

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19026

研究課題名(和文) Hippo経路による骨・軟骨制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulation of osteogenesis and chondrogenesis by Hippo pathway

研究代表者

後藤 裕樹 (Goto, Hiroki)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：20734495

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞特異的MOB1欠損マウスでは骨芽細胞の増殖による骨硬化像を認め、一方、軟骨細胞特異的MOB1欠損マウスでは軟骨形成が抑制されて体長の短縮を認めた。これらのMOB1欠損マウスにYAP1またはTAZ欠損マウスをかけ合わせたところ、その表現型の一部が改善され、YAP1またはTAZの発現上昇がこれらの表現型に関わっていることが示された。MOB1欠損軟骨細胞のマイクロアレイ解析及びPCRでは、細胞外基質に関わる遺伝子の発現が低下していた。骨芽細胞及び軟骨細胞の発分化にHippo経路は重要な役割を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Osteoblast-specific Mob1a/1b double homozygous mutant mice showed osteosclerosis with the growth of osteoblasts. Chondrocyte-specific Mob1a/1b double homozygous mutant mice showed short-limb skeletal dysplasia with the reduction of growth plate length. Genes related with extracellular matrix in chondrocyte-specific Mob1 deleted cells were downregulated in vitro. These results indicate that Hippo pathway plays a critical role in the regulation of osteogenesis and chondrogenesis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：Hippo経路 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

先進諸国では高齢化が加速し、高齢者特有の疾患が増加している。なかでも、(1)反復外力刺激によって、加齢変性軟骨が磨耗しておこる変形性関節症、(2)加齢による骨密度低下によっておこる骨粗鬆症、及び骨粗鬆症にさらに外力が加わって生じる骨折など、骨・軟骨に関わる疾患は高齢者の日常生活において重要な問題となっている。骨・軟骨は常に外力にさらされ、体を支えるための重要な支持組織であることから、加齢に伴う骨・軟骨疾患に効果的な治療薬や再生医療の開発が期待されている。これには骨芽細胞及び軟骨細胞の発分化の分子メカニズムの完全解明が必須である。

Hippo 経路は、細胞外力や細胞外基質などの微小環境を感知して細胞増殖を制御する細胞内シグナル経路として、また、がん抑制シグナル経路として近年世界的に注目されつつある。MOB1A/1B は LATS キナーゼの、SAV1 は MST キナーゼのアダプター蛋白質であり、MST、SAV1、LATS、MOB1 が Hippo 経路主要構成因子である。LATS のもつキナーゼ活性は非常に弱いものの、MOB1A/1B の存在によりそのキナーゼ活性が強力に増強される。さらに、MOB1A、MOB1B の単独欠損マウスには表現型を見ないものの、これら二重欠損マウスは着床直後に胎生致死となることを、所属研究室において見出し報告している。Hippo 経路が骨・軟骨細胞の発生や分化に重要であることが予想されるものの、Hippo 経路主要構成因子の完全ホモ欠損マウスは胎生致死となることから、成体における骨・軟骨組織での Hippo 経路分子の役割は未だ不明であり、腫瘍形成以外の疾患への関与も明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究は、細胞外力を最も受け、細胞外基質にも富む、骨・軟骨組織に注目し、Hippo 経路の骨・軟骨組織特異的な欠損マウスを作製・解析して、(1)骨・軟骨細胞における Hippo 経路の生理的役割やその破綻病態、(2)骨・軟骨細胞腫瘍化への Hippo 経路の関与の有無、及び(3)これらマウスにみられる表現型の分子メカニズムを世界に先駆けて解明する。本研究は、今後、骨・軟骨疾患の新規治療薬開発や再生医療開発の分子基盤となることが期待できる

3. 研究の方法

軟骨・骨芽細胞に特異的な MOB1 欠損マウスをそれぞれ作製し、骨形態計測、細胞分化や増殖能などの細胞生物学的・生化学的変化の解析と下流標的遺伝子の同定を行った。また、変異マウスにみられる骨・軟骨疾患や腫瘍発症の有無を個体レベルで解析した。

具体的には、型コラーゲン Col2a1-Cre/ERT トランスジェニック(Tg)マ

ウスと MOB1A^{flx/flx}MOB1B^{-/-}マウスを交配し、タモキシフェン投与によって軟骨細胞特異的に MOB1 欠損マウスを作製した。また、Sp7(Osterix)-tTA/tetO-Cre Tg と MOB1A^{flx/flx}MOB1B^{-/-}マウスを交配し、ドキシサイクリン除去により骨芽細胞特異的に MOB1 を欠損するマウスを作製した。

体長、大腿骨・脛骨・頭蓋骨の長さや幅等のマクロ計測を行うとともに、海綿骨や皮質骨における骨芽・骨・多核/単核破骨細胞数、骨梁数・幅、骨・類骨量、皮質骨幅、骨成長・石灰化速度、線維化骨髄量、及び関節軟骨における関節軟骨幅、成長板軟骨幅、滑膜組織量などの組織学的形態計測を行った。薬剤による Cre リコンビナーゼの発現誘導をさせていない軟骨細胞や骨芽細胞特異的 MOB1 変異マウス及びコントロールマウスを ROSA-LSL-YFP レポーターマウスと交配する。肋軟骨や頭蓋骨を採取し酵素処理後、*in vitro* で培養し、タモキシフェン添加やドキシサイクリン除去により MOB1 欠損を誘導させ、YFP 陽性細胞をセルソーターで単離することで、野生型細胞、MOB1 欠損細胞を各々純化して、マイクロアレイ解析及び PCR を行った。MOB1 欠損マウスと YAP1 欠損マウスまたは TAZ 欠損マウスを交配し、MOB1 欠損マウス表現型の YAP1・TAZ 依存性を検討した。YAP1 または TAZ を骨芽細胞の細胞株 U2OS または軟骨細胞の細胞株 H-EMC-SS に過剰発現させ、YAP1、TAZ の細胞増殖に対する影響を解析した。

4. 研究成果

骨芽細胞特異的 MOB1 欠損マウスでは骨芽細胞の増殖による骨硬化像を認め、一方、軟骨細胞特異的 MOB1 欠損マウスでは軟骨形成が抑制されて体長の短縮を認めた。明らかな腫瘍の発症は認めなかった。

MOB1 欠損骨芽細胞、軟骨細胞では、pLATS が低下するとともに、下流の YAP1 及び TAZ が免疫染色及びウエスタンブロットで上昇していた。

骨芽細胞特異的及び軟骨特異的な MOB1 欠損マウスに YAP1 または TAZ 欠損マウスをかけ合わせたところ、その表現型の一部が改善され、YAP1 または TAZ の発現上昇がこれらの表現型に関わっていることが示された。

YAP1 または TAZ を骨芽細胞の細胞株 U2OS に過剰発現したところ、細胞の増殖が亢進した。一方、YAP1 または TAZ を軟骨細胞の細胞株 H-EMC-SS に過剰発現させたところ、細胞の増殖は抑制された。

MOB1 欠損軟骨細胞のマイクロアレイ解析及び PCR では、細胞外基質に関わる遺伝子の発現が低下していた。骨芽細胞及び軟骨細胞の発分化に Hippo 経路は重要な役割を示すことが明らかとなった

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1) Otsubo K*, Goto H(*equal contributors), Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, Mimori K, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, Suzuki A. MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation.

Oncogene in press [査読有]

2) Nishio M, Maehama T, Goto H, Nakatani K, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A. Hippo vs. Crab: tissue-specific functions of the mammalian Hippo pathway.

Genes Cells. 22(1):6-31, 2017. [査読有]

3) Nakatani K, Maehama T, Nishio M, Goto H, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A. Targeting the Hippo Signaling Pathway for Cancer Treatment.

J Biochem., 161 (3): 237-244, 2017. [査読有]

4) Goto H, Kariya R, Matsuda K, Kudo E, Katano H, Okada S. A potential role of the NOD genetic background in mouse peritoneal macrophages for the development of primary effusion lymphoma.

Leuk Res. 42:37-42, 2016. [査読有]

5) Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, Takano Y, Hikasa H, Itoh T, Suzuki SO, Kurihara H, Aishima S, Leask A, Sasaki T, Nakano T, Nishina H, Nishikawa Y, Sekido Y, Nakao K, Shin-Ya K, Mimori K, Suzuki A. Dysregulated YAP1/TAZ and TGF- β signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice.

Proc Natl Acad Sci U S A. 113(1):E71-80, 2016. [査読有]

6) Ohkuma K, Matsuda K, Kariya R, Goto H, Kamei S, Hamamoto T, Okada S. Anti-inflammatory effects of activated protein C on human dendritic cells.

Microbiol Immunol. 59(7):381-388, 2015. [査読有]

[学会発表](計2件)

1) Goto H, Kariya R, Kudo E, Okuno Y, Okada S. Role of *PU.1* Down-Regulation for the Development of Primary Effusion Lymphoma.

58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, CA, 3-6 Dec, 2016, ポスター [査読有]

2) Goto H, Nishio M, Suzuki A. The 25th Hot Spring Harbor International Symposium, Cutting Edge of Technical Innovations in Structural and Systems Biology 2015, Fukuoka, Japan, 14-15 Nov 2015, ポスター [査読無]

[図書](計1件)

1) 後藤 裕樹、西尾 美希、加藤 稚子、前濱、朝彦、鈴木 聡. 機械的刺激による Hippo-YAZ/TAZ 経路の活性化、生理作用、腫瘍進展メカニズムと意義(特集:細胞の社会学 - 細胞間で繰り広げられる協調と競争) *生体の科学* 67(2), 127-131, 2016. [査読無]

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 裕樹 (GOTO, Hiroki)
九州大学生体防御医学研究所ゲノム腫瘍
学・助教

研究者番号：20734495

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

西尾 美希 (NISHIO, Miki)