

# 転写共役因子 YAP1/TAZ を活性化する生薬・漢方薬の多発性骨髄腫治療への応用

申請代表者	丸山順一	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	助教
所外共同研究者	岩佐宏晃	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	助教
所外共同研究者	畑裕	東京医科歯科大学・病態代謝解析学分野	教授

## ■背景・目的

多発性骨髄腫は高齢者に多く発症するため、近年増加傾向にある。複数の新薬が開発されているが、高齢者に対しては強い副作用のため薬剤併用療法が行いにくく、死亡率が上昇している。転写共役因子 YAP1 を活性化すると多発性骨髄腫細胞の DNA 損傷応答が増強することが論文報告され、申請者も独自に獲得した YAP1 活性化作用をもつ低分子化合物でこのことを確認している (Maruyama et al. (2018) *Mol. Cancer Res.* 16 197-211.)。本研究では、多発性骨髄腫患者に適用して薬剤感受性を高め低用量での治療を実現し高齢患者の治療成績の改善に寄与することを目指して、YAP1 活性化作用をもつ生薬・漢方薬の同定を試みた。

## ■結果・考察

予定していた線虫実験は実験系の安定的な運用が難しく断念し、哺乳類培養細胞を用いたスクリーニングに注力した。

前述の論文で報告・使用した、TEAD 応答性プロモータの下に Histone 2B-mCherry (以降、H2B-mCherry) を発現するカセットをヒト網膜色素上皮細胞由来細胞株 ARPE-19 に安定発現させ、H2B-mCherry 蛍光強度で YAP1-TEAD 転写因子複合体の活性をモニターできるようにした ARPE-19 レポーター細胞を、スクリーニング細胞として用いた。レポーター細胞に生薬由来化合物（最終濃度 10  $\mu\text{M}$ ）と生薬エキス・漢方方剤（最終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$ ）を処理して三日間培養した。三日後、細胞をホルマリン固定し Hoechst33342 で核を染色して、Arrayscan VTI (Thermo Fisher) により各ウェルにおける H2B-mCherry 蛍光強度を測定した。コントロールウェルにおける蛍光強度に比較して 2 倍以上の強度を呈したウェルを陽性と判断した。

結果、Evodiamine とオウレン抽出液を処置したウェルにおいて 2 倍以上の蛍光強度増強が観察された。また、2 倍の増強は見られなかったもののオウバク抽出液においても 1.8 倍程度の蛍光強度増強が見られ、オウレンとオウバクの共通する含有成分である Berberine においても 1.4 倍程度の穏やかな蛍光強度の増強が見られたことから、オウレン抽出液とオウバク抽出液に含まれる Berberine が YAP1 活性化作用を有している可能性が示唆された。以上より、Evodiamine と Berberine に注目して以下の実験を進めた。

Evodiamine を東京化成から、Berberine を Sigma Aldrich から購入した。YAP1 が転写共役因子として正しく機能していることが知られているヒト骨髄腫由来細胞株 U2OS に各化合物を処理し、YAP1 の標的遺伝子である CTGF の発現量が増加するか否かを検討した。結果、CTGF の mRNA 量

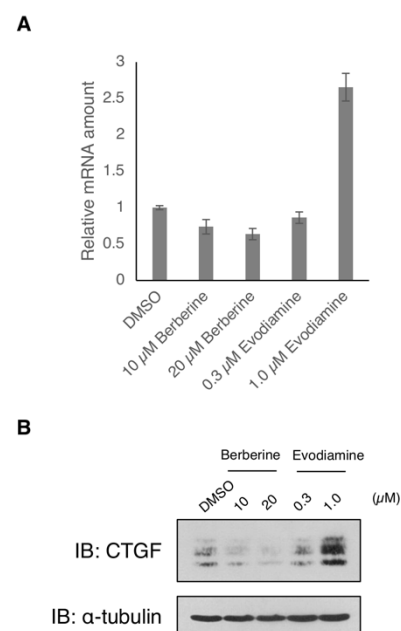


Figure 1 Berberine/EvodiamineのCTGF発現量に対する影響

（Fig.1A）・タンパク量（Fig.1B）ともに Evodiamine 処置により増加する傾向が観察された。一方で、Berberine 処置によっては顕著な CTGF 発現誘導は見られなかった。この結果より、オウレン抽出液・オウバク抽出液で見られた H2B-mCherry 蛍光強度増強は、Berberine 以外の共通成分に起因した作用である可能性が考えられる。現在、Evodiamine 処置による CTGF 発現誘導が YAP1 活性化を介した効果であるか否かをノックダウン実験により検討中である。

## ■結論

YAP1-TEAD 転写因子複合体の活性を蛍光によりモニターできるレポーター細胞を用いることで、オウレン抽出液と Evodiamine に YAP1 活性化作用があることを見出した。特に、生薬抽出液のような混合物ではなく単一の化合物である Evodiamine を同定できたことは、活性化メカニズム解析のしやすさ・医薬品応用のしやすさ等から非常に興味深いと考えている。引き続き、Evodiamine による YAP1 活性化の分子機構を詳細に解析していく予定である。