

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07472

研究課題名(和文) 転写共役因子YAPを介したリゾホスファチジン酸のがん進展制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of cancer progression control mediated by LPA-induced YAP activation

研究代表者

安田 大恭 (Daisuke, Yasuda)

秋田大学・医学系研究科・講師

研究者番号：70594951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性脂質リゾホスファチジン酸(LPA)の2つの受容体LPA4とLPA6は血管内皮細胞(EC)に発現し、三量体Gタンパク質G12/13、低分子量Gタンパク質Rho、転写共役因子YAP/TAZシグナルを介して、Notch経路の血管制御因子DLL4の発現を抑制し、ECの萌出による血管新生に寄与することを明らかにした。また、EC特異的にLPA4/LPA6を二重欠損させたマウスの新生血管先端領域ではYAPの核内移行が低下し、DLL4の発現量が増加していた。さらに、Aktが促す  $\beta$ -カテニンとNotch細胞内ドメインによるDLL4遺伝子発現誘導を、核内のYAPが抑制することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回はLPA4とLPA6が協調してG12/13-Rho-Rockシグナルを惹起してYAP/TAZを活性化し、DLL4遺伝子の発現を抑制することを証明することができた。この成果は、LPAによる血管新生制御について新規分子メカニズムを解明したことになる。LPAのYAP活性化による血管新生を介したがん進展制御の関わりはまだ見出せていないが、LPA4とLPA6はリンパ管新生にも重要であることを明らかにしており、このメカニズムを基盤に病的な血管・リンパ管新生を減らすなどの戦略により、がんや加齢黄斑変性症などの「血管新生病」に対する治療法開発が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA) is a potent lipid mediator with various biological functions mediated through six G protein-coupled receptors (GPCRs), LPA1-6. We show a critical role of LPA4 and LPA6 in developmental angiogenesis. In mice, endothelial cell (EC)-specific Lpa4;Lpa6 DKO retinas had impaired sprouting angiogenesis. Mechanistically, LPA activated the transcriptional regulators YAP and TAZ through LPA4/LPA6-mediated G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub>-Rho-ROCK signaling in ECs. YAP/TAZ knockdown increased  $\beta$ -catenin- and Notch intracellular domain (NICD)-mediated endothelial expression of the Notch ligand delta-like 4 (DLL4). Of note, the inhibition of Notch signaling also ameliorated impaired retinal angiogenesis in EC-specific Lpa4;Lpa6 DKO mice. Overall, these results suggest that the G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub>-coupled receptors LPA4 and LPA6 synergistically regulate endothelial DLL4 expression through YAP/TAZ activation. Our findings provide a novel insight into the biology of GPCR-activated YAP/TAZ.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：リゾホスファチジン酸 血管新生 DLL4 YAP/TAZ GPCR

1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸(LPA)は多彩な機能を発揮する生理活性脂質であり、6つのG蛋白質共役型受容体(GPCR)がLPAの受容体(LPA1~6)として報告されている。申請者の研究室ではLPA4とLPA6をLPAによって活性化される新規GPCRとして同定してきたが、その生理機能は未だ不明な点が多い。

申請者らはこれまでに、LPA4からのシグナルが腫瘍組織の非機能的な血管を機能的な血管へと変化させ、その後投与された抗がん剤が効率よく腫瘍組織全体に到達して抗腫瘍効果を増大させることを、大阪大学微生物病研究所の高倉伸幸教授との共同研究で明らかにした (Takara et al. *Cell Rep.* 2017, 20, 2072-2086)。しかしながら、血管内皮細胞のLPA4/LPA6が腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移などのがん進展に果たす役割はほぼ不明のまま残されている。さらに申請者は、血管内皮細胞特異的LPA4/LPA6二重欠損マウスの解析から、LPA4/LPA6が発生期の血管新生に必須であることを見出した(図1)。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた解析から、LPAが図2に示すシグナル伝達系路でYAPを核内移行させ、DLL4の発現を抑制することにより正常な血管新生を促すことを明らかにしていた。しかしながら、核内のYAPがDLL4発現を抑制する分子機構は未だ不明である。

転写共役因子であるYAPは、器官のサイズ制御やがんの進展に関与することが知られ、がん治療薬の新たな標的分子として注目されている。各種がん細胞に発現するYAPのがん進展制御の役割は明らかにされてきたが(Moroishi et al. *Nat. Rev. Cancer* 2015, 15, 73-79)、腫瘍血管の血管内皮細胞に発現するYAPのがん進展制御の役割については未だ報告がない。

DLL4は血管内皮細胞に主に発現するNotch受容体のリガンドであり、血管新生に必須の制御因子である。近年、ヒトやマウスの様々ながん組織で抗DLL4抗体やNotchシグナル阻害剤による抗腫瘍効果が明らかにされている(Colombo et al. *Oncotarget* 2015, 6, 26826-26840)。これらの薬剤は血管内皮細胞のDLL4-Notchシグナルを低下させて、無秩序な腫瘍血管を増生させることにより、腫瘍への栄養供給を妨げて腫瘍の増殖を抑えると考えられている。そのため、血管内皮細胞においてDLL4の発現抑制作用をもつLPA4/LPA6特異的アゴニストは、抗DLL4抗体やNotchシグナル阻害剤と同様の抗腫瘍効果を発揮することが期待され、血管内皮細胞特異的LPA4/LPA6二重欠損マウスでは、がんモデルの病態は増悪化すると予想される。

図1: LPA4とLPA6は胎生期の正常な血管形成に重要である。

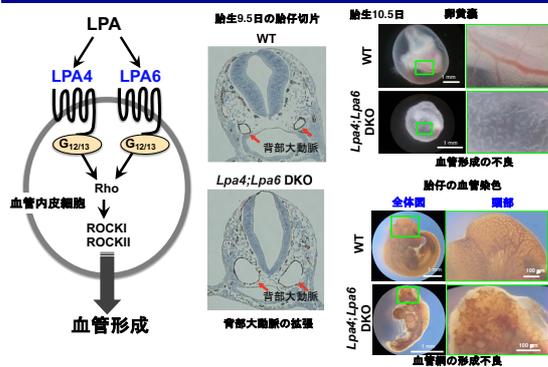
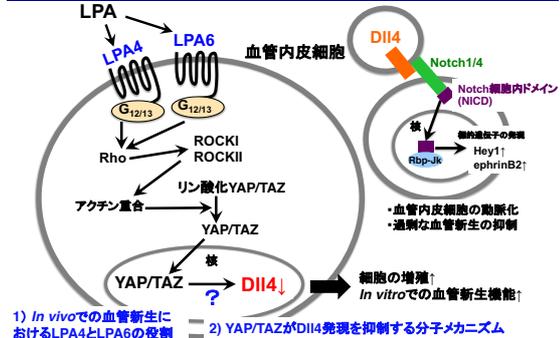


図2: 血管内皮細胞のLPA-LPA4/LPA6シグナルはYAP/TAZの核内移行を促し、DLL4遺伝子の発現を抑制することにより正常な血管新生に寄与する。



2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが発見したLPA4/LPA6活性化による核内YAPのDLL4発現抑制作用について、その分子機構を解明するとともに、その作用ががんの進展制御に果たす役割を、腫瘍組織の血管内皮細胞において明らかにすることである。さらに、がん病態モデルマウスを用いて、LPA4/LPA6特異的アゴニストの抗腫瘍効果を見出す。

3. 研究の方法

本研究では、申請者らが発見した血管内皮細胞のYAPによるDLL4発現抑制作用について、その分子機構の解明と生体におけるがん進展制御の役割を見出す。

<In vitro 解析> 作製済みのYAP活性化(核移行型)変異体の過剰発現HUVECを用いて、核内のYAPがDLL4の発現を抑制する分子機構を明らかにする。抗β-catenin抗体もしくは抗ERG抗体を用いた免疫沈降法やクロマチン免疫沈降法(ChIP)により、核内YAPとERGやβ-cateninとの結合、核内YAPによるERGとβ-cateninの複合体形成阻害およびβ-cateninのDLL4プロモーター領域への結合阻害について検証する。さらに、YAPのsiRNAやYAPの核内移行を抑制するアクチン重合阻害剤の処理により、β-cateninやERGのDLL4プロモーター領域への結合が増強するかを明らかにする。

<In vivo 解析> タモキシフェン投与依存的かつ血管内皮細胞特異的にLPA4/LPA6を二重欠損するマウス(Cdh5-Cre-ERT2<sup>tg</sup>/LPA4<sup>fllox/fllox</sup>/LPA6<sup>fllox/fllox</sup>)とそのコントロールマウス

(LPA4<sup>flox/flox</sup>/LPA6<sup>flox/flox</sup>)を用いて、抗 DLL4 抗体の特異的抗腫瘍効果が知られている大腸がんモデルと肺がんの病態モデルをそれぞれ作製し、がん進展における LPA4 と LPA6 の役割を見出す。具体的には C57BL/6 マウス由来 Lewis lung carcinoma (LLC)をマウス尾部へ静脈内投与して肺がん転移モデルを作製する。皮下腫瘍増殖モデルは LLC をマウスの皮下への投与により作製した。

#### 4. 研究成果

① HUVEC を用いた免疫沈降法や ChIP 解析により、YAP、 $\beta$ -カテニン、ERG、Notch 細胞内ドメイン(NICD)それぞれの核内における複合体形成とその転写制御機能の可能性を検証したが、それを示す明確な結果は得られなかった。しかしながら、Akt が促す  $\beta$ -カテニンと NICD による DLL4 遺伝子発現誘導を、核内の YAP が抑制することを明らかにした(図 3, 4)。

② EC 特異的に LPA4/LPA6 を二重欠損させたマウスは、コントロールマウスと比較して網膜の新生血管先端領域において YAP の核内移行が低下し(図 5)、DLL4 の発現量が増加していた(図 6)。さらに、EC 特異的な LPA4/LPA6 の二重欠損は網膜における血管新生の異常を引き起こすが、Notch シグナル阻害剤の投与により改善することを見出した(図 7, 8, 9)。

以上の成果をまとめて公表した(Yasuda et al, *J. Clin. Invest.*, 2019, 29, 4332-4349) (図 10)。

③ タモキシフェンを投与して EC 特異的に LPA4/LPA6 の二重欠損を誘導したマウスに、LLC を静脈内投与して 14 日後の肺に形成された腫瘍の数と大きさを肉眼で観察し計測したが、EC 特異的 LPA4/LPA6 二重欠損マウスは非欠損マウスと比べて有意な差はみられなかった。皮下投与モデルにおける皮下腫瘍の大きさや重量の解析でも、EC 特異的 LPA4/LPA6 二重欠損マウスは非欠損マウスと比べて有意な差はみられなかった。LLC の皮下局所腫瘍を切除して縫合後に観察される肺転移腫瘍についても上記と同様に解析したが有意差は得られなかった。

そこで、血管と同様ながん進展に重要な役割が知られているリンパ管に着目した。まず、ヒトおよびマウス由来のリンパ管内皮細胞(LEC)における LPA4 と LPA6 のがん進展への役割を検証するために、筑波大学との共同研究で LEC 特異的 LPA4/LPA6 二重欠損マウスを作製した。このマウスはほとんどが胎仔期にリンパ管新生異常により致死となることがわかった。そこで、タモキシフェン投与依存的に LEC 特異的かつ LPA4/LPA6 を二重欠損させるマウスを作製した。今後はこのマウスを用いて担癌モデル解析を行う。併せてヒトおよびマウス由来 LEC を用いて、LPA-LPA4/LPA6-G12/13 シグナルにより発現量が変化するがん進展関連分子を見出し、LPA のリンパ管新生を介したがん進展制御機構の解析を進める予定である。

図3 : YAP/TAZは血管新生の制御因子によるAktのリン酸化を抑制する。

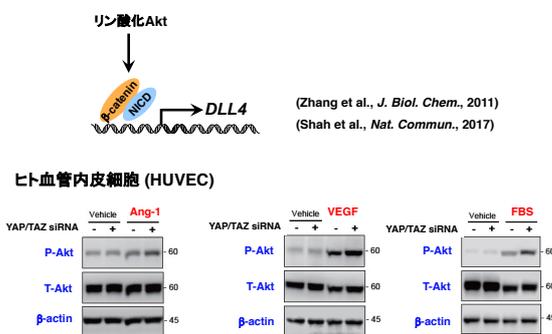


図4 : YAP/TAZは $\beta$ -cateninとNICDが促すDLL4発現を抑制する。

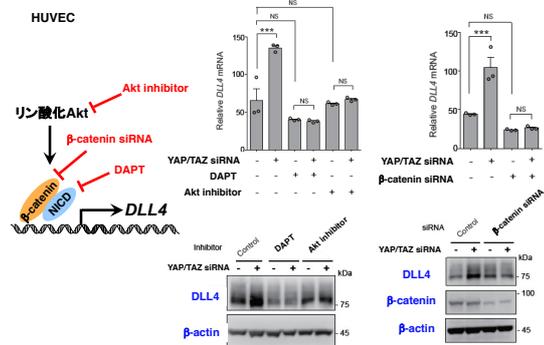


図5 : 網膜の新生血管の先端領域において、YAPは血管内皮細胞のLPA4とLPA6を介して活性化される。

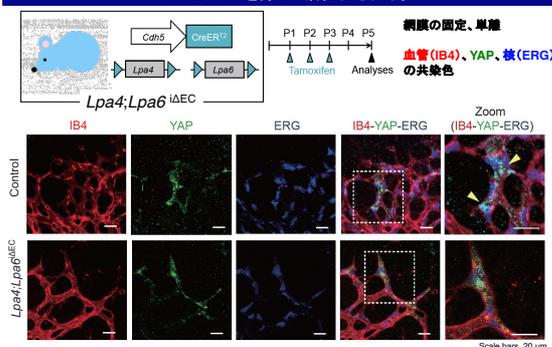


図6 : 網膜の新生血管の先端領域において、血管内皮細胞のLPA4とLPA6はDLL4の発現を抑制させる。

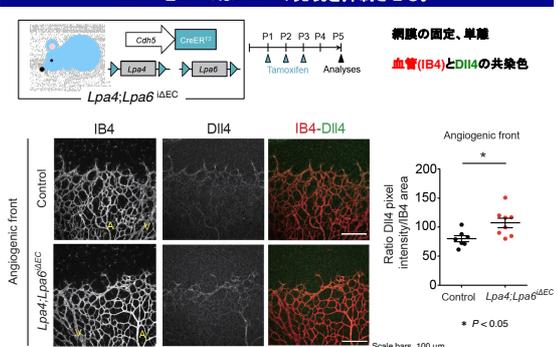


図7 : 血管内皮細胞特異的LPA4/LPA6二重欠損は、網膜の血管新生に異常を引き起こすが、Notchシグナル阻害剤の投与により改善する。

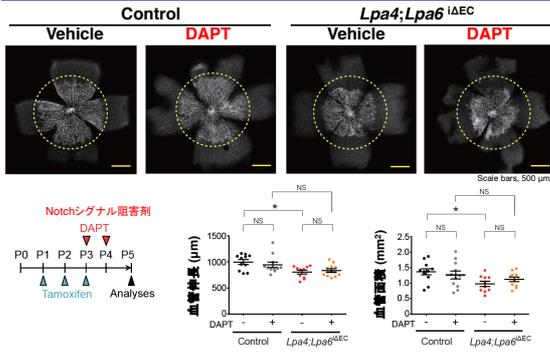


図8 : 血管内皮細胞特異的LPA4/LPA6二重欠損は、血管の分枝数と発芽数を低下させるが、Notchシグナル阻害剤の投与により改善する。

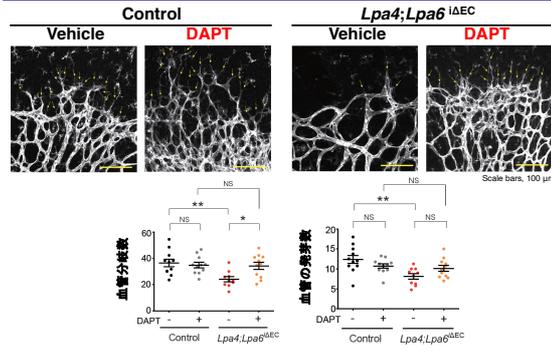


図9 : 血管内皮細胞特異的LPA4/LPA6二重欠損は、フィロポディアの形成を低下させるが、Notchシグナル阻害剤の投与により改善する。

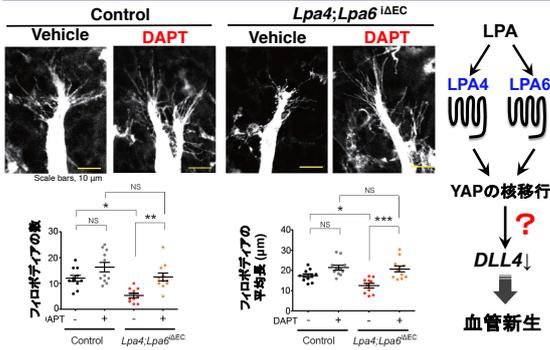
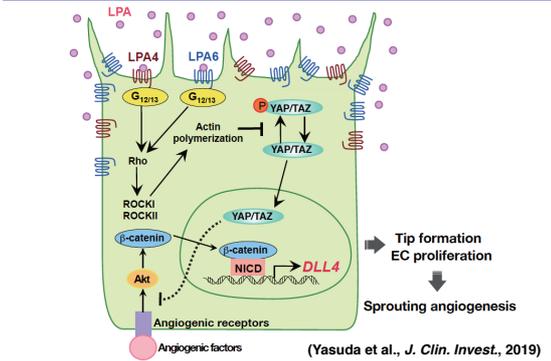


図10 : 結論



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuda Daisuke, Kobayashi Daiki, Akahoshi Noriyuki, Ohto-Nakanishi Takayo, Yoshioka Kazuaki, Takuwa Yoh, Mizuno Seiya, Takahashi Satoru, Ishii Satoshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid-induced YAP/TAZ activation promotes developmental angiogenesis by repressing Notch ligand Dll4	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 4332 ~ 4349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci121955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田大恭、小林大礎、吉岡和晃、多久和陽、石井聡
2. 発表標題 転写共役因子YAP/TAZを介したリゾホスファチジン酸の血管新生制御機構
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------