

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15363

研究課題名(和文)硬さによる1次繊毛制御の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of primary cilia regulation via extracellular stiffness.

研究代表者

徳永 雅之 (TOKUNAGA, Masayuki)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10845043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外の力学刺激は細胞の増殖・分化を制御する一方で、細胞は適切な細胞外環境を維持する。YAPはこの恒常性維持機構において中心的役割を担い、YAPメカノホメオスタシスが提唱されている。しかし、細胞外の力学刺激がどうYAPに伝達されるかの詳細は不明である。これまでに、YAPとARHGAP11Aがネガティブフィードバックを形成することを明らかにしてきた。しかし、ARHGAP11Aの細胞内局在制御機構は不明な点が多い。本研究では、ARHGAP11Aは細胞外環境の硬さを感じてその細胞内局在を変化させることでHippo経路とメカノセンサーである1次繊毛を介してYAPを負に制御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

本研究は、細胞外環境の硬さによるARHGAP11Aを介したYAPの制御機構の一端を解明しようとするものである。がん組織において、組織が硬くなることはよく知られているが組織の硬さとがんの悪性化には不明な点が多い。本研究により細胞外環境によるYAPの制御機構が解明できれば、新たながん治療の標的になりうるため、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Extracellular mechanical stimuli regulate cell growth and differentiation, while cells maintain an appropriate extracellular environment; YAP play a central role in this homeostatic mechanism and therefore YAP mechanohomeostasis has been proposed. However, the detail mechanisms of how extracellular mechanical stimuli are transmitted to YAP are still unclear. It has been shown that YAP and ARHGAP11A form negative feedback. However, the mechanisms regulating the subcellular localisation of ARHGAP11A remain unclear. In this study, I show that ARHGAP11A negatively regulates YAP via the Hippo pathway and mechanosensing primary cilia by sensing the stiffness of the extracellular environment and altering its subcellular localisation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：YAP ARHGAP11A 硬さ 1次繊毛

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞外の力学刺激は細胞の増殖・分化を制御する一方で、細胞は適切な細胞外環境を維持する。YAPはこの維持機構において中心的役割を担うため YAP メカノホメオスタシスが提唱されている。しかし、細胞外の力学刺激がどう YAP に伝達されるか詳細は不明である。申請者は、これまでに ARHGAP11A が 1 次繊毛を介して細胞外の力学刺激を細胞内に伝達する因子である可能性を見出している。

### 2. 研究の目的

本研究では、ARHGAP11A が 1 次繊毛形成にどのように寄与しているのか？と細胞外環境の硬さの変化による ARHGAP11A の局在変化はどのように制御されているか？の二つの問いを明らかにする。またこれまでの研究成果をもとに、YAP-ARHGAP11A ネガティブフィードバックの生理的意義を明らかにすることを目的とした。さらに並行して、ARHGAP11A のほかに YAP を制御する新規ネガティブフィードバック分子の同定も試みた。

### 3. 研究の方法

(1) ARHGAP11A または YAP を、siRNA を用いてノックダウン後、硬さの違う PAAm ゲル上で細胞を培養し、蛍光免疫染色法により ARHGAP11A あるいは YAP の細胞内局在を解析した。

(2) ARHGAP11A を、siRNA を用いてノックダウン後、回収して Cell Cycle Assay Solution で染色後フローサイトメーターを用いて細胞周期を測定した。

(3) 新規 YAP ネガティブフィードバック分子の同定を行うために、Hippo 経路およびアクチン制御分子の BioID データと siYAP または siControl の RAN シークエンスのデータを解析し、YAP の標的遺伝子かつ、YAP 活性を制御する分子、すなわち新規 YAP フィードバック分子の候補を絞り込んだ。それら分子に対し、レンチウイルスベクターによる shRNA ノックダウンを行い、YAP の細胞内局在を蛍光免疫染色法により解析し、候補分子が YAP 活性を制御するかどうかを明らかにした。

### 4. 研究成果

(1) ARHGAP11A は培養細胞では主に核内に局在しており、核局在配列(NLS)を有していることを明らかにしている。さらに、NLS 欠失 ARHGAP11A を発現させると Hippo 経路を介して YAP を負に制御することを明らかにしている。しかし、ARHGAP11A が細胞質に移行するメカニズムは不明であった。YAP は細胞外の硬さにより細胞内局在が変化することが報告されているため、ARHGAP11A も同じく硬さにより細胞内局在が制御されていると予想し実験を行った。ポリアクリルアミドゲルを用いて 5 kPa または 15 kPa の硬さのゲルを作製し、そのゲル上で細胞を培養した。その後、蛍光免疫染色を用いて YAP と ARHGAP11A の細胞内局在を比較した。その結果、5 kPa のゲル上では ARHGAP11A も YAP も細胞質に局在していた。一方で、15 kPa では ARHGAP11A も YAP も核内に局在していた。また、5 kPa のゲル上で培養した細胞では、血清の有無にかかわらず 1 次繊毛が形成されていた。YAP は 10 kPa の硬さを境に細胞内局在を変化させると報告されており、ARHGAP11A も同じ挙動を示すことが明らかとなった。細胞外の硬さにより YAP が細胞内局在を変化させる詳細なメカニズムは明らかになっていない。次に、siRNA を用いて Arhgap11a をノックダウンしたあと、5 kPa のゲル上で培養し蛍光免疫染色を行った。その結果、ARHGAP11A のノックダウンした細胞において、YAP は核に局在していた(図 1)。上で述べた通り、YAP は 5 kPa という細胞外環境が柔らかい状態にあるときは細胞質に局在し活性が抑えられている。これらの結果から、ARHGAP11A は細胞外環境を感知してその細胞内局在を変化させることにより、YAP 活性を負に制御していることが示唆される。

(2) これまでの RNA シークエンスの成果から、ARHGAP11A をノックダウンした細胞において細胞増殖を促進する分子の発現が増加している。また、1 次繊毛を分解する分子の発現が亢進している。これらの結果が

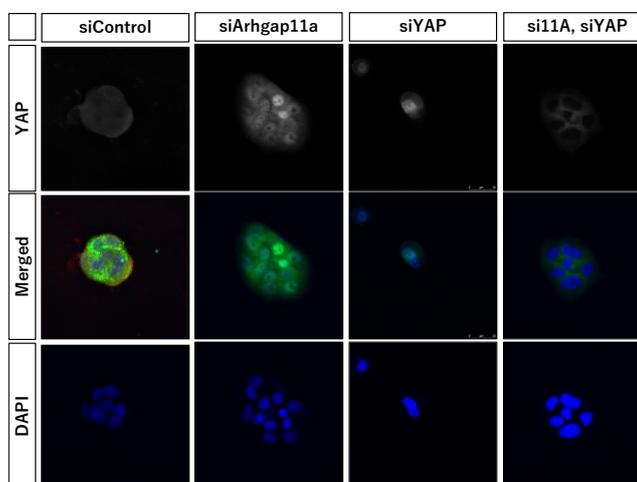


図 1. siRNA によりそれぞれの遺伝子をノックダウン後 5 kPa 上で培養した細胞の蛍光免疫染色像

ら、ARHGAP11A のノックダウンにより細胞増殖が亢進している可能性がある。そこで、siArhgap11a または siControl を処理した細胞を回収し、フローサイトメトリー法を用いて、細胞周期を解析した。しかしながら、コントロールと比較して ARHGAP11A をノックダウンした細胞において差は認められなかった。今後は Fucci を用いてさらに解析を行う予定である。

(3) 硬さを介した YAP 制御機構についてさらに研究を進めるために、YAP を制御する上流分子の相互作用分子を同定した BioID データと、siRNA による YAP KD 後の RNA-seq のデータを解析し、YAP の標的遺伝子かつ YAP を制御する、YAP フィードバック分子候補として 39 分子を見出した。さらに、shRNA レンチウイルスベクターによるスクリーニングを行った。その結果 ANO6 を KD すると YAP の核移行が促進した。すなわち、ANO6 を新規 YAP ネガティブフィードバック分子として同定した (図 2)。

### Scheme of YAP-feedback molecules screening

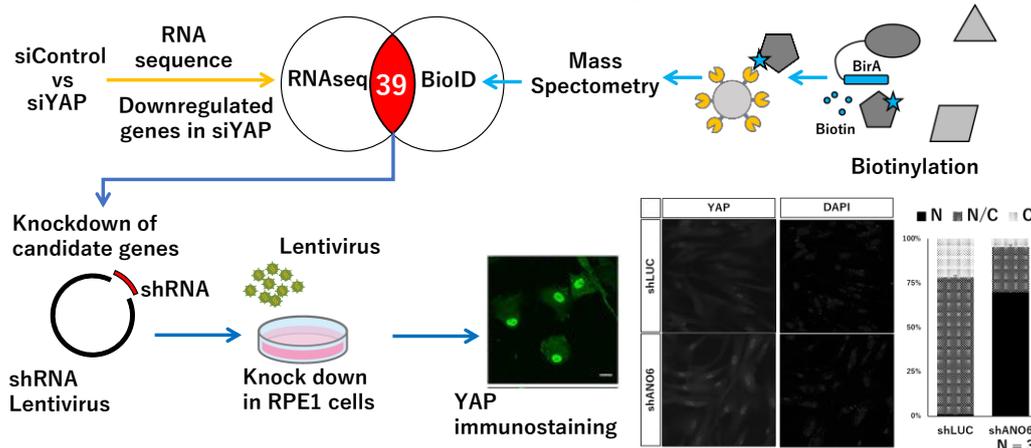


図 2. 新規 YAP フィードバック分子のスクリーニング

Hippo 経路および Actin 制御分子の BioID および siYAP の RNAseq データより絞り込んだ候補 39 分子のうち ANO6 を新規分子として同定した。

これらの研究成果により ARHGAP11A は細胞外の硬さを感じ YAP を抑制することで、細胞増殖を抑える、新規メカノトランスデューサー分子であることが示唆される。また、ARHGAP11A は 1 次繊毛形成促進にも関与している。1 次繊毛は水流の機械刺激に応答することは報告されているが、細胞外基質の硬さと 1 次繊毛を報告した例はこれまでにない。一部のがん細胞では 1 次繊毛が減少していることが報告されている。さらに、がん組織が周辺組織に比べ硬くなることは周知の事実である。これらのことから、YAP-ARHGAP11A の破綻が、がん細胞において 1 次繊毛を介した細胞増殖抑制を阻害し、がんの悪性化に寄与している可能性がある。実際、ヒト膀胱がん組織において蛍光免疫染色により、1 次繊毛の数を計測した結果、筋層への浸潤が有るがんでは浸潤が認められないがん比べ、1 次繊毛の数が増加していることが確認できた (図 3)。今後は、新たに同定した YAP ネガティブフィードバック分子である ANO6 とともに、YAP 活性の細胞外環境の硬さと ARHGAP11A および ANO6 を介した制御機構の詳細解明を目指すとともに、がんにおけるこの経路の破綻がどのようにがんの悪性化に寄与しているかを解明していく。

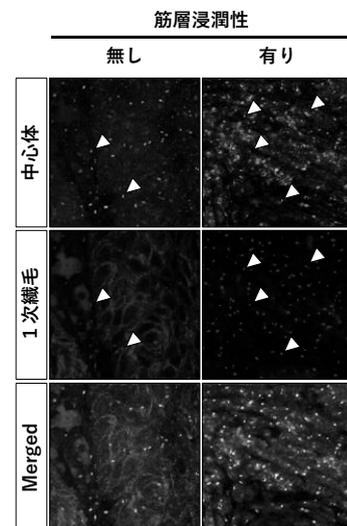


図 3 ヒト膀胱がん組織における 1 次繊毛の染色像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------