

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07425

研究課題名（和文）Hippo pathwayモデル線虫による新規PPI阻害剤の評価システムの構築

研究課題名（英文）Construction of evaluation system for novel PPI inhibitors based on the Hippo pathway in the model organism *C.elegans*

研究代表者

池田 八果穂（IKEDA, Yatsukaho）

大分大学・医学部・講師

研究者番号：80363547

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）：Hippo pathwayは多くの動物で進化的に保存された生命活動に重要なシグナル伝達経路である。本研究では、線虫の一種*Caenorhabditis elegans*をモデル生物としてHippo pathwayを制御する薬剤の探索・評価を可能にする生体モデルシステムの構築を目指して実験を行った。線虫を液体培地で培養しRNA干渉により遺伝子を抑制すると成虫の形態に変異が生じることがわかった。また、阻害剤を加えると形態や寿命に変化が生じ、効果は抑制した遺伝子の種類によって異なっていた。これらの結果から、線虫の遺伝子発現を制御し薬剤の効果を検証する実験が可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線虫はマウスなどに比べると飼育に大きな設備を必要とせず、短期間に大量に培養することができる。本研究では線虫を用いることで、より安価で網羅的な薬剤評価を行う生体モデルシステムの実現可能性を示すことができたものと考えられる。Hippo pathwayは細胞の増殖、腫瘍の抑制、器官の大きさ、再生といった重要な機能に関わるシグナル伝達経路であり、モデル線虫の表現型に変化をもたらす薬剤の探索は医薬品創出やガン研究に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The Hippo pathway is a signaling pathway that is evolutionarily conserved in many animals and is important for biological activities. In this study, we conducted experiments using *Caenorhabditis elegans*, a species of nematode, as a model organism with the aim of constructing a biological model system that enables the discovery and evaluation of drugs that regulate the Hippo pathway. We found that when *C. elegans* was cultured in liquid medium and genes were suppressed by RNA interference, the morphology of the adult worms was mutated. The addition of inhibitors also caused changes in morphology and lifespan, and the effects varied depending on the type of gene suppressed. These results indicate that it is possible to conduct experiments to control gene expression in *C. elegans* and verify the effects of drugs.

研究分野：生物学

キーワード：Hippo pathway モデル生物 線虫 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

(1) Hippo pathway はヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫など多くの動物で進化的に保存されたシグナル伝達経路である (図 1)。その機能は、細胞の増殖、腫瘍の抑制、器官の大きさの決定、幹細胞の維持や損傷組織の再生の調節など、多くの生命活動に極めて重要であることがわかってきた。研究分担者(松浦)らはヒト腎ガンの悪性化に Hippo pathway が関与していることを見出し、腎尿細管特異的に Hippo pathway の遺伝子をノックアウトしたマウスを作成した。このノックアウトマウスでは、腎尿細管での細胞・核の異型や細胞増殖、腎重量の減少、近位尿細管の発育不全と慢性炎症が見られたことから、Hippo pathway は正常上皮の発生と細胞・核の大きさの制御に関わり、Hippo pathway の機能低下によって細胞・核異型が起きることが明らかになった (引用文献①)。Hippo pathway は、ガンや再生医療の創薬標的として非常に注目されてきている (引用文献②) が、それらの標的探索や治療評価についてはまだ十分に明らかにされていない。医薬品創出やガン研究において、網羅的な薬剤評価が可能で安価な生体モデルシステムの構築は喫緊の課題である。

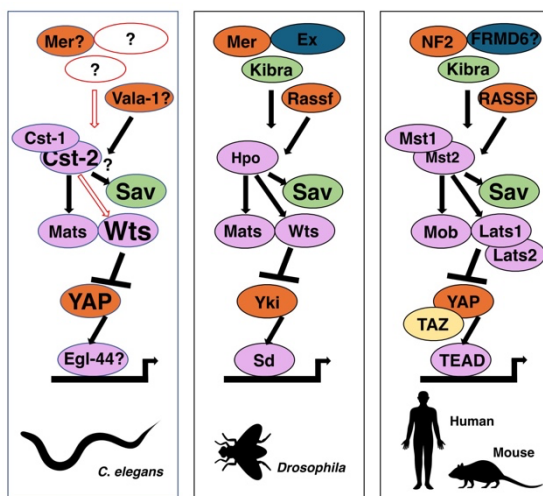


図 1 Hippo pathway

(2) 研究代表者(池田)はこれまで寄生虫研究に従事し、研究分担者(長谷川)とともに、種々の線虫の同定を行ってきた。また、研究代表者は研究分担者(松浦)とともに、腎ガンのモデル生物として Hippo pathway コンポーネント遺伝子のノックアウトマウスを作成し解析してきたが (引用文献①)、マウスを用いた研究では飼育に大きな設備を必要とし、モデル作成には多くの個体と日数を要する。そのような問題を解決するアプローチとして、より簡便に飼育できる線虫を用いて生体モデルシステムを構築することが効果的なのではないかと着想するに至った。

(3) 線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は、体長が約 1 mm と小さく、卵から成虫まで約 3 日で成長するため、大きな飼育設備を必要とせず、短期間に大量に培養できることが利点であり、また体が透明であるため顕微鏡観察に適している。全細胞系譜が既に明らかになっており、遺伝子数は約 15,000 で哺乳動物と共通する遺伝子も多い (引用文献③)。また、線虫では欠失させる遺伝子を複数組み合わせることが容易で、遺伝学的解析・スクリーニングに最適なモデル生物のひとつである。Hippo pathway については進化的に保存されているという報告があり (引用文献④)、変異体の表現型についての報告もある (引用文献⑤) が非常に少ない (図 2)。



図 2 線虫の一種 *Caenorhabditis elegans*

2. 研究の目的

本研究の目的は、線虫 (*C. elegans*) を用いて、RNA 干渉法により種々の Hippo pathway の単独または複数のコンポーネントを欠失させたモデル線虫を作成すること、その表現型を詳細に解析して RNA 干渉の結果を顕微鏡レベルで観察可能な形態変異として見出すこと、モデル線虫の表現型に変化をもたらす阻害剤を探索・同定することである。これらの方法の確立が、Hippo pathway を制御する薬剤の探索・評価を可能にする生体モデルシステムの構築につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 線虫の培養

線虫 (*C. elegans*) の培養には通常、プラスチックシャーレと NGM 寒天培地が用いられ、線虫は培

地上に増殖した大腸菌を餌として育つ。しかし本研究において RNA 干渉法や阻害剤の効果の検証を行うためには、より小さな環境でより多くの条件を検証できるような培養方法が望ましい。また PPI 阻害剤は DMSO に溶解した低分子化合物であるため寒天培地ではなく液体培地での実験が必要と考えられる。そこで、通常のプラスチックシャーレではなく 12~48 穴プレートと、寒天を含まない様々な濃度の NGM 液体培地、LB 液体培地、2×YT 液体培地を用いて線虫の培養に適した条件を検討した。

(2) ノックダウン

RNA 干渉は特定の遺伝子と相補的な 2 本鎖 RNA によって遺伝子発現が抑制(遺伝子のノックダウン)される現象であるが、本実験ではフィーディング法を用いた RNA 干渉を試みた。フィーディング法とは目的とする遺伝子を導入した大腸菌を線虫に餌として食べさせることによって線虫の遺伝子をノックダウンする方法である。この方法を用いて Hippo pathway のコンポーネントの遺伝子である yap-1、cst-2、sav-1、wts-2 について単独あるいはそれらの組み合わせを欠失した線虫の作成を試みた。

(3) 阻害剤

YAP 阻害剤である Verteporfin (Selleck)、CA3 (CIL56) (Selleck)、Super-TDU (Selleck) などの阻害剤を加えた NGM 液体培地で線虫を培養して比較を行なった。

4. 研究成果

(1) 線虫の培養

LB 液体培地や 2×YT 液体培地を用いて培養した場合、大腸菌が過剰な増殖することによって線虫が死滅してしまうことが多かった。一方、通常より低濃度の NGM 液体培地を用いると線虫が成虫まで正常に成長することが分かった。この結果、12 穴や 48 穴プレートを用いることによって、通常のプラスチックシャーレに比べ一度に多くの条件を試すことが可能になり、RNA 干渉や阻害剤の効果の検証に適した培養ができるようになった。

(2) ノックダウン

まずフィーディング法により RNA 干渉による Hippo pathway コンポーネント遺伝子のノックダウンを試みた結果、*C. elegans* の成虫において、遺伝子の種類や組み合わせによって陰門の突出が生じる(図 3)、体長に差が見られるといった形態変化が観察された。すなわち、Hippo pathway コンポーネント遺伝子をノックダウンしたモデル線虫を作成できることが分かった。ノックダウンした線虫から RNA を抽出し、cDNA 合成の後 qRT-PCR (quantitative real time PCR) を行った(図 4)。抑制した遺伝子はそのプライマーによる増幅でバンドが消失しており、組み合わせによるノックダウンでも同様であった。

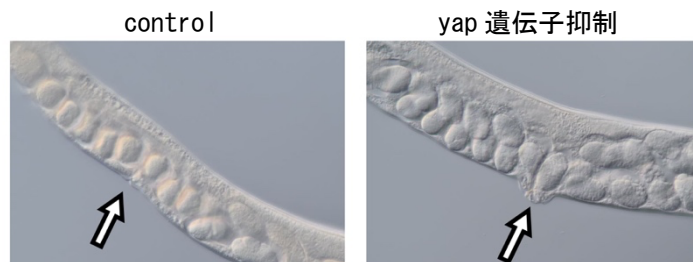


図 3 yap 遺伝子を抑制した線虫では陰門の突出が生じる

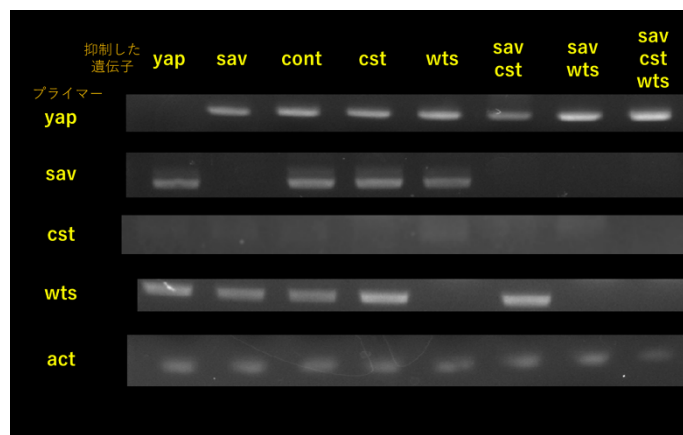


図 4 Hippo pathway コンポーネント遺伝子のノックダウン

(3) 阻害剤

阻害剤の投与は液体培地で行う必要があった。液体培地による RNA 干渉では、YAP 阻害剤である Verteporfin を用いると、*C. elegans* の成虫において陰門突出の割合が多く観察された。また、他の YAP 阻害剤を比較検討したところ、阻害剤により死亡したり寿命の短くなった線虫が認められた。

ノックダウンされた遺伝子の種類によって阻害剤の効果は異なっていた。すなわち、モデル線虫に阻害剤を作用させて表現型の変化を観察し、阻害剤の効果を検証する実験が可能であることが示された。ノックダウンした線虫から RNA を抽出し、cDNA 合成の後 qRT-PCR を行った (図 5)。抑制した SAV はそのプライマーによる増幅でバンドが減弱していたが、消失までには至っていなかった。阻害剤の作用はこれまでのところ遺伝子発現レベルでは明らかになっていない。

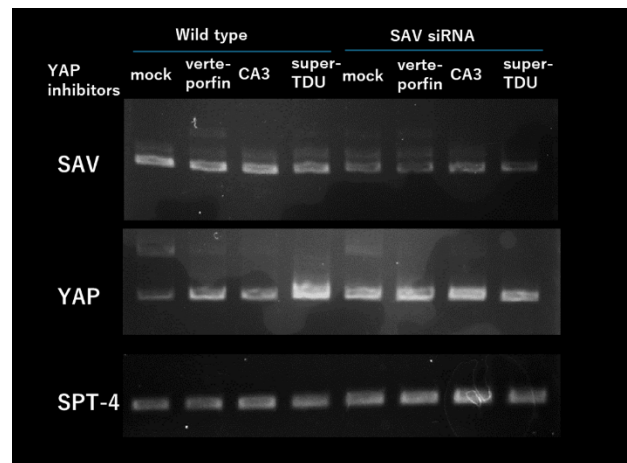


図 5 遺伝子のノックダウンと阻害剤の効果

以上の結果から、Hippo pathway の複数の遺伝子についてノックダウンしたモデル線虫が作成できること、ノックダウンの結果を線虫の形態変化として観察できること、薬剤の効果を検証する実験が可能であることが示されたと言える。これらの成果を発展させることによって Hippo pathway を制御する薬剤評価システムの構築を目指し、さらなる研究を行っていきたい。

<引用文献>

- ① Kai, T. et al. Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyperproliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *The Journal of Pathology* 239, 97-108 (2016).
- ② Guo, L. & Teng, L. YAP/TAZ for cancer therapy: Opportunities and challenges (Review). *International Journal of Oncology* 46, 1444-1452 (2015).
- ③ WormBase : Nematode Information Resource. <https://wormbase.org/>
- ④ Hilman, D. & Gat, U. The Evolutionary History of YAP and the Hippo/YAP Pathway. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2403-2417 (2011).
- ⑤ Iwasa, H. et al. Yes-associated protein homolog, YAP-1, is involved in the thermotolerance and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Experimental Cell Research* 319, 931-945 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Matsuura Keiko, Kushio Satoshi, Imai Hiromitsu, Kudo Hideo, Wakuda Hirokazu, Otani Naoyuki, Kuranari Masae, Sekiguchi Ai, Ohyama Tetsuji, Uemura Naoto | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Association between psychomotor function and ALDH2 genotype after consuming barley shochu: A randomized crossover trial | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Translational Science | 6. 最初と最後の頁 686 ~ 693 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cts.13482 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hasegawa Hideo, Hayashi Kei, Akita Yuko, Une Yumi, Huffman Michael A., Matsuura Keiko | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 Developmental Stages of <i>Grassinema procaviae</i> Petter, 1959 (Cosmocercoidea: Atractidae) Found in the Stomach of Cape Hyrax (<i>Procavia capensis</i>) | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Parasitology | 6. 最初と最後の頁 366 ~ 373 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1645/21-117 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hasegawa Hideo, McLennan Matthew R., Huffman Michael A., Matsuura Keiko | 4. 巻 107 |
| 2. 論文標題 Notes on Morphology and Life History of <i>Probstmayria gombensis</i> (Nematoda: Cosmocercoidea: Atractidae), Parasitic in Eastern Chimpanzees, <i>Pan troglodytes schweinfurthii</i> , in Bulindi, Uganda | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Parasitology | 6. 最初と最後の頁 155 ~ 162 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1645/20-88 | 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 該当する |

〔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 松浦恵子、吉田知弘、池田八果穂、甲斐友喜、守山正胤、三股浩光 |
| 2. 発表標題 腎特異的SAV1ノックアウトマウスはVHL欠失とは異なる表現型を示す |
| 3. 学会等名 第109回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|-----------|--|----------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 長谷川 英男 (HASEGAWA Hideo) (00126442) | 大分大学・医学部・名誉教授 (17501) | |
| 研究 分担者 | 松浦 恵子 (MATSUURA Keiko) (00291542) | 大分大学・医学部・教授 (17501) | |

| | 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 |
|-----------|-------------------------------|-----------------------|----|
| 研究 協力者 | 小路 弘行 (KOUJI Hiroyuki) | | |
| 研究 協力者 | 日笠 弘基 (HIKASA Hiroki) | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|