

令和 5 年度博士論文

転写共役因子 VGLL3 による  
がん悪性化機構の解析

千葉大学大学院医学薬学府

先端創薬科学専攻

分子薬物治療学講座 分子心血管薬理学研究室

堀 直人

# 目次

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| 序論                                                  | 2  |
| 第一章 VGLL3 による Hippo 経路活性化は細胞増殖を促進する                 |    |
| 1-1.VGLL family 発現株の作製                              | 4  |
| 1-2. VGLL3 発現株における細胞増殖促進と Hippo 経路活性化               | 6  |
| 1-3.VGLL3 と YAP/TAZ は結合配列及び標的遺伝子が異なる                | 8  |
| 1-4.VGLL3 は AMOTL2 と LATS2 の発現を誘導し Hippo 経路を活性化する   | 10 |
| 1-5.VGLL3 は TEAD1、TEAD3 を介して Hippo 経路を活性化する         | 12 |
| 1-6.内在性 VGLL3 は Hippo 経路を活性化する                      | 14 |
| 1-7.VGLL3 は Hippo 経路活性化を介して細胞増殖を促進する                | 17 |
| 第二章 VGLL3 は HMGA2 を発現させ EMT 様の形態変化を誘導する             |    |
| 2-1.VGLL3 は EMT 様の形態変化を誘導する                         | 19 |
| 2-2.VGLL3 は HMGA2 を誘導し EMT 様の形態変化を誘導する              | 21 |
| 2-3.VGLL3-TEAD4 複合体は HMGA2 を誘導し<br>EMT 様の形態変化を引き起こす | 23 |
| 2-4.VGLL3 は TGF- $\beta$ 刺激下流で EMT を誘導する            | 26 |
| 2-5.内在性 VGLL3 は EMT 様の形態変化を誘導する                     | 28 |
| 2-6.VGLL3 の発現はがんの予後不良に関与する                          | 31 |
| 総括                                                  | 33 |
| 実験方法                                                | 35 |
| 主要論文目録                                              | 41 |
| 参考文献                                                | 42 |
| 謝辞                                                  | 45 |

## 序論

高齢化の進む日本社会においては、今後3人に1人はがんで亡くなると予測されており、がんの発生や進展の分子機構の理解を深め、新規治療薬開発につなげることの重要性は未だ低下していない。

がんは正常細胞から遺伝子変異を起こした細胞が発生し、無秩序に増殖することで腫瘍を形成することが知られている [1]。がん細胞の特徴として、その高い増殖性と他臓器への浸潤・転移能が挙げられるが、そのメカニズムは未解明な部分が残されている[2] [3]。

VGLL family は TEAD に結合する VGLL1~4 から成る転写共役因子ファミリーで、様々ながん細胞において遺伝子発現の増加や遺伝子変異が報告されており、がんとの関連が予想されるが、その機能や制御機構は殆ど解明されていない[4]。

VGLL family と結合する転写因子である TEAD family は TEAD1~4 から成る転写因子ファミリーで、転写活性化領域に転写共役因子が結合することで活性化する。TEAD の機能として、転写共役因子である YAP/TAZ と結合し細胞増殖を促進することや浸潤・転移に関与する上皮間葉転換 (EMT : Epithelial-Mesenchymal transition) を誘導することが報告されている [5]。TEAD と YAP/TAZ についての解析が進んでいる一方で、TEAD に結合する転写共役因子である VGLL(Vestigial-like) family と TEAD の結合について機能が未解明である。

TEAD の調節に関わるシグナル伝達経路として Hippo 経路が知られている。Hippo 経路は、器官のサイズ制御に関連する経路として発見された経路であり、近年ではがん抑制経路として注目を集めるシグナル伝達経路である [6] [7]。

Hippo 経路の中心的構成因子はタンパク質キナーゼ LATS1/2 (large tumor suppressor kinase1/2) であり、LATS1/2 が活性化すると転写共役因子 YAP(Yes-associated protein)及び TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)のリン酸化を誘導し、YAP/TAZ のタンパク

質分解や核外排出を引き起こすことで、YAP/TAZ の活性を抑制する [8]。

YAP/TAZ は核内において転写因子 TEAD(TEA domain transcription factor)と結合し、TEAD を活性化することで標

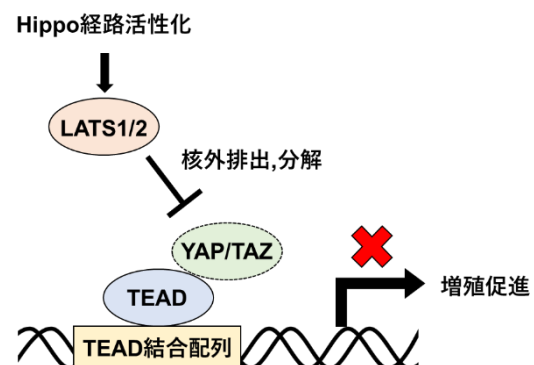


Fig.1 Hippo 経路活性化による増殖抑制

的遺伝子の発現を誘導して細胞増殖を促進する[9]。したがって、Hippo 経路が活性化すると、YAP/TAZ の抑制を介して TEAD が不活性化し、細胞増殖を抑制する(Fig.1)。一方、遺伝子変異などにより Hippo 経路が破綻すると、YAP/TAZ の恒常的活性化を導き、TEAD の異常活性化による細胞のがん化やがん悪性化を引き起こすことが知られている。このように Hippo 経路はがん抑制的にはたらくシグナル伝達経路として広く認識されている [10]。

がんの悪性化に関わる現象として上皮間葉転換 ( EMT : Epithelial-to-mesenchymal transition )が知られている(Fig.2)。EMT は細胞間接着が強く運動性の低い上皮系の細胞が細胞間接着が弱く運動性の高い間葉系の細胞へと形態を変化する現象を指す。EMT は、CDH1 によりコードされる細胞接着分子 E-cadherin の発現がジンクフィンガータンパク質 Snail、Slug により抑制されることで誘導される[11]。EMT が誘導されることでがんの浸潤・転移が促進されることが報告されている[12][13]。

VGLL ファミリーの中でも特に、VGLL メンバーの 1 つである VGLL3 については、Soft tissue sarcoma における遺伝子増幅や、胃がんや卵巣がんにおける高発現と不良な予後との相関が報告されており、VGLL3 が発がんに関与している可能性が考えられている [14] [15]。しかしながら、YAP/TAZ に比べ、VGLL の機能についてはほとんど解析が進んでいないのが現状である。TEAD の活性化異常ががん化に寄与することを考えると、VGLL と TEAD や Hippo 経路の関係性の解明は重要である。そこで本研究では、ヒトがん細胞株を用いた VGLL の機能解析を目的とした。

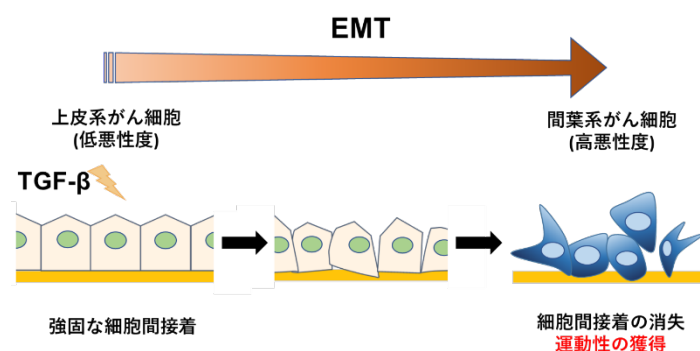


Fig.2 EMT によるがん悪性化

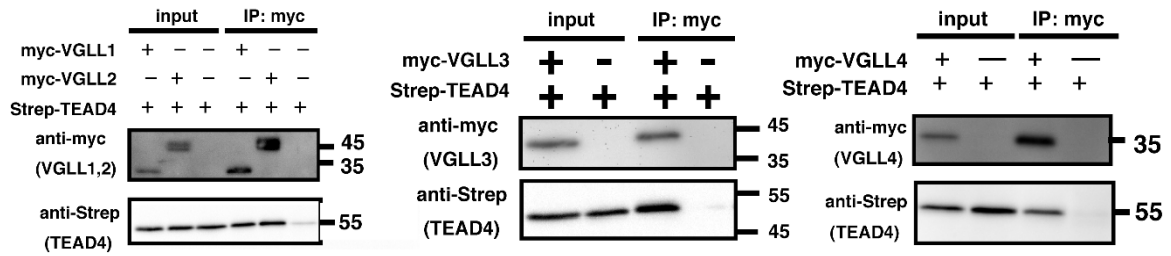
## 第一章 VGLL3 による Hippo 経路活性化は細胞増殖を促進する

### 1-1.VGLL family 発現株の作製

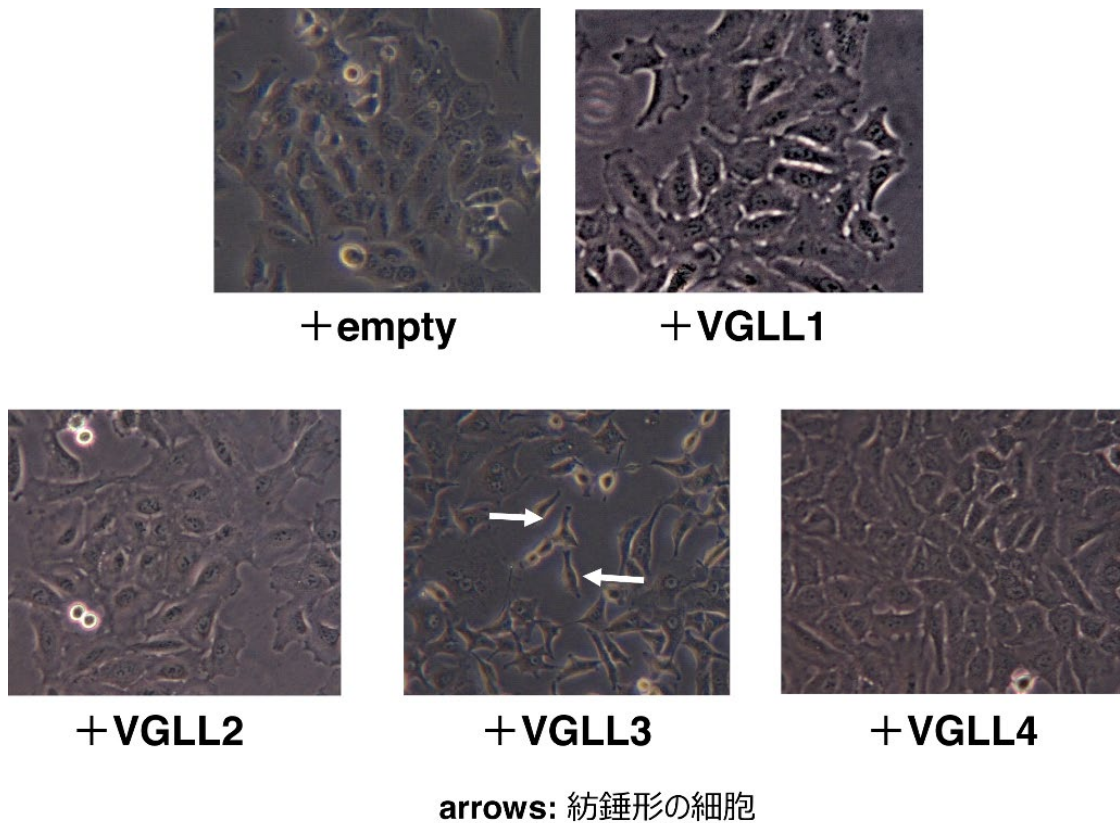
VGLL family はショウジョウバエで発見された遺伝子 Vg(Vestigial)のオルソログであり、TONDU ドメインを介して転写因子 TEAD と結合すると考えられる転写共役因子である[16][17]。しかしながら、VGLL と TEAD の結合や機能については殆ど報告されていない。そこで、初めに VGLL family と TEAD の結合について解析を行った。myc タグを付加した VGLL family と Strep タグを付加した代表的な TEAD family タンパクである TEAD4 をアフリカミドリザル腎線維芽細胞株 COS-1 に共発現させ、抗 myc 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、VGLL family いずれを発現させた際にも TEAD4 が共沈された (Fig.3A)。以上から、VGLL family と TEAD が結合する事が分かった。

次に VGLL family とがん悪性化の関連について解析を行うため、ヒト肺基底上皮線がん細胞株 A549 を用いて VGLL family の発現株を樹立した。その結果、VGLL1,VGLL2,VGLL4 と異なり VGLL3 発現株において細胞が間葉系様の形態変化を示すことを見出した (Fig.3B)。この結果から、VGLL3 は特異的な機能を有していると考え、VGLL3 に着目した。

A



B



**Fig.3 VGLL 発現株の作製**

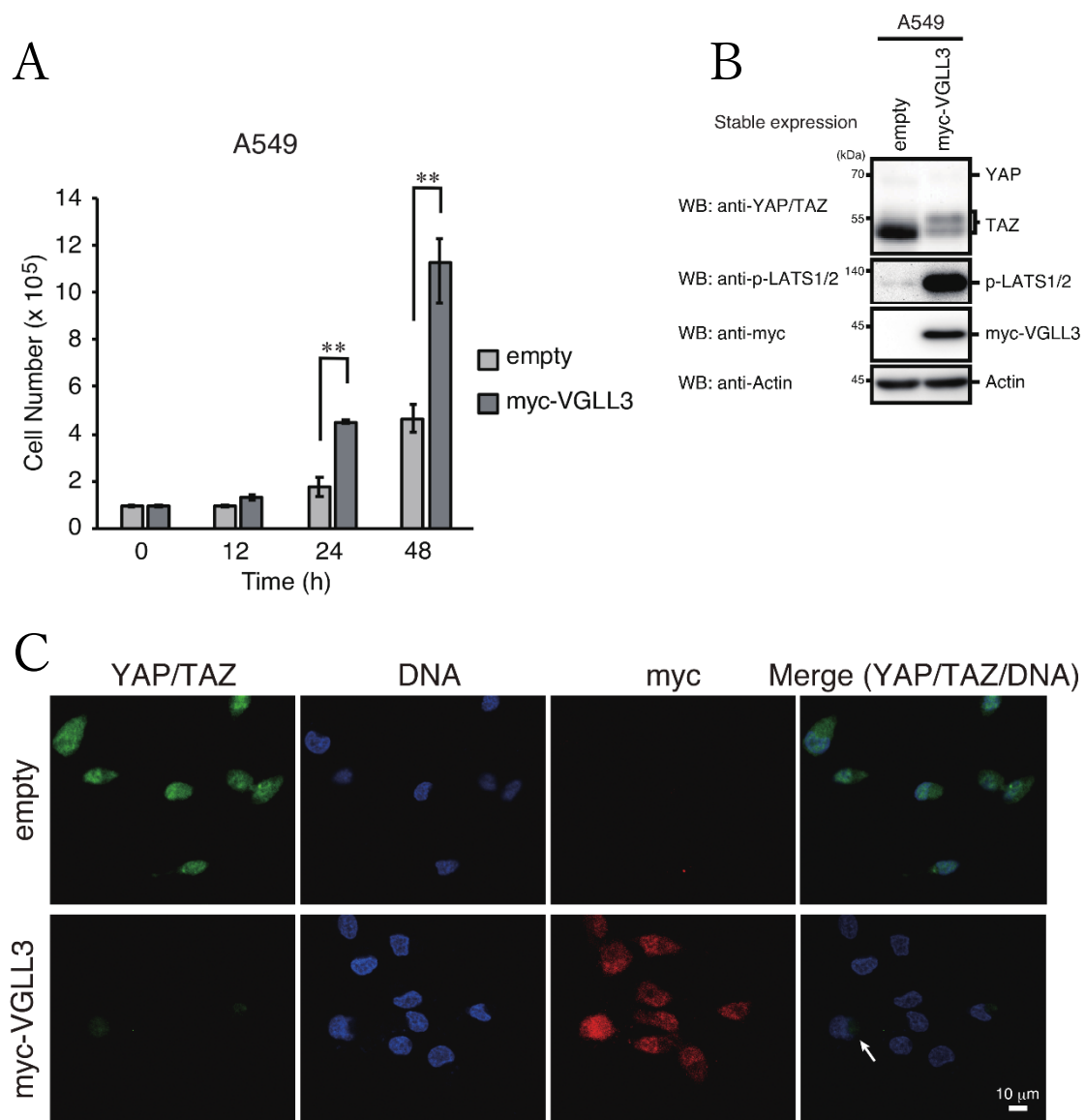
A: COS-1 細胞に myc タグを付加した VGLL ファミリーと Strep タグを付加した TEAD4 を共発現させて抗 myc 抗体で免疫沈降を行った。

B: A549 細胞に空ベクターおよび VGLL ファミリーの発現株を作製した際の形態を撮影した。VGLL3 発現株における紡錘形の形態変化を矢印で示した。

## 1-2.VGLL3 発現株における細胞増殖促進と Hippo 経路活性化

初めに、VGLL3 発現株において増殖性に変化が見られるかを確認するため、セルカウントを行った。VGLL3 発現株と空ベクター株を比較したところ、VGLL3 発現株において 24 時間、48 時間時点での細胞数が優位に増加した。このことから、VGLL3 発現株において細胞の増殖性が増加することが分かった (Fig.4A)。

VGLL3 が結合する転写因子である TEAD は YAP/TAZ と結合する事で標的遺伝子の発現を誘導し、細胞増殖を誘導する事が知られている[18]。Hippo 経路は、セリンスレオニンキナーゼである LATS1/2 の活性化を介して YAP/TAZ の核外排出を制御し、YAP/TAZ-TEAD を介した細胞増殖を抑制するシグナル伝達経路である。VGLL3 発現株において細胞増殖が促進されていたことから、VGLL3 発現株では Hippo 経路が抑制されていると予想した。VGLL3 発現株において Hippo 経路関連タンパク質の発現量を western blotting により確認したところ、予想に反し、VGLL3 発現株において Hippo 経路活性化に伴い増加する LATS のリン酸化量が増加し、YAP/TAZ の量が減少した (Fig.4B)。また、Hippo 経路の活性化により YAP/TAZ の核外排出が誘導される事が知られているため[19]、VGLL3 発現株について YAP/TAZ の局在を確認した。VGLL3 発現株において免疫染色を行ったところ、YAP/TAZ の核外排出が見られた (Fig.4C)。以上の結果から、VGLL3 発現株において Hippo 経路が活性化されることが分かった。



**Fig.4 VGLL3 発現株の解析**

A: VGLL3 発現株と空ベクター株で 24 時間,48 時間後にセルカウントを行った。(\*\*,  $p < 0.01$ )

B: VGLL3 発現株と空ベクター株で YAP/TAZ タンパク量と LATS のリン酸化量の比較を行った。

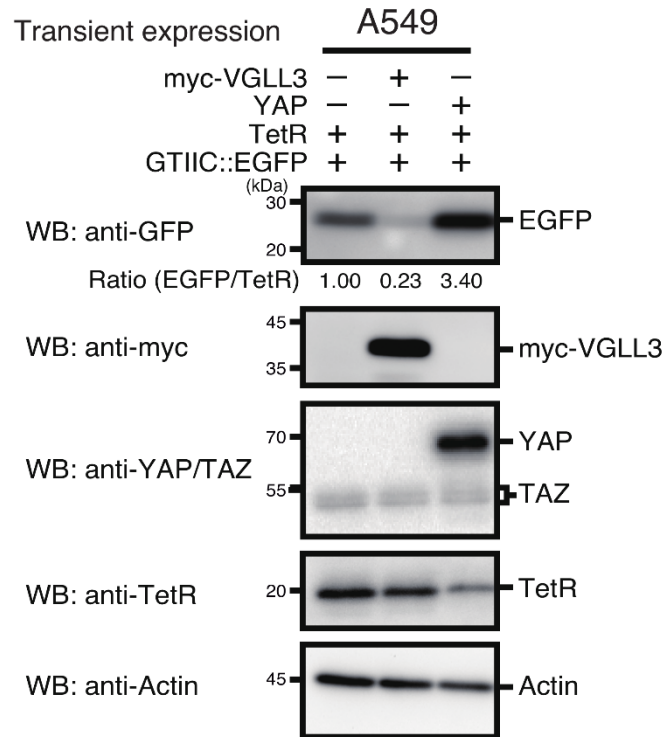
C: VGLL3 発現株と空ベクター株で YAP/TAZ の免疫染色を行った。VGLL3 発現株における YAP/TAZ の細胞質局在を矢印で示した。

### 1-3.VGLL3 と YAP/TAZ は結合配列及び標的遺伝子が異なる

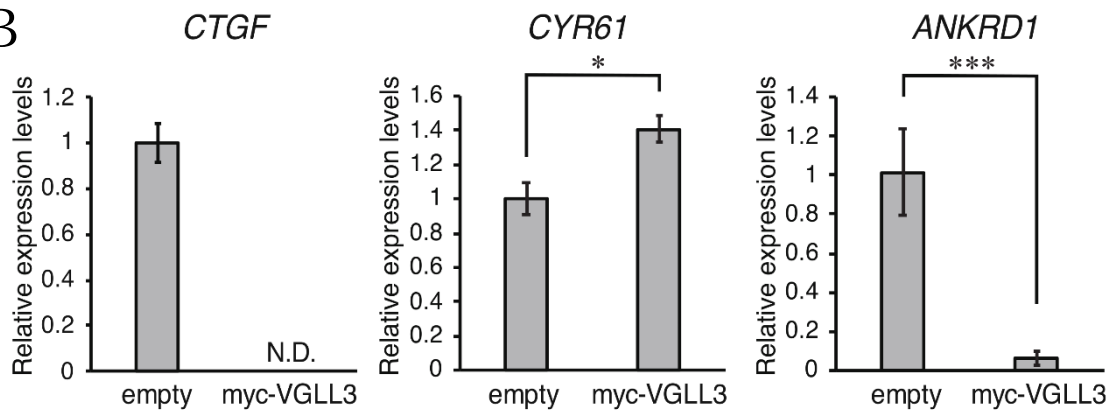
VGLL と YAP は TEAD の同一の部位に結合する事が知られているため[16]、VGLL3-TEAD 複合体と YAP/TAZ-TEAD 複合体の DNA 結合配列が同一か検討した。YAP/TAZ-TEAD 複合体の DNA 結合配列として知られる GTIIC 配列 [20][21]の下流で GFP を発現するレポータープラスミドを用いてレポーターアッセイを行ったところ、YAP とレポータープラスミドを導入した際には GFP が増加する一方で、VGLL3 とレポータープラスミドを導入した際には GFP 量の増加は認められなかった (Fig.5A)。以上から、VGLL3-TEAD 複合体と YAP/TAZ-TEAD 複合体の DNA 結合配列が異なる事が示唆された。

DNA 結合配列が異なる場合、標的遺伝子にも変動が見られると予想し、YAP/TAZ-TEAD 複合体の標的遺伝子の発現量について解析を行った。代表的な YAP/TAZ-TEAD 複合体の標的遺伝子として知られる CTGF(Connective Tissue Growth Factor)、CYR61(Cysteine Rich Angiogenic Inducer 61)、ANKRD1(Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein 1)[22]についてリアルタイム PCR 法により mRNA 量を測定したところ、VGLL3 発現株において空ベクター株に比べ CYR61 の mRNA 量はわずかな増加が見られた一方で、CTGF と ANKRD1 の mRNA 量は顕著に減少した (Fig.5B)。この結果から、VGLL3-TEAD 複合体の標的遺伝子は YAP/TAZ-TEAD 複合体の標的遺伝子と部分的に共通する可能性があるが、大部分が異なる事が示された。以上の結果から、VGLL3-TEAD 複合体は YAP/TAZ-TEAD 複合体と DNA 結合配列が異なり、異なる標的遺伝子を制御する事が示唆された。

A



B



**Fig.5 VGLL3 標的遺伝子の解析**

A: YAP-TEAD 複合体が結合する GTIIC 配列(ACATTCCA)に TEAD が結合することで GFP を発現するプラスミドを用いて VGLL3 一過性発現と YAP 一過性発現でレポーターアッセイを行った。TetR はトランスフェクションコントロール。

B: VGLL3 発現株と空ベクター株で YAP/TAZ 標的遺伝子の mRNA 量を定量した。(\*,  $p < 0.05$ 、\*\*\*,  $p < 0.001$ )

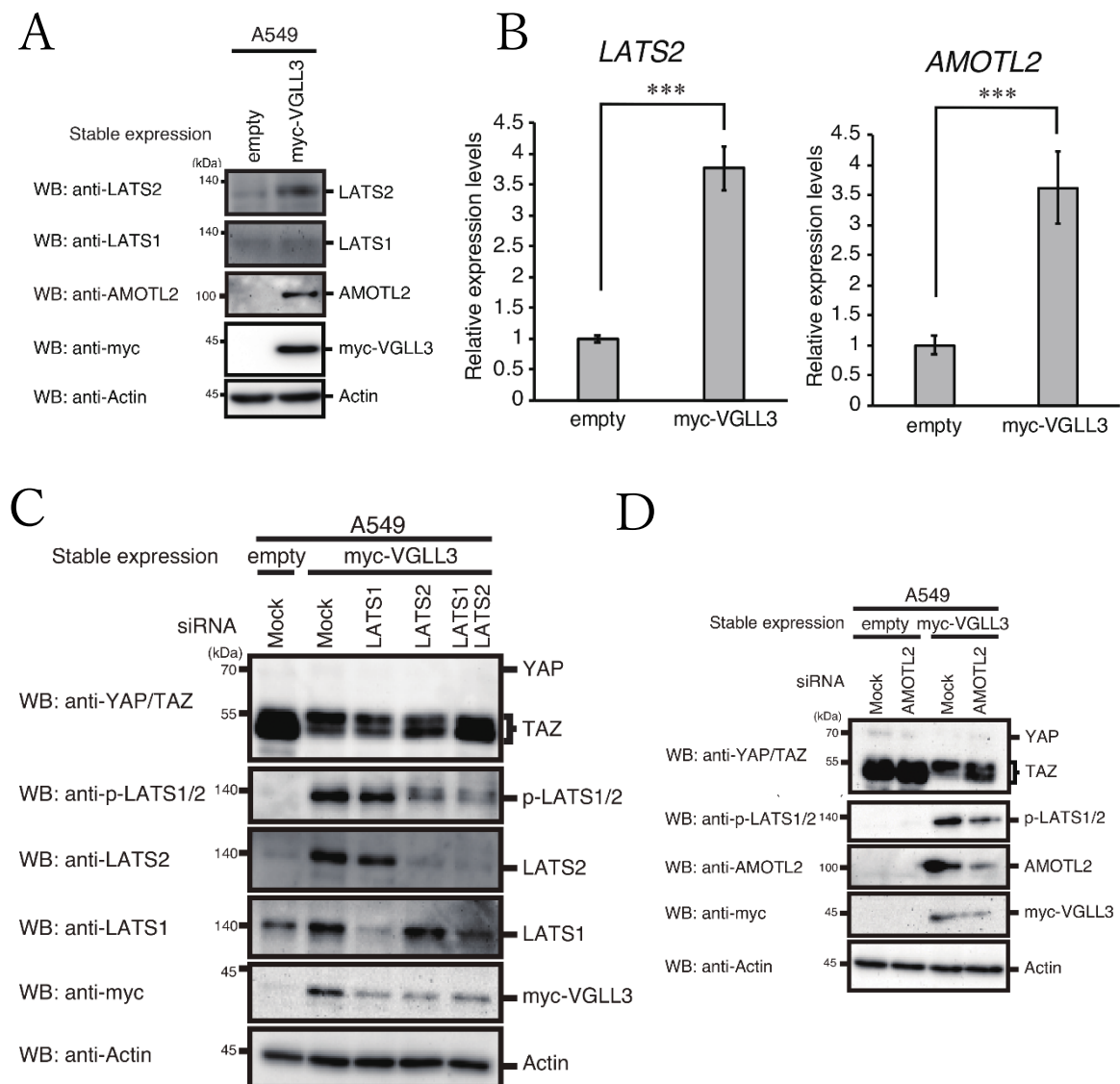
#### 1-4.VGLL3 は AMOTL2 と LATS2 の発現を誘導し Hippo 経路を活性化する

次に、VGLL3 発現株における Hippo 経路活性化機構の解析を行った。VGLL3 発現株と空ベクター株について RNA-seq を行い、VGLL3 発現株において発現が増加し、Hippo 経路活性化に関与すると考えられる遺伝子として LATS2 と AMOTL2(Angiomotin-like 2)を見出した。AMOTL2 は LATS2 に結合して Hippo 経路を活性化する機能や YAP/TAZ に直接結合して細胞質保持する機能が報告されている[23][24]。

VGLL3 発現株において LATS2 と AMOTL2 の発現量が実際に増加するか確認した。western blotting により LATS2、AMOTL2 のタンパク量について確認したところ、いずれも空ベクター株に比べ VGLL3 発現株において増加した

(Fig.6A)。また、リアルタイム PCR 法により LATS2、AMOTL2 の mRNA 量を確認したところ、いずれも空ベクター株に比べ VGLL3 発現株において mRNA 量が増加した (Fig.6B)。以上から、VGLL3 発現株において LATS2、AMOTL2 の転写が誘導されることが分かった。

次に、LATS2 と AMOTL2 が VGLL3 発現株における Hippo 経路活性化に寄与があるか調べた。VGLL3 発現株において siRNA を用いて LATS1/2 のノックダウンを行い、western blotting によりタンパク量の解析を行ったところ、LATS1 のノックダウンでは YAP/TAZ の変動が見られない一方で、LATS2 のノックダウンにより TAZ のタンパク量が回復した (Fig.6C)。同様に、VGLL3 発現株において siRNA を用いて AMOTL2 のノックダウンを行い、western blotting によりタンパク量の解析を行ったところ、AMOTL2 のノックダウンにより TAZ のタンパク量が回復し、LATS のリン酸化が減少した (Fig.6D)。以上の結果から、VGLL3 発現株において LATS2 と AMOTL2 の誘導を介した Hippo 経路活性化が起こる事が分かった。



**Fig.6 VGLL3 による Hippo 経路活性化メカニズムの解析**

A: VGLL3 発現株と空ベクター株における LATS2,AMOTL2 のタンパク量を比較した。

B: VGLL3 発現株と空ベクター株における LATS2,AMOTL2 の mRNA 量を定量した。 (\*\*\*,  $p < 0.001$ )

C: VGLL3 発現株において LATS を siRNA により 48 時間ノックダウンした際のタンパク量を比較した。

D: VGLL3 発現株および空ベクター株において AMOTL2 を siRNA により 48 時間ノックダウンした際のタンパク量を比較した。

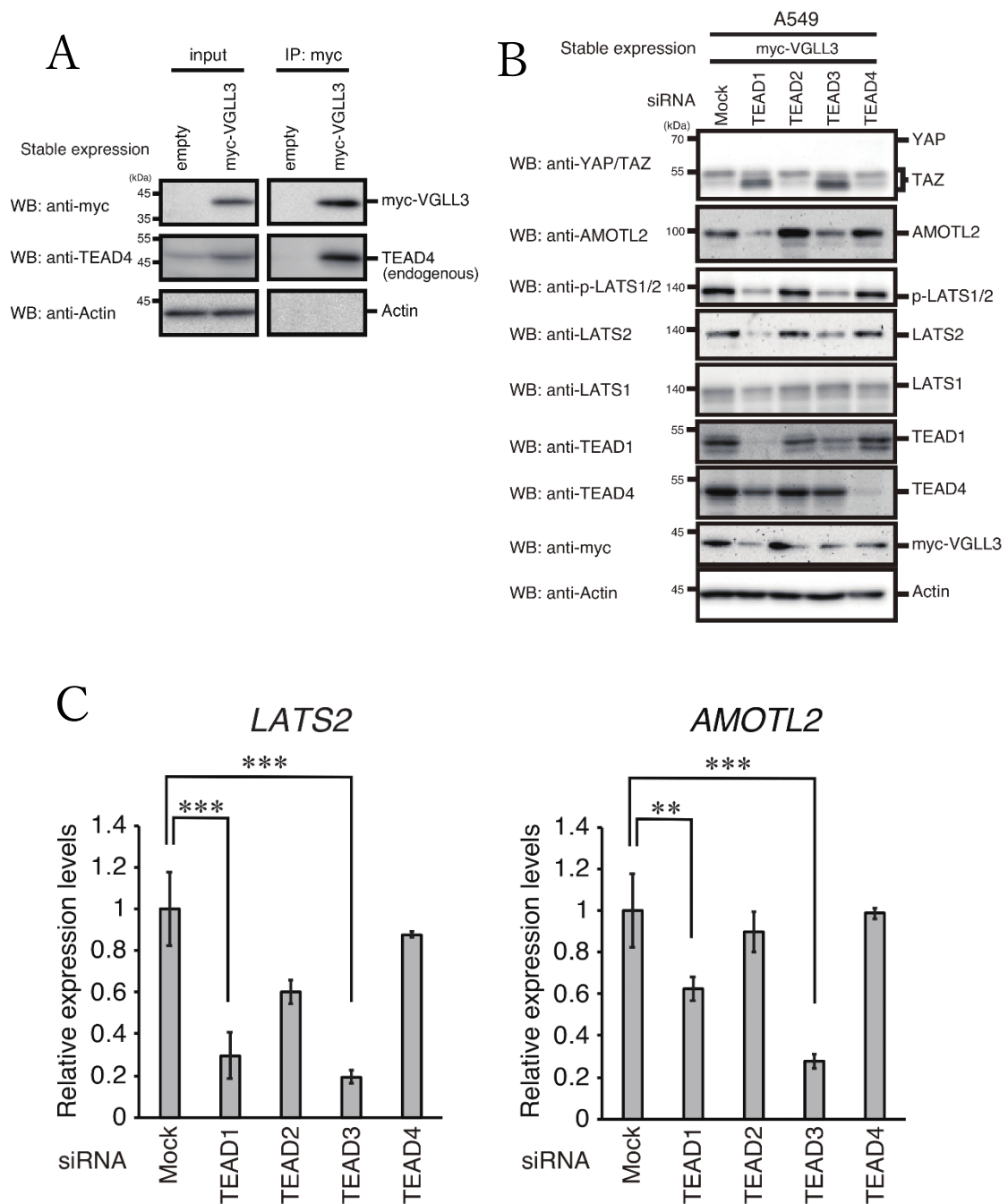
### 1-5.VGLL3 は TEAD1、TEAD3 を介して Hippo 経路を活性化する

VGLL3 は TEAD と結合し転写を誘導することが知られているため、VGLL3 発現株においても同様に TEAD と VGLL3 が結合するか確認した。VGLL3 発現株と空ベクター株において抗 myc 抗体を用いた免疫沈降を行った所、VGLL3 発現株において TEAD4 が共沈された (Fig.7A)。従って、VGLL3 発現株においても VGLL3 は TEAD と結合する事が分かった。

次に、VGLL3 発現株における Hippo 経路活性化は TEAD を介しているか調べた。VGLL3 の発現株において siRNA を用いて TEAD1~4 をそれぞれノックダウンし、western blotting によりタンパク量を確認したところ、TEAD1、TEAD3 をノックダウンした際に VGLL3 発現株において TAZ が回復し、LATS のリン酸化量が減少した (Fig.7B)。したがって、VGLL3 発現株において TEAD1、TEAD3 を介して Hippo 経路の活性化が起こる事が分かった。

また、VGLL3 発現株における Hippo 経路活性化は LATS2、AMOTL2 を介していると考えられるため、これらの発現誘導に VGLL3-TEAD 複合体が寄与するかを検討した。VGLL3 発現株において、siRNA を用いた TEAD のノックダウンを行った際の LATS2、AMOTL2 の発現量を確認すると、TEAD1、TEAD3 のノックダウンにより LATS2、AMOTL2 の発現量が減少することが分かった

(Fig.7B)。同様に、VGLL3 発現株において TEAD のノックダウンを行った際の LATS2、AMOTL2 の mRNA 量をリアルタイム PCR 法によって確認したところ、TEAD1、TEAD3 のノックダウンにより LATS2、AMOTL2 の mRNA 量が減少することが分かった (Fig.7C)。以上の結果から、VGLL3 は TEAD1、TEAD3 を介して LATS2、AMOTL2 の発現を誘導する事で Hippo 経路を活性化することが分かった。



**Fig.7 VGLL3 発現株における TEAD の機能解析**

A: VGLL3 発現株において myc で免疫沈降を行い、内在性 TEAD4 の共沈を確認した。

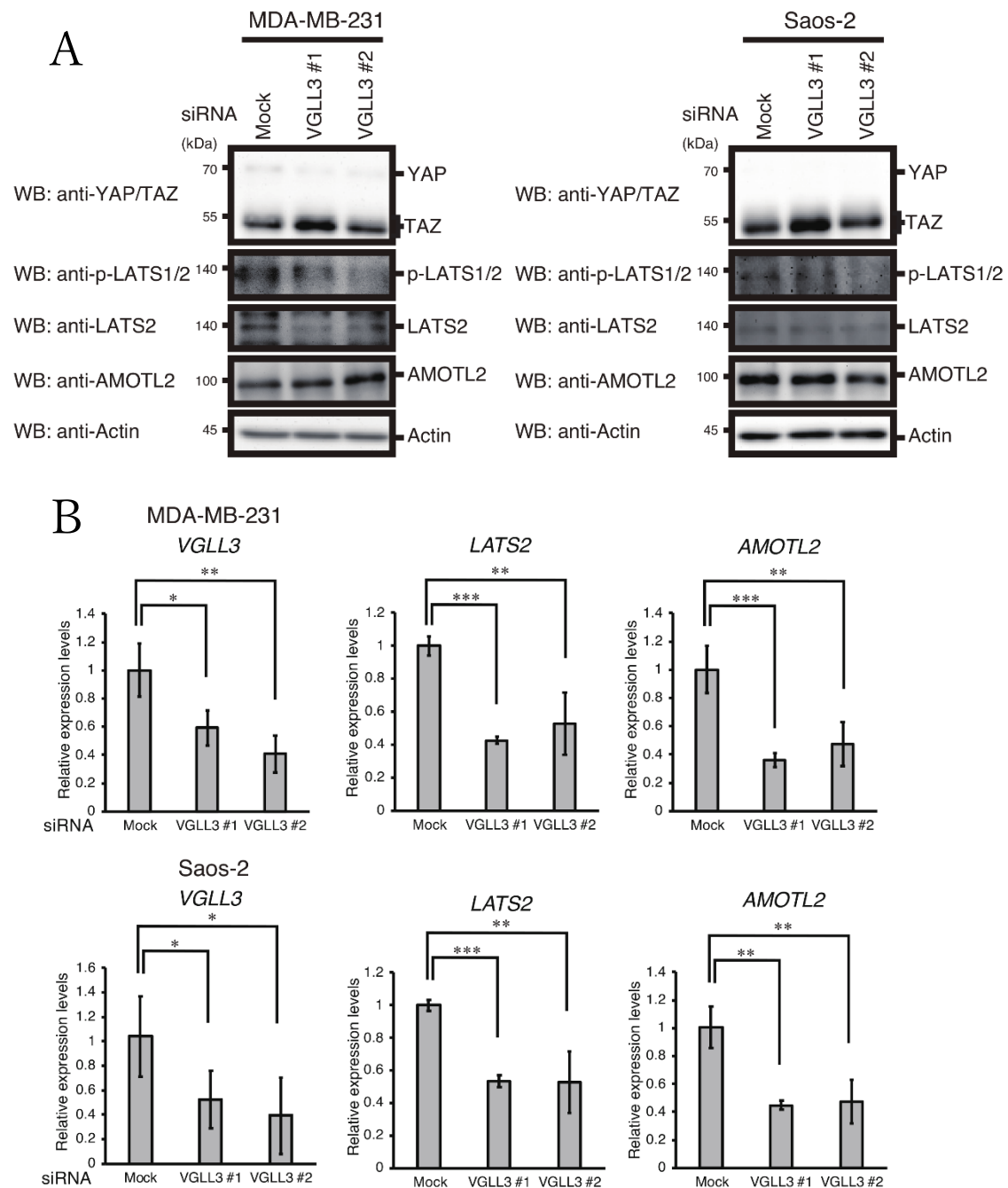
B: VGLL3 発現株において siRNA を用いて 48 時間 TEAD をノックダウンした際のタンパク量を比較した。

C: VGLL3 発現株において siRNA を用いて 48 時間 TEAD をノックダウンした際の LATS2,AMOTL2 の mRNA 量を比較した。(\*\*,  $p<0.01$ 、\*\*\*,  $p<0.001$ )

## 1-6.内在性 VGLL3 は Hippo 経路を活性化する

VGLL3 発現株において、VGLL3 は TEAD1、TEAD3 を介して LATS2、AMOTL2 を誘導する事で Hippo 経路を活性化することが分かったため、次に内在性 VGLL3 の発現量が高い細胞においても同様に Hippo 経路の活性化が起こるか検討した。

遺伝子発現データベースから、VGLL3 は間葉系の細胞において発現が多いことが分かったため、ヒト間葉系乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞とヒト骨肉腫細胞 Saos-2 を用いて解析を行った。これら 2 種の細胞において、siRNA を用いた VGLL3 のノックダウンを行い、western blotting により Hippo 経路関連タンパク量について確認したところ、いずれの細胞においても VGLL3 のノックダウンにより LATS のリン酸化量の減少及び TAZ の回復が見られた (Fig.8A)。また、siRNA を用いて VGLL3 のノックダウンを行い、mRNA 量をリアルタイム PCR 法によって確認したところ、VGLL3 のノックダウンにより LATS2、AMOTL2 の mRNA 量が減少した (Fig.8B)。更に、VGLL3 のノックダウンを行った際の YAP/TAZ の核内蛍光について免疫染色を行い定量したところ、VGLL3 のノックダウンにより YAP/TAZ の核内に局在する YAP/TAZ の量がいずれの細胞においても増加した (Fig.8C,8D)。以上の結果から、VGLL3 は内在性レベルにおいても Hippo 経路活性化を誘導する事が分かった。

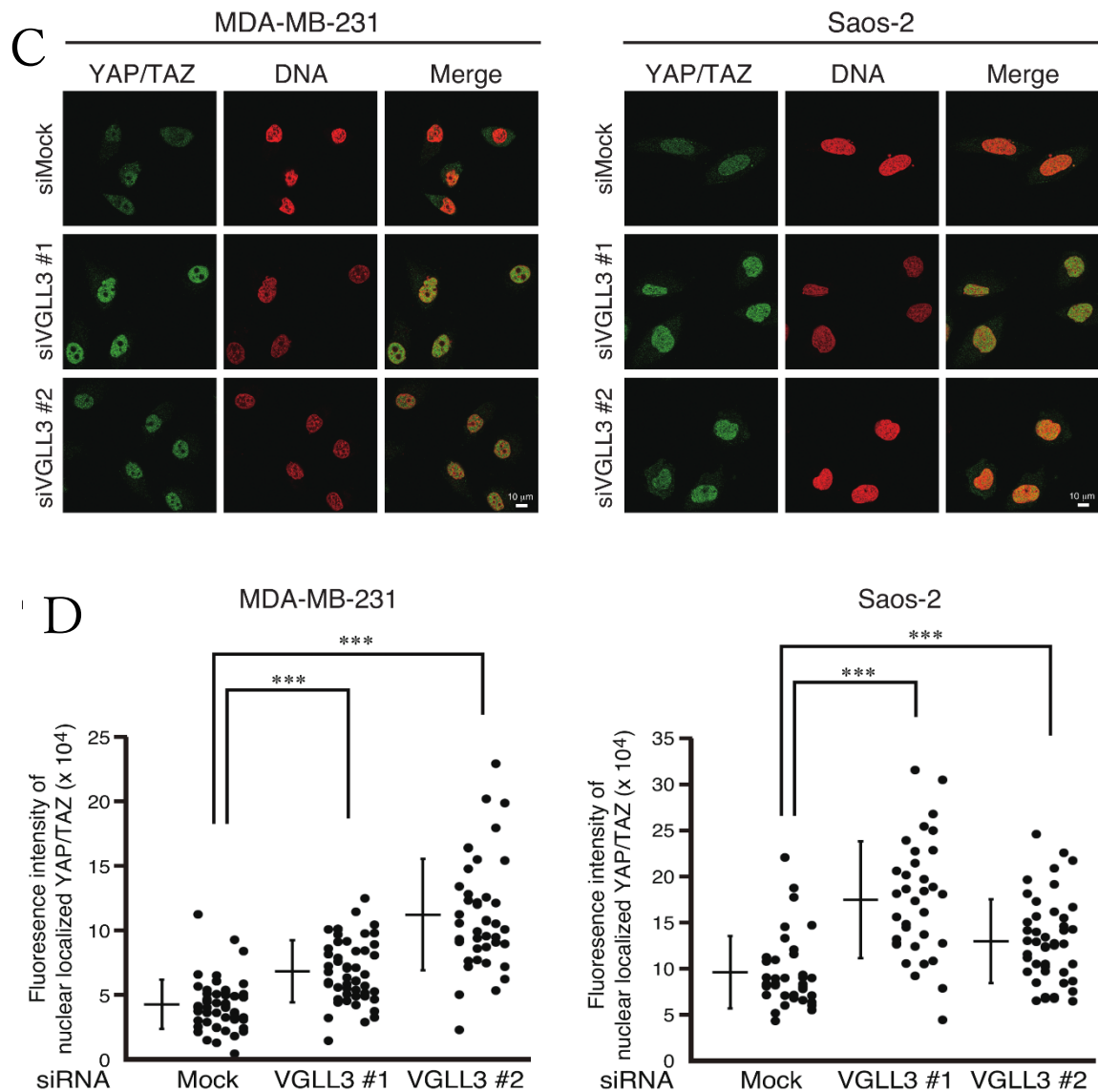


**Fig.8 内在性 VGLL3 の Hippo 経路への寄与の解析**

A: MDA-MB-231, Saos-2 において siRNA を用いて 72 時間 VGLL3 をノックダウンした際のタンパク量を比較した。

B: MDA-MB-231, Saos-2 において siRNA を用いて 48 時間 VGLL3 をノックダウンした際の VGLL3, LATS2, AMOTL2 の mRNA 量を比較した

(\* ,  $p < 0.05$ 、 \*\* ,  $p < 0.01$ 、 \*\*\* ,  $p < 0.001$ )



**Fig.8 内在性 VGLL3 の Hippo 経路への寄与の解析**

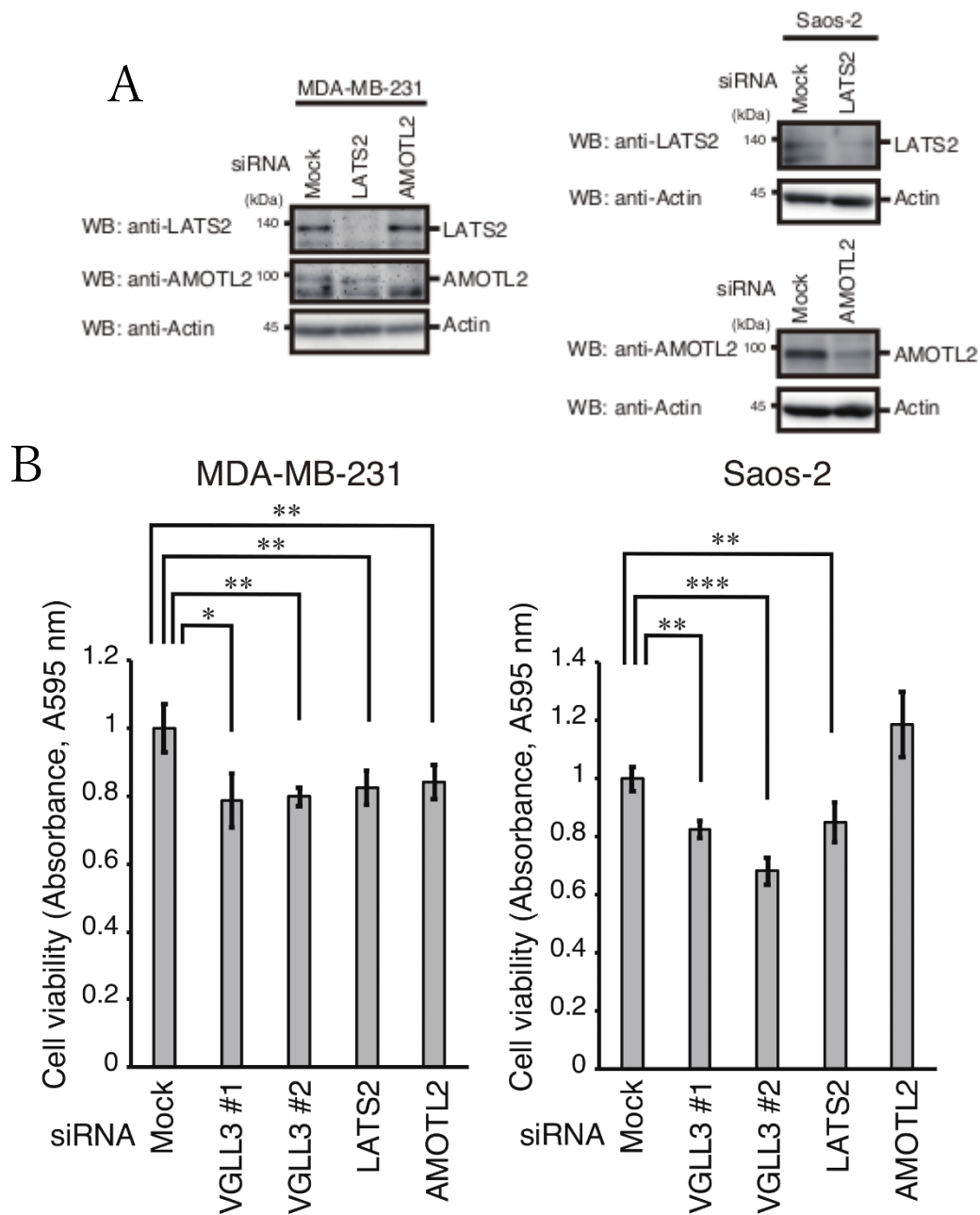
C: MDA-MB-231, Saos-2 において siRNA を用いて 72 時間 VGLL3 をノックダウンした際の YAP/TAZ の局在を比較した。

D: MDA-MB-231, Saos-2 において siRNA を用いて 72 時間 VGLL3 をノックダウンした際の YAP/TAZ 核内蛍光量をそれぞれ定量して比較した。(\*\*\*,  $p < 0.001$ )

### 1-7.VGLL3 は Hippo 経路活性化を介して細胞増殖を促進する

Hippo 経路はがん抑制経路として知られているが、VGLL3 発現株においては Hippo 経路が活性化しているにもかかわらず細胞増殖が促進していたため、VGLL3 による Hippo 経路活性化と細胞増殖促進の関連について解析を行った。

内在性で VGLL3 による Hippo 経路活性化が見られた MDA-MB-231 細胞と Saos-2 細胞を用い、VGLL3 及び Hippo 経路活性化に関与する LATS2、AMOTL2 を siRNA によりノックダウンした際の生細胞数を MTT assay により評価した。その結果、MDA-MB-231 細胞においては VGLL3、LATS2、AMOTL2 のノックダウンにより生細胞数が減少し、Saos-2 細胞においては VGLL3 と LATS2 のノックダウンにより生細胞数が減少した (Fig.9A,9B)。以上の結果から、VGLL3 と LATS2、AMOTL2 は MDA-MB-231 細胞と Saos-2 細胞の増殖に必要であることが明らかとなった。更に VGLL3 による LATS2、AMOTL2 の発現誘導を介した Hippo 経路活性化は既知の増殖抑制的な機能と異なり、増殖促進的に機能することが示唆された。



**Fig.9 内在性 VGLL3 による Hippo 経路活性化の増殖への寄与の解析**

A: MDA-MB-231、Saos-2 において siRNA を用いて 72 時間 LATS2、AMOTL2 をノックダウンした際のノックダウン効率を確認した。

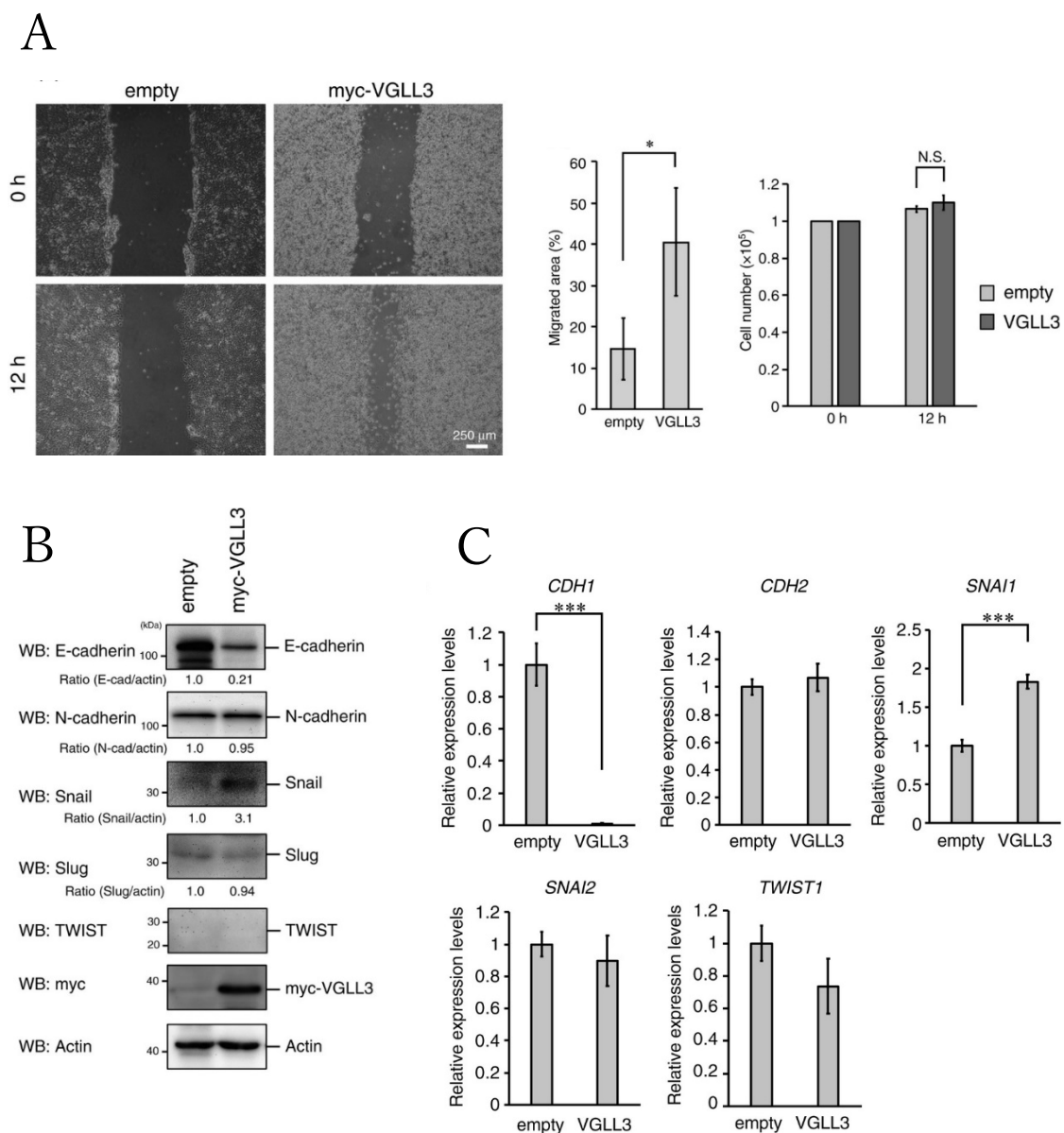
B: MDA-MB-231、Saos-2 において siRNA を用いて 72 時間 VGLL3、LATS2、AMOTL2 をノックダウンした際の生細胞数を MTT アッセイにより比較した。(\*,  $p < 0.05$ 、\*\*,  $p < 0.01$ 、\*\*\*,  $p < 0.001$ )

## 第二章 VGLL3 は HMGA2 を発現させ EMT 様の形態変化を誘導する

### 2-1.VGLL3 は EMT 様の形態変化を誘導する

がんの浸潤・転移に関連する現象として上皮間葉転換( EMT : Epithelial-to-mesenchymal transition )が知られている。EMT は細胞間接着が強く運動性の低い上皮系の細胞が細胞間接着が弱く運動性の高い間葉系の細胞へと形態を変化する現象を指し、EMT が誘導されることで浸潤・転移能が上昇することが報告されている。VGLL3 発現株において細胞が細長く伸び、重なるように増殖する間葉系様の形態変化が認められたことから (Fig.3B)、VGLL3 が上皮間葉転換に関与すると予想し解析を行った。

初めに、VGLL3 の運動性への寄与を解析するため、スクラッチアッセイを行ったところ、空ベクター株に比べ VGLL3 発現株において運動性が上昇することが分かった (Fig.10A)。また、空ベクター株と VGLL3 発現株において western blotting により EMT 関連タンパクの発現量を確認したところ、VGLL3 発現株において上皮細胞マーカーE-cadherin の減少と間葉細胞マーカーSnail の増加が見られた (Fig.10B)。また、VGLL3 発現株においてリアルタイム PCR により EMT 関連遺伝子の mRNA 量を確認したところ、VGLL3 発現株において CDH1(E-cadherin)の減少及び SNAI1(Snail)の増加が見られた (Fig.10C)。一方で、他の EMT マーカーの発現量はタンパク量、mRNA 量共に変動が見られなかった。以上の結果から、VGLL3 発現株において EMT 様の形態変化が起こることが示唆された。



**Fig.10 VGLL3 発現株における EMT 関連遺伝子の発現**

A: VGLL3 発現株と空ベクター株の運動性をスクラッチアッセイを行い比較した。(\*,  $p < 0.05$ )

B: VGLL3 発現株と空ベクター株における EMT 関連タンパク質の量を比較した。

C: VGLL3 発現株と空ベクター株における EMT 関連遺伝子の mRNA 量を定量した。(\*\*\*,  $p < 0.001$ )

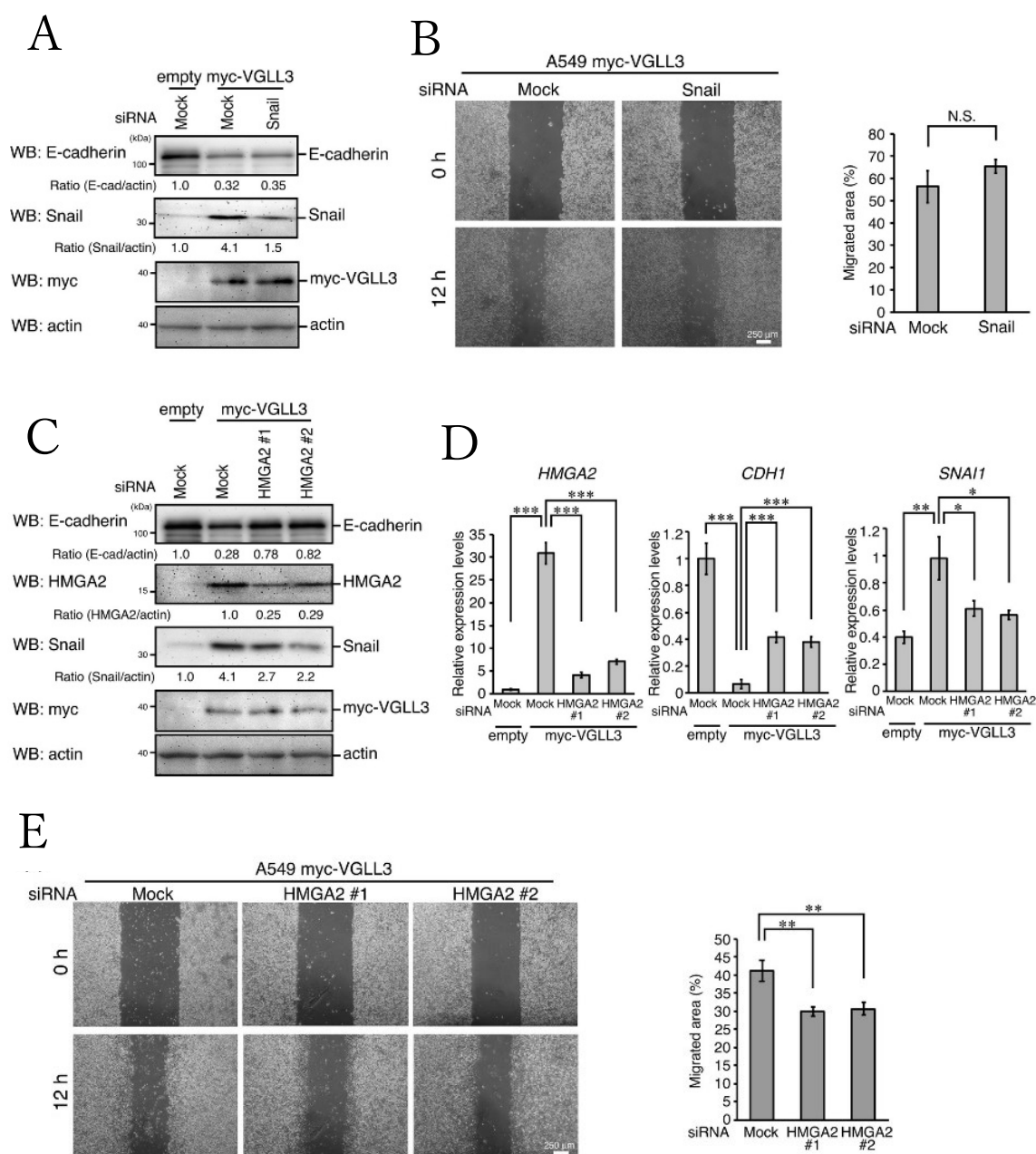
### 3-2.VGLL3 は HMGA2 を誘導し EMT 様の形態変化を誘導する

次に、VGLL3 発現株における形態変化のメカニズムについて解析を行った。VGLL3 発現株において EMT 誘導因子として知られる Snail の発現量が増加していたことから、VGLL3 発現株における形態変化に Snail が関与するのではないかと予想した。VGLL3 発現株において siRNA を用いて Snail のノックダウンを行い、western blotting によりタンパク量を確認したところ、予想に反し Snail のノックダウンで上皮細胞マーカー E-cadherin の回復は認められなかった。

(Fig.11A) Snail をノックダウンした際の運動性についてスクラッチアッセイを行い確認したところ、運動性に変化は見られなかった。(Fig.11B)以上の結果から、VGLL3 発現株における EMT 様の形態変化に Snail が関与しないことが分かった。

VGLL3 発現株と空ベクター株について行った RNA-seq から、VGLL3 発現株で発現が増加し、EMT に関与することが報告されている DNA 結合タンパク HMGA2(High-mobility group AT hook 2)[25][26]に着目した。実際に VGLL3 発現株において HMGA2 の発現増加が見られるか western blotting により確認したところ、空ベクター株に比べ VGLL3 発現株でタンパク量の増加が見られた

(Fig.11C)。同様に、HMGA2 の mRNA 量をリアルタイム PCR 法により確認したところ、VGLL3 発現株において増加が見られた (Fig.11D)。そこで、HMGA2 の発現が VGLL3 発現株における EMT 様の形態変化に寄与があるかを調べるために、HMGA2 のノックダウンを行い、western blotting によりタンパク量を確認したところ、HMGA2 ノックダウンにより E-cadherin の回復及び Snail の減少が見られた (Fig.11C)。同様に VGLL3 発現株において HMGA2 のノックダウンを行い mRNA 量を確認したところ、HMGA2 ノックダウンにより CDH1 の回復及び SNAI1 の減少が見られた (Fig.11D)。更に、HMGA2 が VGLL3 発現株の運動性に寄与があるか解析するために HMGA2 をノックダウンし、スクラッチアッセイを行った所運動性の減少が見られた (Fig.11E)。以上の結果から、VGLL3 は HMGA2 の発現誘導を介して EMT 様の形態変化を誘導することが示唆された。



**Fig.11 VGLL3 発現株における運動性上昇機構の解析**

A: VGLL3 発現株において siRNA を用いて Snail をノックダウンした際のタンパク量を比較した。

B: VGLL3 発現株において siRNA を用いて Snail をノックダウンした際の運動性を比較した。

C: VGLL3 発現株において siRNA を用いて HMGA2 をノックダウンした際のタンパク量を比較した。

D: VGLL3 発現株において siRNA を用いて HMGA2 をノックダウンした際の mRNA 量を比較した。(\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ )

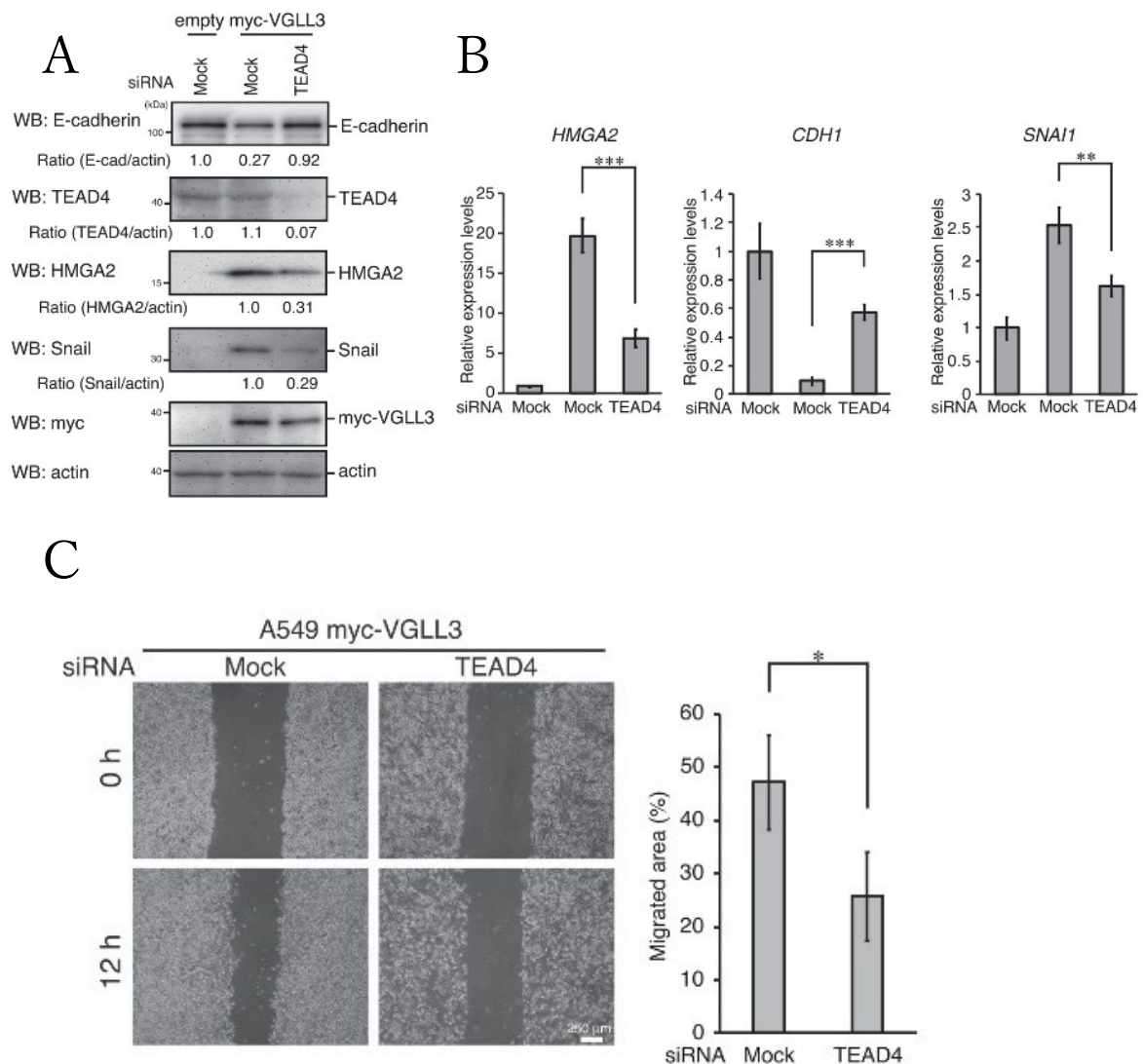
E: VGLL3 発現株において siRNA を用いて HMGA2 をノックダウンした際の運動性を比較した。(\*\*,  $p < 0.01$ )

### 2-3.VGLL3-TEAD4 複合体は HMGA2 を誘導し EMT 様の形態変化を引き起こす

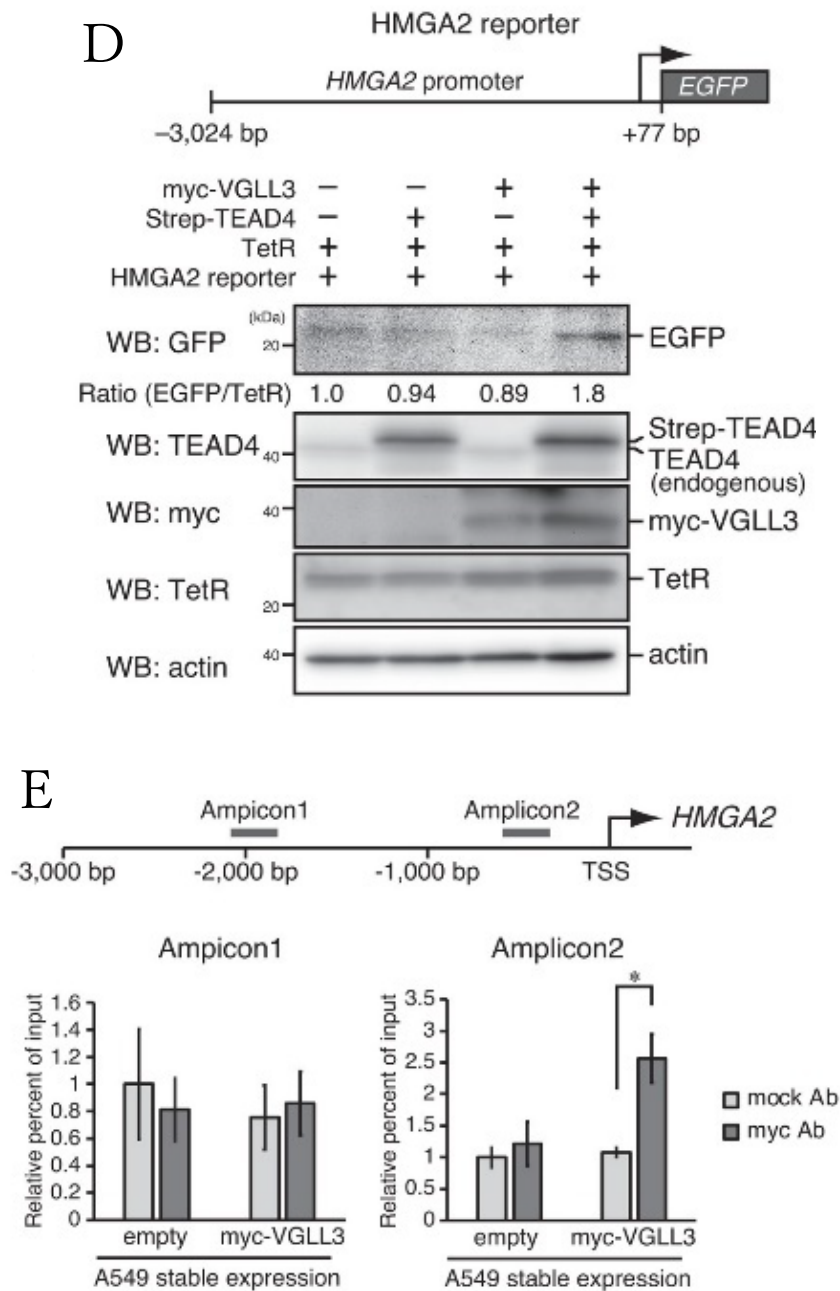
VGLL3 発現株における HMGA2 の発現誘導を介した EMT 様の形態変化が VGLL3 と TEAD の結合により誘導されるのか、TEAD family の中でも EMT に関与することが報告されている TEAD4[27]に着目し、解析を行った。

VGLL3 発現株において siRNA を用いて TEAD4 のノックダウンを行い、western blotting によりタンパク量を確認したところ、TEAD4 のノックダウンにより E-cadherin の回復及び HMGA2、Snail の減少が見られた (Fig.12A)。同様に、TEAD4 のノックダウンを行い mRNA 量をリアルタイム PCR 法により確認したところ、TEAD4 のノックダウンにより CDH1 の回復及び HMGA2、Snail の減少が見られた (Fig.12B)。更に、VGLL3 発現株において TEAD4 のノックダウンを行い運動性の変化を調べるためにスクラッチアッセイを行ったところ、TEAD4 のノックダウンにより運動性が減少した (Fig.12C)。以上の結果から、VGLL3 が TEAD4 を介して HMGA2 の発現を誘導し、EMT 様の形態変化を誘導することが示唆された。

次に、HMGA2 が VGLL3-TEAD4 複合体の下流で誘導されるのか解析を行った。HMGA2 のプロモーター領域の下流で EGFP を発現するレポータープラスミドを作製し、VGLL3 と TEAD4 を共発現させるレポーターアッセイを行ったところ、VGLL3 と TEAD4 の共発現によりレポーター活性が増加した (Fig.12D)。また、VGLL3 発現株において HMGA2 の転写開始点上流の 2 カ所を対象として、抗 myc 抗体を用いた ChIP アッセイを行ったところ、VGLL3 が HMGA2 の転写開始点上流 1000bp 程において結合することが分かった (Fig.12E)。以上の結果から、VGLL3 は TEAD4 を介して HMGA2 を直接誘導することが分かった。



**Fig.12 VGLL3 発現株における EMT 様の形態変化への TEAD4 の寄与の解析**  
A: VGLL3 発現株において siRNA を用い TEAD4 をノックダウンした際のタンパク量を比較した。  
B: VGLL3 発現株において siRNA を用い TEAD4 をノックダウンした際の mRNA 量を比較した。(\*\*,  $p < 0.01$ 、\*\*\*,  $p < 0.001$ )  
C: VGLL3 発現株において siRNA を用い TEAD4 をノックダウンした際の運動性を比較した。(\*,  $p < 0.05$ )



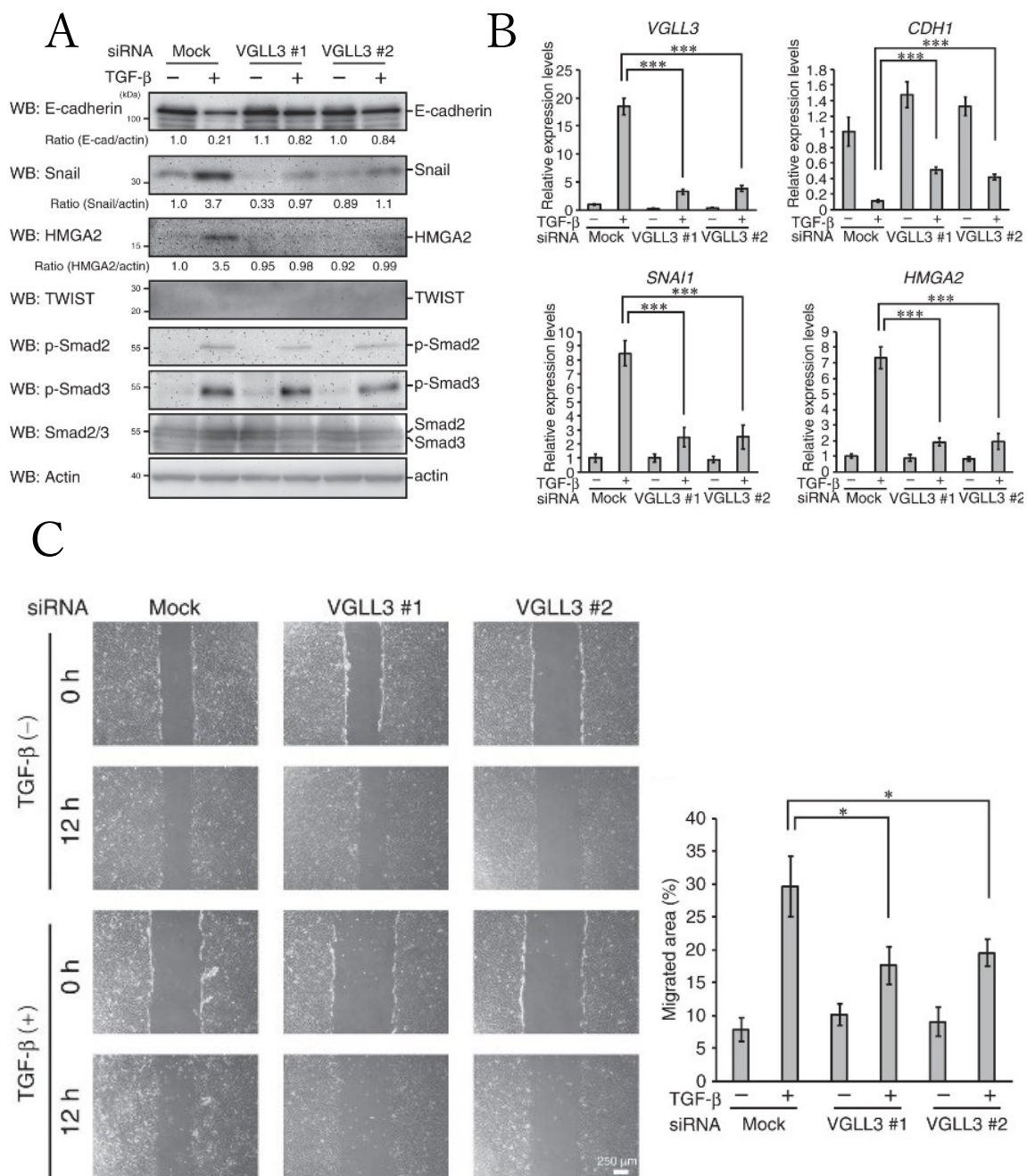
**Fig.12 VGLL3 発現株における EMT 様の形態変化への TEAD4 の寄与の解析**  
D: A549 細胞において HMGA2 プロモーター下流で EGFP を発現するレポータープラスミドを用いて VGLL3-TEAD4 複合体の HMGA2 プロモーター活性への寄与を調べた。  
E: VGLL3 発現株において HMGA2 転写開始点上流への VGLL3 の結合を抗 myc 抗体を用いた ChIP アッセイを行い確認した。(\*,  $p < 0.05$ )

## 2-4.VGLL3 は TGF- $\beta$ 刺激下流で EMT を誘導する

EMT を誘導するサイトカインとして TGF- $\beta$  が知られている[28]。VGLL3 が TGF- $\beta$  の下流で発現誘導されるという報告[29]から、TGF- $\beta$  下流で誘導される EMT における VGLL3 の機能について解析を行った。

A549 細胞に TGF- $\beta$  の刺激を加え、siRNA を用いて VGLL3 のノックダウンを行い、western blotting によりタンパク量を確認したところ、TGF- $\beta$  刺激により減少した E-cadherin が VGLL3 のノックダウンにより回復し、一方で刺激に増加した HMGA2、Snail の発現量が VGLL3 のノックダウンにより減少した

(Fig.13A)。同様に、TGF- $\beta$  の刺激を加えて VGLL3 のノックダウンを行い、リアルタイム PCR 法により mRNA 量を確認したところ、TGF- $\beta$  刺激により VGLL3 の発現が増加する事が確認でき、TGF- $\beta$  刺激で減少した CDH1 が VGLL3 のノックダウンにより回復し、TGF- $\beta$  刺激で増加した HMGA2、SNAI1 が VGLL3 のノックダウンにより減少した (Fig.13B)。また、TGF- $\beta$  刺激時の運動性について scratch assay で確認したところ、TGF- $\beta$  刺激により運動性が上昇し、VGLL3 のノックダウンにより運動性が低下することが分かった (Fig.13C)。以上の結果から、TGF- $\beta$  刺激下流で誘導される EMT において VGLL3 が HMGA2 誘導を介して運動性や E-cadherin の発現抑制を誘導することが分かった。



**Fig.13 TGF- $\beta$  刺激下流での EMT への VGLL3 の寄与の解析**

A: A549 細胞に TGF- $\beta$  の刺激を加え、siRNA を用いて VGLL3 をノックダウンした際のタンパク量を比較した。

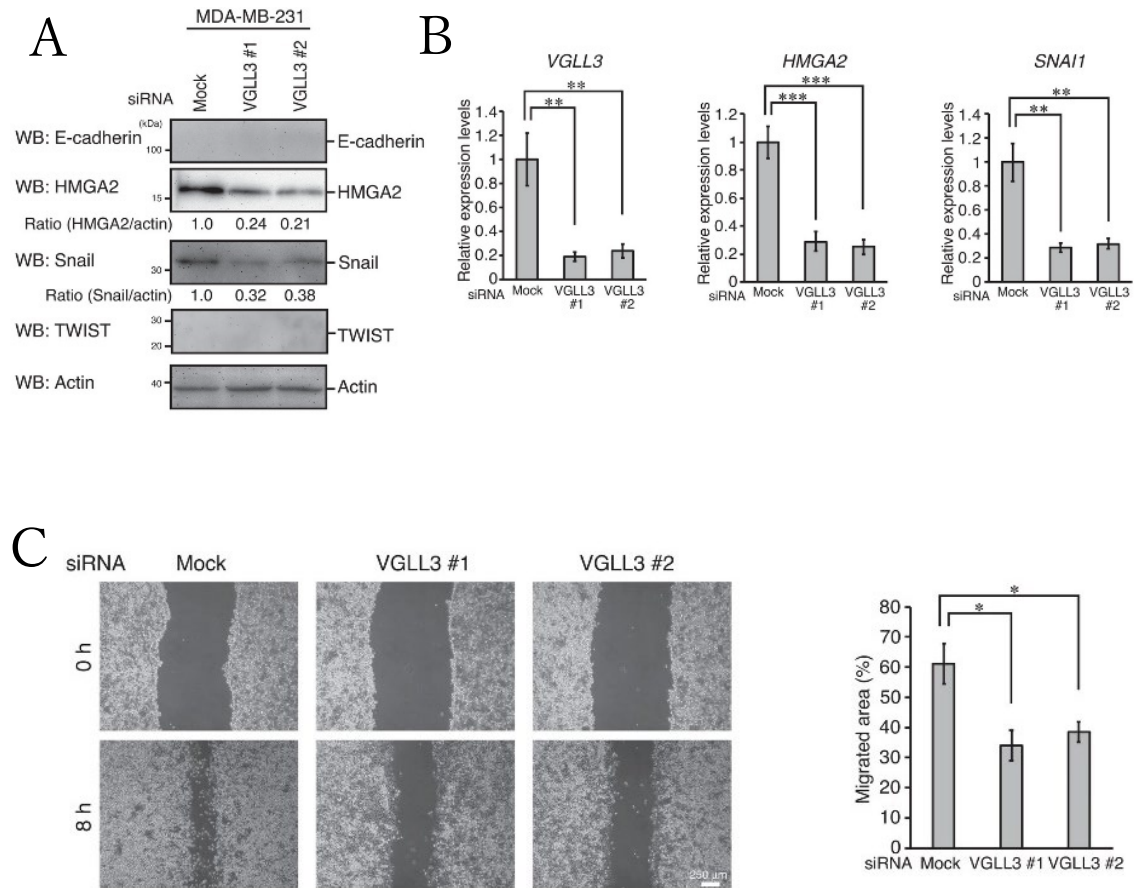
B: A549 細胞に TGF- $\beta$  の刺激を加え、siRNA を用いて VGLL3 をノックダウンした際の mRNA 量を比較した。(\*\*\*,  $p < 0.001$ )

C: A549 細胞に TGF- $\beta$  の刺激を加え、siRNA を用いて VGLL3 をノックダウンした際の運動性を比較した。(\*,  $p < 0.05$ )

## 2-5.内在性 VGLL3 は EMT 様の形態変化を誘導する

VGLL3 発現株や TGF- $\beta$  刺激と同様に内在性の VGLL3 も同様に EMT 様の形態変化を誘導するか調べた。内在性で VGLL3 の発現が高い間葉系の乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞を用い、VGLL3 のノックダウンを行い western blotting によりタンパク量を確認したところ、VGLL3 ノックダウンにより HMGA2、Snail の発現量が減少した (Fig.14A)。同様に、MDA-MB-231 細胞において VGLL3 をノックダウンした際の mRNA 量をリアルタイム PCR 法により確認したところ、VGLL3 のノックダウンにより HMGA2、SNAIL1 の mRNA 量が減少した (Fig.14B)。また、MDA-MB-231 細胞において VGLL3 をノックダウンした際の運動性について scratch assay により確認したところ、VGLL3 をノックダウンすることで運動性が減少した (Fig.14C)。以上の結果から、VGLL3 が内在性においても EMT 様の形態変化に寄与があることが分かった。

また、HMGA2 の寄与についても解析を行った。MDA-MB-231 細胞において siRNA を用いて HMGA2 のノックダウンを行い、western blotting によりタンパク量を確認したところ、HMGA2 ノックダウンにより Snail のタンパク量が減少した (Fig.14D)。同様に、mRNA 量についても確認したところ、HMGA2 ノックダウンにより SNAIL1 の mRNA 量が減少した (Fig.14E)。更に、運動性についても HMGA2 のノックダウンを行い確認したところ、HMGA2 をノックダウンした際に運動性が低下した (Fig.14F)。以上の結果から、VGLL3 が内在性においても HMGA2 の発現誘導を介して EMT 様の形態変化を誘導することが分かった。

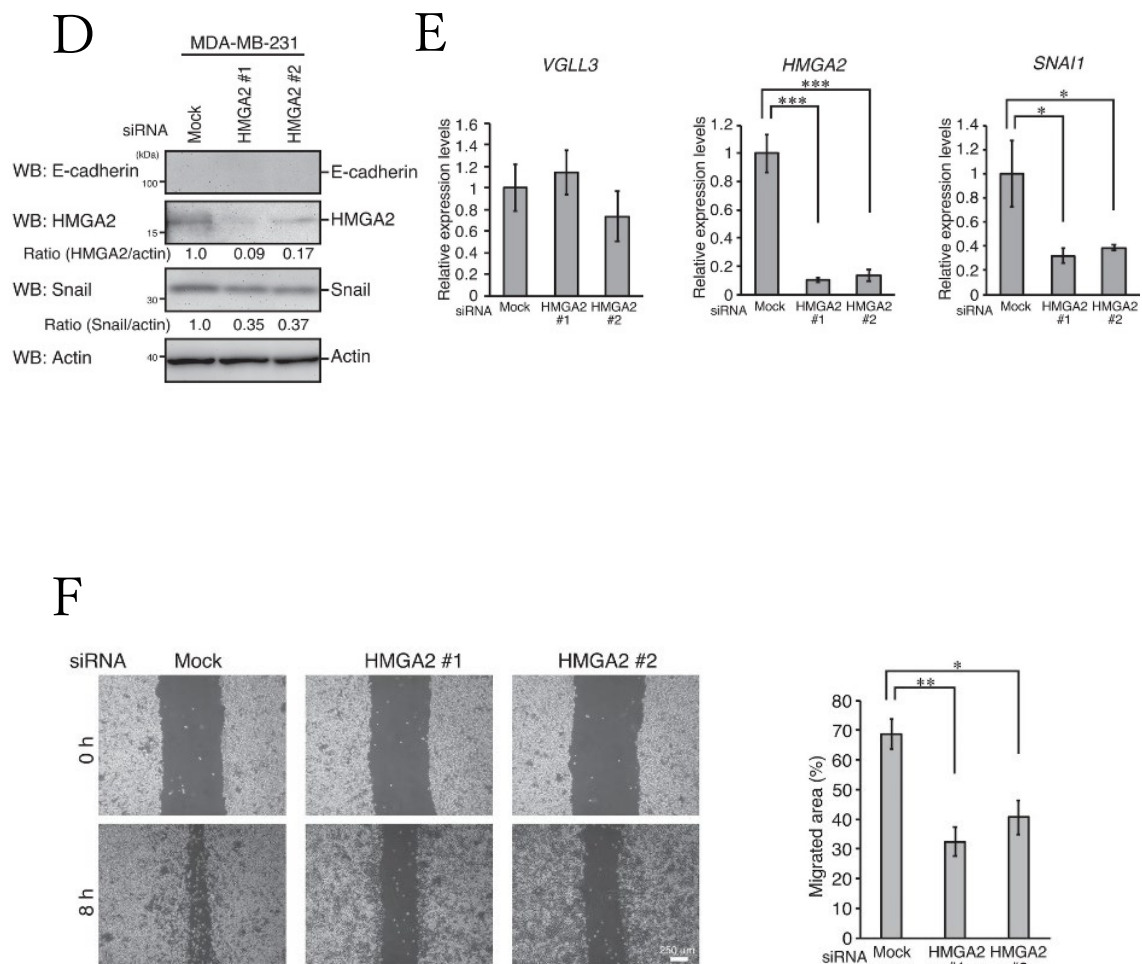


**Fig.14 内在性 VGLL3 による EMT 様の形態変化への寄与の解析**

A: MDA-MB-231 細胞において siRNA を用いて VGLL3 をノックダウンした際のタンパク量を比較した。

B: MDA-MB-231 細胞において siRNA を用いて VGLL3 をノックダウンした際の mRNA 量を比較した。(\*\*,  $p < 0.01$ 、\*\*\*,  $p < 0.001$ )

C: MDA-MB-231 細胞において siRNA を用いて VGLL3 をノックダウンした際の運動性を比較した。(\*,  $p < 0.05$ )



**Fig.14 内在性 VGLL3 による EMT 様の形態変化への寄与の解析**

D: MDA-MB-231 細胞において siRNA を用いて HMGA2 をノックダウンした際のタンパク量を比較した。

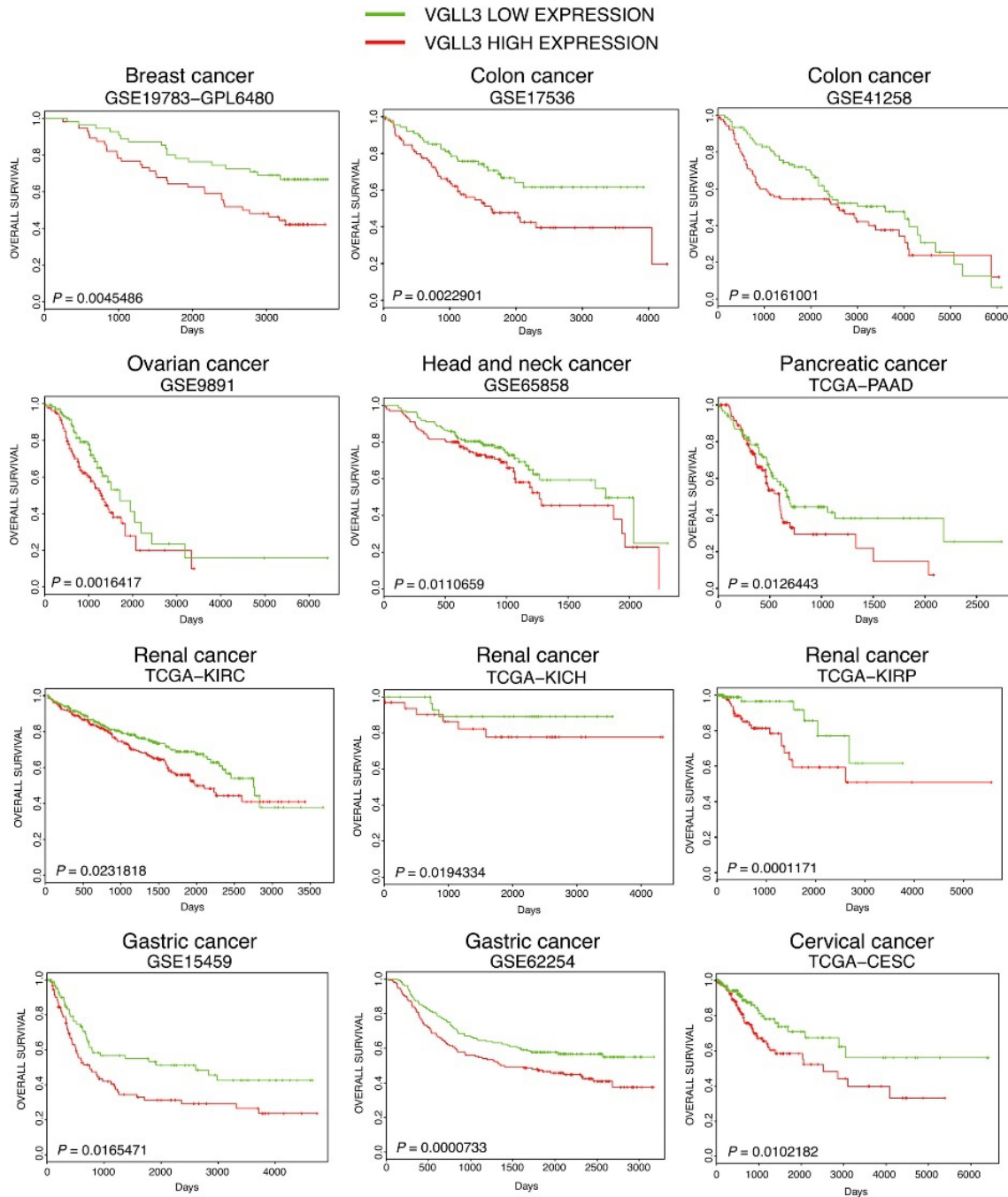
E: MDA-MB-231 細胞において siRNA を用いて HMGA2 をノックダウンした際の mRNA 量を比較した。(\*,  $p < 0.05$ 、\*\*\*,  $p < 0.001$ )

F: MDA-MB-231 細胞において siRNA を用い HMGA2 をノックダウンした際の運動性を比較した。(\*,  $p < 0.05$ 、\*\*,  $p < 0.01$ )

## 2-6.VGLL3 の発現はがんの予後不良に関与する

これまでの解析から、VGLL3 ががん悪性化において細胞増殖と EMT 様の形態変化からがんの悪性化に寄与する因子であると考えられたため、VGLL3 とがんの予後に関連があると予想し、解析を行った。

遺伝子発現とがん患者の予後について、PROGgeneV2[30]を用いて解析を行ったところ、乳がん、結腸がん、卵巣がん、頭頸部がん、膵臓がん、腎臓がん、胃がん、子宮頸がんなどの様々ながんにおいて VGLL3 高発現のがん患者は予後が悪いということが分かった (Fig.15)。このことから、VGLL3 による EMT 様の形態変化はがんの浸潤・転移など予後不良に関与することが示唆された。



**Fig.15 VGLL3 発現とがん患者の予後**

PROGeneV2 を用いてがん患者の予後を Kaplan-Meier プロットで示した。がん患者を VGLL3 発現量の中央値を基準として VGLL3 高発現群と VGLL3 低発現群の二群に分けて比較した。

## 総括

本研究から、VGLL3はLATS2やAMOTL2の発現誘導を介しHippo経路を活性化することで細胞増殖を促進する機能とHMGA2の発現誘導を介しEMT様の形態変化を誘導する機能を有することが分かった(Fig.16)。

Hippo経路活性化は従来、がん抑制的に働くと考えられてきたが、本研究では逆にHippo経路活性化が増殖促進的に働く事を見出した。近年、YAP/TAZの機能の解明が進み、ER陽性の乳がん細胞においてYAP/TAZがER依存的な細胞増殖抑制的に働くことや[31][32]、YAP/TAZの活性化が結腸がんの増殖抑制的に働くことなどが報告されており[33][34]、これらも同様にHippo経路活性化が増殖促進的に働くことを示していることから、Hippo経路活性化は増殖抑制のみに働く物ではないと考えられる。

YAP/TAZ-TEAD複合体の活性化に伴う細胞増殖抑制を目的として、近年TEAD阻害剤の開発が進んでいる[35]。YAP/TAZとVGLLはTEADの同一の部位に結合するが、YAP/TAZがTEADのパルミトイル化を伴い結合する一方で、VGLLとTEADの結合にはTEADのパルミトイル化を必要としないことが報告されている[36]。現在開発されているTEAD阻害剤はTEADのパルミトイル化抑制的に働くように設計されており、YAP/TAZ-TEAD複合体の形成は抑制する一方、VGLL-TEAD複合体の形成は抑制しないと考えられる。実際に、TEADの阻害剤であるMGH-CP1を用いがんの治療効果を評価した論文において、VGLL3の発現が誘導されることで治療効果が減少することが報告されており、がん細胞の増殖をVGLL3が促進することが明らかとなっている[37]。また、VGLL3下流で活性化を受けるAKTシグナルを抑制する事で治療効果が向上することも報告されており[37]、YAP/TAZとVGLL3を同時に抑制することががん治療において有用であると考えられる。

VGLL3 発現株においては、E-cadherin や Snail の発現量の変動が認められた一方で、間葉細胞マーカーN-cadherin や TWIST など、他の EMT マーカーについては変動が見られなかった。一般に、EMT は E-cadherin の減少に伴い N-cadherin が増加することで運動性に変化が見られることが知られており[38][39]、VGLL3 により誘導される形態変化は一般に言われる EMT とは異なり、partial EMT と呼ばれる現象に近いと考えられる。partial EMT は EMT の途中の状態を指し、がんの運動性や増殖性を高く保った状態であり、がんの浸潤転移において一般的な complete EMT よりも重要であると考えられている。VGLL3 発現株において E-cadherin の減少が見られた一方で N-cadherin の増加が見られなかったことや、VGLL3 発現株において増殖性が増加していたことから考えると、VGLL3 によって誘導される EMT 様の形態変化は partial EMT に近い物であると考えられる。

本研究結果から、VGLL3 ががんの悪性化において重要である浸潤・転移や細胞増殖に関与する因子であることが明らかとなった。しかしながら、本研究で、VGLL3 の活性調節については不明瞭である。近年、VGLL3 が細胞外基質の硬さにより核に移行し、心筋の線維化を促進することが報告されている[40]。細胞外基質の硬さががんの発達を促進することや、腫瘍組織においてがん細胞が硬さを調節することが報告されていることから[41]、VGLL3 ががんにおいても同様に基質の硬さにより活性化し、核移行することで活性化していることが予想される。したがって、今後は基質の硬さによる VGLL3 の活性化が Hippo 経路活性化を介した細胞増殖促進や運動性の増加に関連するか解析を行っていく必要があると考えている。

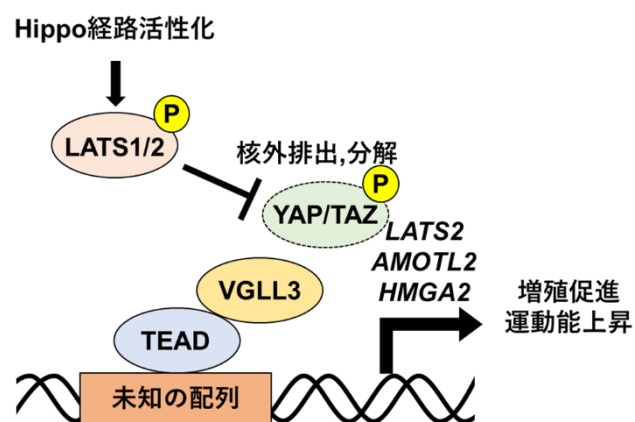


Fig.16 VGLL3 によるがん悪性化機構

## 実験方法

### 【細胞培養】

サル腎線維芽細胞 COS-1 細胞、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 細胞、ヒト骨肉腫細胞 Saos-2 細胞を使用した。細胞は CELLSSTAR 60-mm dish(Greiner Bio-One)を用い 5% Fetal Bovine Serum (FBS)を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium(ニッスイ)中で 37°C、5% CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。

### 【安定発現株の作製】

目的 DNA 配列を pIRES CAG puro3/myc vector に挿入し、A549 細胞に Lipofectamine 2000 (invitrogen)を用いて遺伝子導入を行った。60-mm dish を用いて seed し、翌日に遺伝子導入を行った。1μg/mL puromycin を含む培地で培養、薬剤セレクションを行った。

<クローニングプライマー配列>

hVGLL3\_EcoRI\_FW :  
AAAAGAATTCATGAGTTGTGCGGAGGTGATGTATCACCCCCAG  
hVGLL3\_NotI\_RE :  
AAAAGCGGCCGCTCAGTACCACGGTGATTCCTTACTCTTGTCTTG  
hTEAD4\_BamHI\_Fwd : AAAGGATCCGAGGGGCACGGCCGGCACCATTACCTC  
hTEAD4\_EcoRI\_Rev : TTTGAATTCTCATTCTTTCACCAGCCTGTAGATGTG  
hVGLL1\_BamHI\_Fwd : AAAGGATCCATGGAAGAAATGAAGAAGACTGCCATC  
hVGLL1\_NotI\_Rev : TTTGCGGCCGCCTAAAGATGCTGCAGGTATCGATGTGG  
hVGLL2\_BamHI\_Fwd : AAAGGATCCATGAGCTGTCTGGATGTTATGTACCAAG  
hVGLL2\_EcoRI\_Rev : TTTGAATTCTCAGCTCAGGAGGGATGCACCACAGAG  
hVGLL4\_BamHI\_Fwd : AAAGGATCCATGGAGACGCCATTGGATGTTTTGTCC  
hVGLL4\_EcoRI\_Rev : TTTGAATTCTCAGGAGACCACAGAGGGGGAGTGACTG  
YAP1\_EcoRI\_Fwd :  
AAAGAATTCATGGATCCCGGGCAGCAGCCGCCGCCTCAAC  
YAP1\_NotI\_Rev :  
TTTGCGGCCGCCTATAACCATGTAAGAAAGCTTTCTTTATCTAG

### 【レポーターアッセイ】

レポーターアッセイプラスミドは下記のものを使用。8xGTIIC は SS (sense strand) と AS (antisense strand) のアニーリングにて作製を行った。また 8xGTIIC 配列は非常に長い塩基配列であるため、up と down の 2 回に分けて導入を行っ

た。

<挿入 DNA 配列>

8xGTIIIC\_down\_SS :CGCGTCCGCTAGCCCGGCCAGTGCCAAGTTGAGACACAT  
TCCACACATTCCACTGCAAGCTTGAGACACATTCCACACATTCCACTGCAAG  
CTTCTAGG

8xGTIIIC\_down\_AS :GATCCCTAGAAGCTTGCAAGTGGGAATGTGTGGAATGTGTC  
TCAAGCTTGCAAGTGGGAATGTGTGGAATGTGTCTCAACTTGGCACTGGCCGGG  
CTAGCGGA

8xGTIIIC\_up\_SS :CGCGTCCGGCCAGTGCCAAGTTGAGACACATTCCACACATT  
CCACTGCAAGCTTGAGACACATTCCACACATTCCACTGCAAGCTT

8xGTIIIC\_up\_AS :CTAGAAGCTTGCAAGTGGGAATGTGTGGAATGTGTCTCAAGCT  
TGCAGTGGGAATGTGTGGAATGTGTCTCAACTTGGCACTGGCCGGGA

HMGA2\_reporter\_Fwd:AAAGATATCGCTGAGTAAAGAGGGGAGCCCATT

HMGA2\_reporter\_Rev:TTTGGTACCCGGAGAGTCGGAGGGGGACGGGCTG

### 【リアルタイム PCR】

12-well plate (TrueLine)の 1 well あたり 1mL の RNAiso plus (Cat. #9109, TAKARA)で細胞を回収後、クロロホルム処理、イソプロパノール沈殿を行い、ペレットを 20 $\mu$ L の DEPC 処理水で溶解して RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR mix(QPS-201, TOYOBO)を用い ECO(illumine)にてリアルタイム PCR を行った。

<qPCR プライマー配列>

VGLL3\_qPCR\_Fwd : TATGGAGCGTCCCAGTATCTG

VGLL3\_qPCR\_Rev : TGAATACCGCTAACTTCTTCTGC

LATS2\_qPCR\_Fwd : ACCCCAAAGTTCGGACCTTAT

LATS2\_qPCR\_Rev : CATTGCGCGTTCACTTCTGC

AMOTL2\_qPCR\_Fwd : ACCATGCGGAACAAGATGGAC

AMOTL2\_qPCR\_Rev : GGCGGCGATTTGCAGATTC

CTGF\_qPCR\_Fwd : CAGCATGGACGTTTCGTCTG

CTGF\_qPCR\_Rev : AACCACGGTTTGGTCCTTGG

CYR61\_qPCR\_Fwd : ACCGCTCTGAAGGGGATCT

CYR61\_qPCR\_Rev : ACTGATGTTTACAGTTGGGCTG

ANKRD1\_qPCR\_Fwd : AGTAGAGGAAGTGGTCACTGG

ANKRD1\_qPCR\_Rev : TGTTTCTCGCTTTTCCACTGTT

GAPDH\_qPCR\_Fwd : ACCACAGTCCATGCCATCAC

GAPDH\_qPCR\_Rev : TCCACCACCCTGTTGCTGTA

CDH1\_qPCR\_Fwd : CGAGAGCTACACGTTACGG

CDH1\_qPCR\_Rev : GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG  
CDH2\_qPCR\_Fwd : AGCCAACCTTAACTGAGGAGT  
CDH2\_qPCR\_Rev : GGCAAGTTGATTGGAGGGATG  
SNAI1\_qPCR\_Fwd : TCGGAAGCCTAACTACAGCGA  
SNAI1\_qPCR\_Rev : AGATGAGCATTGGCAGCGAG  
SNAI2\_qPCR\_Fwd : TGTGACAAGGAATATGTGAGCC  
SNAI2\_qPCR\_Rev : TGAGCCCTCAGATTTGACCTG  
HMGA2\_qPCR\_Fwd : ACCCAGGGGAAGACCCAAA  
HMGA2\_qPCR\_Rev : CCTCTTGGCCGTTTTTCTCCA  
TWIST1\_qPCR\_Fwd : GTCCGCAGTCTTACGAGGAG  
TWIST1\_qPCR\_Rev : GCTTGAGGGTCTGAATCTTGCT-

### 【siRNA ノックダウン】

RNase free water で 5 $\mu$ M に調製した siRNA を使用。 siRNA : RNiMax (invitrogen) = 2 $\mu$ L : 2 $\mu$ L で Opti-MEM に混和した。12-well plate を用いて seed 後、翌日に導入し 48h または 72h ノックダウンを行った。

### < siRNA 配列 >

siMock, Silencer® Select Negative Control No. 1 siRNA ID : 4390843  
siVGLL3 #1, c  
siVGLL3 #2, ambion Silencer®select, ID :s52378  
siTEAD1, ambion Silencer®select, ID :s13961  
siTEAD2, ambion Silencer®select, ID :s16075  
siTEAD3, ambion Silencer®select, ID :s13967  
siTEAD4, ambion Silencer®select, ID :s13964  
siLATS1, ambion Silencer®select, ID :s17393  
siLATS2, ambion Silencer®select, ID :s25505  
siAMOTL2, ambion Silencer®select, ID:s28109  
siSnail, ambion Silencer®select, ID : s 13186  
siHMGA2 #1, ambion Silencer®select, ID :15616  
siHMGA2 #2, ambion Silencer®select, ID :194864

### 【ウエスタンブロッティング】

SDS-sample buffer(10% 2-mercaptoethanol)を用いて細胞を溶解し、95°Cで 10 分間熱処理した Lysate を SDS-PAGE を行い、メタノールにより親水処理した PVDF (polyvinylidene difluoride) membranes に転写した。転写時の buffer は以下の通

りである。

Semidry buffer A(300mM Tris, 0.05% SDS, 20% MeOH)

Semidry buffer B(25mM Tris, 0.05% SDS, 20% MeOH)

Semidry buffer C(25mM Tris, 40mM 6-amino-n-capronic acid, 0.05% SDS, 20% MeOH)

転写時の電圧は PVDF membranes の面積 (cm<sup>2</sup>) の 2 倍に設定し 60 分間転写を行った。ブロッキング溶液として 5%スキムミルク in TBS-T(Tris-buffered Saline with Tween 20, 0.10% Tris 153mM NaCl, 2M Tris-HCl(pH7.8 at RT))を使用し、一次抗体は Can Get Signal Solution 1 (TOYOBO) 及び 5% BSA (Bovine Serum albumin) in TBS-T にて希釈した。二次抗体は 5%スキムミルク in TBS-T にて希釈した。ブロッキングおよび抗体とインキュベート後、Immobilon(Millipore)を用いて検出した。バンドの検出には ChemiDoc XRSPlus image analyzer(Bio-Rad)を使用し、バンドの定量には Quantity One Software(Bio-Rad)を使用した。

## 【抗体】

### <1 次抗体>

anti-Myc (9E10; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA)

anti-Myc (PL14; MBL, Nagoya, Japan)

anti-Strep (GT661; Genetex, Irvine, CA, USA)

anti-YAP/TAZ (8418; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

anti-LATS1 (3477; Cell Signaling Technology)

anti-LATS2 (5888; Cell Signaling Technology)

anti-phospho-LATS1/2 (9157; Cell Signaling Technology)

anti-AMOTL2 (AP8860c; ABGENT, San Diego, CA, USA)

anti-GFP (mFX75; Fujifilm Wako, Tokyo, Japan)

anti-actin (clone C4; Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

anti-actin (M177-3; MBL, Nagoya, Japan)

anti-TEAD1 (GT13112; Genetex)

anti-TEAD4 (ab58310; Abcam)

anti-TetR (TET01; MoBiTech)

anti-E-cadherin (3195; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

anti-N-cadherin (13116; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

anti-Smad2/3 (8685; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

anti-phospho-Smad2 (3108; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

anti-phospho-Smad3 (9520; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

anti-Snail (3879; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

anti-Slug (9585; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)  
anti-HMGA2 (5269; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)  
anti-TWIST (25465-1-AP; Proteintech, Rosemount, IL, USA)

#### <2 次抗体>

Horseradish peroxidase-F(ab')<sub>2</sub> secondary antibodies (GE Healthcare)

#### 【共免疫沈降 (Co-immunoprecipitation : Co-IP)】

60-mm dish で培養した細胞を以下の Co-IP 用 buffer を用いて on ice で 25 分間抽出、15000rpm, 10 分間遠心分離し、上清を Co-IP に用いた。サンプルに c-myc antibody(A-14)(Santa Cruz)と Protein G Sepharose を加え 2 時間 4°C でインキュベートした。TNE buffer で wash を行い、SDS-sample buffer に溶解した後、ウエスタンブロッティングによって検出した。

Co-IP 用 buffer : 1 x TNE buffer, 1 x PI (Protease inhibitor cocktail), 1mM PMSF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50mM NaF

TNE buffer : 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1.0% Triton-X-100, 50mM NaF

100 x PI : 5mg/mL Aprotinin (Bovine)(TAKARA) 600μL, 2.5mg/mL Pepstatin A(ペプチド研究所)480μL, 20mg/mL Leupeptin (ペプチド研究所) 150μL, 0.5M pH 8.0 EGTA (GEDTA 同仁化学研究所)1.5mL, ddw 12.27mL 計 15mL で調整。

#### 【免疫沈降法 (内在 IP)】

100-mm dish で培養した細胞を以下の Co-IP 用 buffer を用いて on ice で 25 分間抽出、15000rpm, 10 分間遠心分離し、上清を Co-IP に用いた。サンプルに anti-LATS2, anti-YAP/TAZ または anti-NF2 を加え、over night でインキュベート後、Protein G Sepharose を加え 1 時間 4°C でインキュベートした。TNE buffer で wash を行い、SDS-sample buffer に溶解した後、ウエスタンブロッティングによって検出した。

#### 【免疫染色法】

細胞培養 dish 上にカバーガラスを置き、細胞を培養した。PBS(-)で洗浄した後、4% PFA によって固定し、0.1% Triton-X によって抽出を行った。その後、3% BSA in saponin PBS に希釈した一次抗体を室温で 1 時間反応させ、saponin PBS で洗浄後、3% BSA in saponin PBS に希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。Saponin PBS で洗浄した後、antifade を添加しスライドガラスに固定させた。

検出は LSM 780 共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

#### 【MTT アッセイ】

細胞を 96-well plate(Orange Scientific) に播種した。播種する際、siRNA と RNiMax(invitorogen)を等量で Opti-MEM に混和した試薬を DMEM に添加して 72 時間ノックダウンを行った。その後 500 $\mu$ g/mL MTT (Tokyo Chemical Industry) を含む DMEM で 1 時間処理した後 DMSO を添加し、Filter Max F5(Molecular Devices) を用いて検出した。

#### 【スクラッチアッセイ】

6-well plate にコンフルエントに培養した細胞に 200  $\mu$ L チップを用いて引っ掻き傷（創傷）をつけ、経時的に顕微鏡写真を撮影した。撮影した写真から画像処理ソフトウェアの ImageJ を用いて創傷部分の面積を測定し、傷の塞がった部分 (migrated area) の割合を以下の式で算出した。

A: 0 h 時点での創傷部分の面積 B: 8 h または 12 h 後の創傷部分の面積

migrated area (%) =  $\{1 - (B/A)\} \times 100$

#### 【TGF- $\beta$ 処理】

citric acid に 20 ng/ $\mu$ L で溶解した TGF- $\beta$ 1 (PEPROTEC, Cat#100-21) を 15 mL tube に入れた培地で混和し、最終濃度 5 ng/mL となるように処理を行った。12-well plate を用いて細胞数  $1.0 \times 10^5$  で seed 後、翌日に TGF- $\beta$  処理を行った。ノックダウン条件のサンプルは siRNA ノックダウン 48 h 後から TGF- $\beta$  処理を行った。

#### 【ChIP アッセイ】

ホルムアルデヒドで固定された  $1 \sim 2 \times 10^6$  個の細胞から調製した クロマチン溶液 (2 ml) を、を 2  $\mu$ g の抗 myc 抗体 (PL14) および対照マウス抗体 (MOPC21; SIGMA-Aldrich, St Louis, MO) とともに一晩インキュベートした。DNA を精製し、上記のように qPCR 分析に供した。PCR では下記のプライマーを用いた。

Amplicon 1 (RefSeq NM\_003483.6 から予測される HMGA2 遺伝子の転写開始部位から-2023 と-1821 の間):

Fwd:AGCAGCCTGAAAACAAGTGG

Rev:GGGGAGTCACTGAGGAGTTC

Amplicon 2 (-660 と -484 の間)

Fwd:GCATGTCTCCGTGTATGTGC

Rev:GAGCCAACACTTTGCAGGAA

## 主要論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Hori N, Okada K, Takakura Y, Takano H, Yamaguchi N, Yamaguchi N. Vestigial-like family member 3 (VGLL3), a cofactor for TEAD transcription factors, promotes cancer cell proliferation by activating the Hippo pathway. J Biol Chem. 2020;295(26):8798-8807. doi:10.1074/jbc.RA120.012781

Hori N, Takakura Y, Sugino A, Iwasawa S, Nomizo K, Yamaguchi N, Takano H, Yamaguchi N. Vestigial-like family member 3 stimulates cell motility by inducing high-mobility group AT-hook 2 expression in cancer cells. J Cell Mol Med. 2022 May;26(9):2686-2697. doi: 10.1111/jcmm.17279..

## 参考文献

- 1.Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells [published correction appears in *Science*. 2016 Mar 4;351(6277). pii: aaf5401. doi: 10.1126/science.aaf5401]. *Science*. 2015;349(6255):1483-1489. doi:10.1126/science.aab4082
- 2.Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):28. Published 2020 Mar 12. doi:10.1038/s41392-020-0134-x
- 3.Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-348. doi:10.1038/35077213
- 4.Yamaguchi N. Multiple Roles of Vestigial-Like Family Members in Tumor Development. *Front Oncol*. 2020;10:1266. Published 2020 Jul 24. doi:10.3389/fonc.2020.01266
5. Barrette AM, Ronk H, Joshi T, et al. Anti-invasive efficacy and survival benefit of the YAP-TEAD inhibitor verteporfin in preclinical glioblastoma models. *Neuro Oncol*. 2022;24(5):694-707. doi:10.1093/neuonc/noab244
- 6.Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*. 2011;138(1):9-22. doi:10.1242/dev.045500
- 7.Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(4):246-257. doi:10.1038/nrc3458
- 8.Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev*. 2016;30(1):1-17. doi:10.1101/gad.274027.115
- 9.Zhao B, Ye X, Yu J, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev*. 2008;22(14):1962-1971. doi:10.1101/gad.1664408
- 10.Ehmer U, Sage J. Control of Proliferation and Cancer Growth by the Hippo Signaling Pathway. *Mol Cancer Res*. 2016;14(2):127-140. doi:10.1158/1541-7786.MCR-15-0305.
11. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013;13(9):963-972. doi:10.2174/15680096113136660102
12. Hashemi M, Arani HZ, Orouei S, et al. EMT mechanism in breast cancer metastasis and drug resistance: Revisiting molecular interactions and biological functions. *Biomed Pharmacother*. 2022;155:113774. doi:10.1016/j.biopha.2022.113774
13. Babaei G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother*. 2021;133:110909. doi:10.1016/j.biopha.2020.110909
14. Hélias-Rodzewicz Z, Pérot G, Chibon F, et al. YAP1 and VGLL3, encoding two cofactors of TEAD transcription factors, are amplified and overexpressed in a subset of soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010;49(12):1161-1171. doi:10.1002/gcc.20825

15. Zhang L, Li L, Mao Y, Hua D. VGLL3 is a prognostic biomarker and correlated with clinical pathologic features and immune infiltrates in stomach adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2020;10(1):1355. Published 2020 Jan 28. doi:10.1038/s41598-020-58493-7
16. Mesrouze Y, Aguilar G, Bokhovchuk F, et al. A new perspective on the interaction between the Vg/VGLL1-3 proteins and the TEAD transcription factors. *Sci Rep.* 2020;10(1):17442. Published 2020 Oct 15. doi:10.1038/s41598-020-74584-x
17. Pobbati AV, Chan SW, Lee I, Song H, Hong W. Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD complexes. *Structure.* 2012;20(7):1135-1140. doi:10.1016/j.str.2012.04.004
18. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell.* 2016;29(6):783-803. doi:10.1016/j.ccell.2016.05.005
19. Dasgupta I, McCollum D. Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. *J Biol Chem.* 2019;294(46):17693-17706. doi:10.1074/jbc.REV119.007963
20. Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011;474(7350):179-183. Published 2011 Jun 8. doi:10.1038/nature10137
21. Mahoney WM Jr, Hong JH, Yaffe MB, Farrance IK. The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *Biochem J.* 2005;388(Pt 1):217-225. doi:10.1042/BJ20041434
22. Wang KC, Yeh YT, Nguyen P, et al. Flow-dependent YAP/TAZ activities regulate endothelial phenotypes and atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(41):11525-11530. doi:10.1073/pnas.1613121113
23. Paramasivam M, Sarkeshik A, Yates JR 3rd, Fernandes MJ, McCollum D. Angiomotin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor. *Mol Biol Cell.* 2011;22(19):3725-3733. doi:10.1091/mbc.E11-04-0300
24. Zhao B, Li L, Lu Q, et al. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* 2011;25(1):51-63. doi:10.1101/gad.2000111
25. Thuault S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin CH, Moustakas A. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2006;174(2):175-183. doi:10.1083/jcb.200512110
26. Thuault S, Tan EJ, Peinado H, Cano A, Heldin CH, Moustakas A. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2008;283(48):33437-33446. doi:10.1074/jbc.M802016200
27. Zhang W, Li J, Wu Y, et al. TEAD4 overexpression promotes epithelial-mesenchymal transition and associates with aggressiveness and adverse prognosis in head neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2018;18:178. Published 2018 Nov 12. doi:10.1186/s12935-018-0675-z

28. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-172. doi:10.1038/cr.2009.5
29. Tufegdžić Vidaković A, Rueda OM, Vervoort SJ, et al. Context-Specific Effects of TGF- $\beta$ /SMAD3 in Cancer Are Modulated by the Epigenome. *Cell Rep.* 2015;13(11):2480-2490. doi:10.1016/j.celrep.2015.11.040
30. Goswami CP, Nakshatri H. PROGeneV2: enhancements on the existing database. *BMC Cancer.* 2014;14:970. Published 2014 Dec 17. doi:10.1186/1471-2407-14-970
31. Ma S, Tang T, Probst G, et al. Transcriptional repression of estrogen receptor alpha by YAP reveals the Hippo pathway as therapeutic target for ER<sup>+</sup> breast cancer. *Nat Commun.* 2022;13(1):1061. Published 2022 Feb 25. doi:10.1038/s41467-022-28691-0
32. Li X, Zhuo S, Zhuang T, et al. YAP inhibits ER $\alpha$  and ER<sup>+</sup> breast cancer growth by disrupting a TEAD-ER $\alpha$  signaling axis. *Nat Commun.* 2022;13(1):3075. Published 2022 Jun 2. doi:10.1038/s41467-022-30831-5
33. Pan WW, Moroishi T, Koo JH, Guan KL. Cell type-dependent function of LATS1/2 in cancer cell growth. *Oncogene.* 2019;38(14):2595-2610. doi:10.1038/s41388-018-0610-8
34. Luo J, Deng L, Zou H, et al. New insights into the ambivalent role of YAP/TAZ in human cancers. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023;42(1):130. Published 2023 May 22. doi:10.1186/s13046-023-02704-2
35. Pobbati AV, Kumar R, Rubin BP, Hong W. Therapeutic targeting of TEAD transcription factors in cancer. *Trends Biochem Sci.* 2023;48(5):450-462. doi:10.1016/j.tibs.2022.12.005
36. Chan P, Han X, Zheng B, et al. Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *Nat Chem Biol.* 2016;12(4):282-289. doi:10.1038/nchembio.2036
37. Sun Y, Hu L, Tao Z, et al. Pharmacological blockade of TEAD-YAP reveals its therapeutic limitation in cancer cells. *Nat Commun.* 2022;13(1):6744. Published 2022 Nov 8. doi:10.1038/s41467-022-34559-0
38. Loh CY, Chai JY, Tang TF, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells.* 2019;8(10):1118. Published 2019 Sep 20. doi:10.3390/cells8101118
39. Saitoh M. Involvement of partial EMT in cancer progression. *J Biochem.* 2018;164(4):257-264. doi:10.1093/jb/mvy047
40. Horii Y, Matsuda S, Toyota C, et al. VGLL3 is a mechanosensitive protein that promotes cardiac fibrosis through liquid-liquid phase separation. *Nat Commun.* 2023;14(1):550. Published 2023 Feb 8. doi:10.1038/s41467-023-36189-6
41. Deng B, Zhao Z, Kong W, Han C, Shen X, Zhou C. Biological role of matrix stiffness in tumor growth and treatment. *J Transl Med.* 2022;20(1):540. Published 2022 Nov 22. doi:10.1186/s12967-022-03768-y

## 謝辞

本研究を行うに当たって、ご指導、ご鞭撻を賜った分子心血管薬理学研究室の高野博之教授に深く感謝致します。多大な助言を賜りました山口直人教授に深く感謝致します。

本論分の査読をしてくださった中村浩之教授、畠山浩人教授、伊藤晃成教授に心より感謝致します。

研究の方針や実験に関して多くのご指導、ご助言を賜りました山口憲孝准教授に心より御礼申し上げます。

研究室で多くの議論を交わしてくださった分子心血管薬理学研究室の皆様に感謝します。

2024 年 1 月

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査員により行われた。

|    |              |          |    |    |    |
|----|--------------|----------|----|----|----|
| 主査 | 千葉大学大学院薬学研究院 | 薬効薬理学研究室 | 中村 | 浩之 | 教授 |
| 副査 | 千葉大学大学院薬学研究院 | 薬物学研究室   | 畠山 | 浩人 | 教授 |
| 副査 | 千葉大学大学院薬学研究院 | 生物薬剤学研究室 | 伊藤 | 晃成 | 教授 |