選択療法として承認されているが、MIBC患者の全無増悪生存期間を延長する効率は一般に低いことが示されている。したがって、膀胱癌に対する有効な新薬の開発が切望されている。

Hippo-YAP1経路は、腫瘍の発生と発達に関わる最も重要な細胞シグナル伝達機構の一つである。YAP1とTAZは、転写因子のTEADファミリーの共活性化因子であり、細胞増殖に関わる多くの標的遺伝子を正に制御している。YAP1/TAZの負の制御はHippo経路因子によって媒介され、Hippoシグナルの活性化は、細胞極性、細胞間接触、GPCRまたはRTKを活性化する可溶性因子、インテグリン、マトリックスタンパク質および活性酸素種の変化などによって引き起こされる。YAP1/TAZはLATSを介したリン酸化により抑制され、細胞質内にとどまる。細胞質内のリン酸化YAP1/TAZは、その後、E3ユビキチンリガーゼSCF β -TRCPを介したユビキチン化とプロテアソーム分解を受け、細胞増殖に対する刺激作用が取り除かれる。

Hippo-YAP1経路は、膀胱癌の腫瘍形成および進行の間に重要な役割を果たし、YAP1発現の上昇は、膀胱癌の約50%で起こり患者の予後不良と相関すると報告されている。またin vitroでは、YAP1の発現は、膀胱癌細胞および膀胱癌幹様細胞の増殖および移動、上皮間葉転換による組織侵入および酸化ストレスおよび化学治療薬に対する耐性に影響を及ぼしていると報告されている。これらの知見は、YAP1が膀胱癌治療の有望な薬物ターゲットとなり得ることを示唆している。

本研究では、低分子化合物のスクリーニングを行いカルバゾール化合物N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine(DMPCA)を同定し、DMPCAはLATSキナーゼを強く活性化し、YAP1/TAZタンパク質をリン酸化・分解させ、膀胱癌細胞の増殖をIn vitroとマウス異種移植片で阻害することを報告する。

【方法・結果】

YAP1/TAZ-TEADレポーターシステムを用いて29,049の低分子化合物のライブラリーをスクリーニングし、YAP1の強力な阻害剤としてDMPCAを同定した。

In vitroでの膀胱癌細胞に対するDMPCAの効果を調べるために、各膀胱癌サブタイプを代表する細胞株T24(double negative type)、5637(basal type)、KMBC-2(luminal type)を用い、これらの細胞を20 μ M DMPCAで24時間処理したところ、3つの細胞株すべてでYAP1およびTAZタンパク質の有意な減少が観察された(western blot法)。また、DMPCA処理したT24細胞で、YAP1 S127、YAP1 S397およびTAZ S89のリン酸化が時間依存的

および用量依存的に増加することが確認された（western blot 法）。

次に免疫蛍光染色を行い、DMPCA で処理した T24 細胞において、YAP1 が核から著しく排除された。また DMPCA は T24 細胞において、既知の TEAD 標的遺伝子である CTGF、CYR61、ANKRD1 および AMOT2 をダウンレギュレートすることを qPCR にて確認した。YAP1 (S127 と S397) と TAZ (S89 と S311) のリン酸化は、Hippo シグナル伝達カスケードの上流の MST1/2 と LATS1/2 キナーゼのリン酸化と活性化に依存している。DMPCA で処理した T24 細胞でこれらのキナーゼのリン酸化を western blot 法で観察し、LATS1 の T1079 でのリン酸化の有意な増加が観察されたが、MST1/2 の T183/180 でのリン酸化は有意に増加しなかった。これらの結果は、DMPCA が MST1/2 非依存的に LATS1 のリン酸化を誘導し、それによって YAP1/TAZ の分解と核移行を変化させることを示唆するものであった。

DMPCA の膀胱癌細胞に対する *in vitro* での影響を調べるために、まず細胞計数により細胞生存率を試験し、T24 細胞を DMPCA (5~20 μM) で 2 日間処理すると、T24 細胞の生存率が 70%以上低下した。この生存率の低下が細胞周期進行の障害によるものかどうかを判断するため、T24 細胞を DMPCA (5~20 μM) で 6 時間処理し、BrdU 取り込みアッセイをしたところ、DMPCA は BrdU 取り込みを有意に減少させた。さらに、Annexin V アッセイにて同じ濃度範囲の DMPCA が、T24 細胞の細胞死を増加させることを見出した。これらの結果は、DMPCA 処理した T24 細胞の生存率の低下）が、細胞周期の進行の乱れと細胞死の増加の両方によるものであることを示唆している。

T24 細胞の増殖に対する DMPCA の阻害効果が YAP1/TAZ の不活性化に依存することを確認するため、我々が以前に作製した Yap1/Taz ダブルノックアウト (DKO) マウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) の不死化株を利用した。この Yap1/Taz DKO MEF 細胞および野生型 MEF 細胞を 5 μM DMPCA で 3 日間処理し、細胞を WST 細胞生存率アッセイにかけた。T24 細胞で観察されたように野生型 MEF の生存率を DMSO 処理対照の約 60%に減少させた。Yap1/Taz DKO MEF 細胞は、それ自体で細胞生存率を約 80%減少させ、DMPCA 処理ではそれ以上の減少を与えるなかった。これらのことから、DMPCA による細胞生存率への影響は、Yap1/Taz の不活性化が関与していることが示唆された。

最後に、マウスの異種移植モデルを用いて、DMPCA が *in vivo* で膀胱癌細胞の増殖を抑制できるかどうかを検証した。T24 細胞を Balb/c ヌードマウスに皮下注射し、これらの動物に 20 mg/kg DMPCA を 2 日おきに 36 日間腹腔内投与した。その結果、DMPCA 投与により、異種移植された腫瘍細胞の *in vivo* での増殖がほぼ完全に抑制されることがわかった。切除した腫瘍の免疫組織化学的解析により、YAP1/TAZ の活性化（核内転位）が DMPCA 処理により阻害されることが明らかになった。さらに、DMPCA は、これらの腫瘍における増殖マーカー Ki67 の核内発現を減少させた。これらの観察結果は、DMPCA が YAP1/TAZ 活性を阻害するメカニズムを介して、*in vivo* で膀胱癌細胞の増殖を抑制することを示唆している。

【結語】

本研究では、Hippo 経路を標的とした低分子化合物のライブラリースクリーニングの結果、カルバゾール誘導体である DMPCA を同定した。また、DMPCA が LATS のリン酸化を誘導し、次いで YAP1/TAZ のリン酸化を誘導することを明らかにし、この活性が *in vitro* および *in vivo* で膀胱癌細胞の増殖を阻害することを明らかにした。

遺伝子発現解析にて、膀胱癌は luminal type、basal type、null/double negative type に分類されている。後者の 2 つの実体は、臨床的に侵襲的であり、通常、診断時に進行した段階にあり、治療に抵抗性であり、luminal サブタイプよりも予後がはるかに悪い。本研究では膀胱癌サブタイプの違いは DMPCA に対する膀胱癌細胞の感受性に影響しないことが示唆された。さらに、null/double negative (T24) および basal (5637) type 細胞では、luminal (KMBC2) サブタイプ細胞よりも強く DMPCA が YAP1 活性化を抑制することが分かった。また重要なことに、DMPCA を *in vivo* で投与すると、異種移植したマウスの T24 腫瘍の増殖が著しく抑制された。DMPCA の生物学的效果および作用機序に関する *in vitro* および *in vivo* でのさらなる研究が必要であるが、今回のデータから、この化合物は難治性の null/double negative および basal サブタイプの膀胱癌の治療に有効な新薬として十分に検討に値する可能性があることが示唆された。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3230 号	氏名	白石 祐介
論文題目 Title of Dissertation	<p>N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine inhibits bladder cancer progression by suppressing YAP1/TAZ N-(3,4-dimethoxyphenethyl)-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazol-1-amine は YAP1/TAZ を抑制して膀胱癌の進行を抑制する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p> <p>副査 Vice-examiner</p>	<p>福本巧 福本 巧</p> <p>眞崎義名 眞崎 義名</p> <p>見玉裕之 見玉 裕之</p>	

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【緒言】

膀胱癌は、泌尿器系の一般的な悪性腫瘍であり、先進国では有病率が高い。転移性膀胱癌患者は、プラチナベースの化学療法で治療されるが、多くの患者はプラチナ製剤に耐性となる。多くの免疫チェックポイント阻害剤が、プラチナ製剤不適格患者の第一選択療法として承認されているが、生存期間を延長する効率は一般に低いことが示されている。したがって、膀胱癌に対する有効な新薬の開発が切望されている。

Hippo-YAP1 経路は、腫瘍の発生と発達に関わる最も重要な細胞シグナル伝達機構の一つである。YAP1 と TAZ は、転写因子の TEAD ファミリーの共活性化因子であり、細胞増殖に関わる多くの標的遺伝子を正に制御している。YAP1/TAZ は LATS を介したリン酸化により抑制され、細胞質内にとどまる。細胞質内のリン酸化 YAP1/TAZ は、ユビキチン化とプロテアソーム分解を受け、細胞増殖に対する刺激作用が取り除かれる。

Hippo-YAP1 経路は、膀胱癌の腫瘍形成および進行の間に重要な役割を果たし、YAP1 発現の上昇は、膀胱癌の約 50% で起こり患者の予後不良と相關すると報告されている。これらの知見は、YAP1 が膀胱癌治療の有望な薬物ターゲットとなり得ることを示唆している。

本研究では、Hippo-YAP1 経路を介して膀胱癌細胞の増殖を抑制する低分子化合物の探索を行った。

【方法・結果】

YAP1/TAZ-TEAD レポーターシステムを用いて 29,049 の低分子化合物のライブラリーをスクリーニングし、YAP1 の強力な阻害剤としてカルバゾール化合物である *N*-(3,4-dimethoxyphenethyl)-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazol-1-amine (DMPCA) を同定した。

In vitro での膀胱癌細胞に対する DMPCA の効果を調べるために、各膀胱癌サブタイプを代表する細胞株 T24 (double negative type)、5637 (basal type)、KMBC-2 (luminal type) を用い、これらの細胞を 20 μ M DMPCA で 24 時間処理したところ、3 つの細胞株すべてで YAP1 および TAZ タンパク質の有意な減少が観察された (western blot 法)。また、DMPCA 処理した T24 細胞で、YAP1 S127、YAP1 S397 および TAZ S89 のリン酸化が時間依存的および用量依存的に増加することを明らかにした (western blot 法)。次に免疫蛍光染色を行い、DMPCA で処理した T24 細胞において、YAP1 が核から著しく排除された。また DMPCA は T24 細胞において、既知の TEAD 標的遺伝子である CTGF、CYR61、ANKRD1 および AMOT2 の転写を抑制することを qPCR にて確認した。

DMPCA で処理した T24 細胞で MST1/2 キナーゼと LATS1/2 キナーゼのリン酸化を western blot 法で観察し、LATS1 の T1079 でのリン酸化の有意な増加が観察されたが、MST1/2 の T183/180 でのリン酸化は増加しなかった。これらの結果は、DMPCA が MST1/2 非依存的に LATS1 のリン酸化を誘導し、YAP1/TAZ の分解と核移行を変化させることを示唆するものであった。

細胞数カウントにより、DMPCA が T24 細胞の生存率を 7 低下させることを確認した。この生存率の低下が細胞周期進行の障害によるものかどうかを判断するため、BrdU 取り込みアッセイをしたところ、DMPCA は BrdU 取り込みを有意に減少させた。さらに、Annexin V アッセイにて DMPCA が、T24 細胞の細胞死を増加させることを見出した。これらの結果は、DMPCA 処理した T24 細胞の生存率の低下が、細胞周期の進行の乱れと細胞死の増加の両方によるものであることを示唆している。

DMPCA の膀胱癌細胞株の増殖阻害効果が YAP1/TAZ に依存することを確認するため、我々が以前に作製した Yap1/Taz ダブルノックアウト (DKO) マウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) の不死化株を利用した。この Yap1/Taz DKO MEF 細胞および野生型 MEF 細胞を DMPCA で処理し、WST 細胞生存率アッセイにかけた。DMPCA は野生型 MEF の生存率を 60% 減少させたのに対して、Yap1/Taz DKO MEF 細胞の生存率には影響を与えたなかった。これらのことから、DMPCA による細胞生存率への影響は、Yap1/Taz に特異的であることが示唆された。

最後に、DMPCA の *in vivo* での膀胱癌細胞の増殖抑制効果を検討するために、T24 細胞を Balb/c ヌードマウスに皮下注射し、DMPCA を 2 日おきに 36 日間腹腔内投与した。その結果、DMPCA 投与により、腫瘍細胞の増殖がほぼ完全に抑制されることが明らかになった。切除した腫瘍の免疫組織化学的解析により、YAP1/TAZ の活性化（核内転位）が DMPCA 処理により阻害され、Ki67 の核内発現を減少させることを明らかにした。これらの観察結果は、DMPCA が YAP1/TAZ 活性を阻害するメカニズムを介して、*in vivo* で膀胱癌細胞の増殖を抑制することを示唆している。

【総括】

Hippo-YAP1 経路を標的とした低分子化合物のライブラリースクリーニングの結果、DMPCA を同定した。また、DMPCA が LATS のリン酸化を誘導し、次いで YAP1/TAZ のリン酸化を誘導することを明らかにし、*in vitro* および *in vivo* で膀胱癌細胞の増殖を阻害することを明らかにした。

本研究は、Hippo-YAP1 経路を介して膀胱癌細胞の増殖を抑制する低分子化合物について研究したものであるが、スクリーニングによりこれまでに解析をされたことのない DMPCA という新規化合物の膀胱癌に対する Hippo-YAP1 経路依存的な増殖抑制効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。