

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790325

研究課題名(和文) Hippoシグナル伝達系の活性を制御する化合物の探索とその応用

研究課題名(英文) Chemical compound screening and development for Hippo signaling pathway

研究代表者

中川 健太郎 (NAKAGAWA, KENTARO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：70451929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHippo pathwayにより活性が制御されている転写コアクチベーターTAZの機能を促進する化合物の探索を行い、得られたTAZ活性化化合物の医療応用展開を目的として研究をすすめた。TAZ活性化化合物の1つ、IBS008738がヘビ毒で誘発されるマウスの骨格筋損傷モデル、ステロイド誘発性筋萎縮モデルにおいて筋線維の回復を促進する作用があることを見出した。また探索から得られたIBS008738以外のTAZ活性化化合物についても筋芽細胞の筋管への分化を促進する化合物が複数存在することを確認しており、本研究はTAZ活性化化合物が筋萎縮に有効な薬剤開発につながる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The mammalian Hippo pathway is composed of mammalian Ste20-like (MST) kinases and large tumor suppressor (LATS) kinases. Upon the activation of the pathway, transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) and yes-associated protein (YAP) are phosphorylated and recruited to the cytosol from the nucleus, and gene transcription is turned off. TAZ cooperates with various transcriptional factors and plays various roles. We developed a cell-based assay using sphere formation by TAZ-expressing MCF10A cells as a readout to screen 18,458 chemical compounds for TAZ activators. In this study, we focused on one compound, IBS008738. IBS008738 facilitates muscle repair in cardiotoxin-induced muscle injury and prevents dexamethasone-induced muscle atrophy. Thus, this cell-based assay is useful to identify TAZ activators with a variety of cellular outputs. Our findings also support the idea that TAZ is a potential therapeutic target for muscle atrophy.

研究分野：医化学一般

科研費の分科・細目：細胞内シグナル伝達

キーワード：化合物ライブラリー 創薬 筋萎縮 Hippo pathway 転写コアクチベーター

1. 研究開始当初の背景

Hippo pathway は、MST キナーゼ(MST1、MST2)と LATS キナーゼ(LATS1、LATS2)を中核とするキナーゼカスケードである。Hippo pathway は細胞密度の上昇、細胞接着の成立に反応して活性化し最終的に転写コアクチベーターである YAP、TAZ をリン酸化する。リン酸化された YAP、TAZ は核外に移行し、遺伝子転写が抑制される。その結果、細胞増殖が抑制され、分化や細胞死が誘導される。Hippo pathway は腫瘍抑制シグナルとして研究が進んできたが、一方で、YAP や TAZ の活性化は幹細胞の維持や間葉系幹細胞の分化制御に重要であることが示されている。遺伝学的な手法で Hippo pathway やその構成因子の研究は進められていたが、この情報伝達系に作用する薬や化合物などはほとんど知られておらず、薬理的な知見は乏しい状況であった。

2. 研究の目的

Hippo pathway の活性を制御するような化合物は腫瘍抑制剤の開発や分化を制御する化合物の開発など様々な細胞応答の制御方法の開発につながることで、また Hippo pathway や YAP、TAZ の機能解明にも有用であると考えられた。Hippo pathway の活性を制御する低分子化合物の探索を行うこととし、本研究では特に TAZ の活性化を制御し、TAZ による筋分化を促進する化合物の探索、開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト不死化乳腺上皮細胞株である MCF10A 細胞に TAZ の 89 番目のセリンをアラニンに置換した恒常的活性化型 TAZ を発現させた MCF10A 細胞 (MCF10A-TAZ SA) は、浮遊培養条件下でスフィアとよばれる細胞塊を形成し増殖する (図 1A)。野生型の TAZ を過剰発現させた細胞(MCF10A-TAZ)にはスフィア形成能がないが、この細胞も TAZ をリン酸化し機能抑制するキナーゼである LATS1/2 をノックダウンするとスフィア形成能を獲得する (図 1B)。TAZ を強制発現させていない MCF10A 細胞において LATS1/2 の発現を抑制してもスフィアの形成は誘導されない。またスフィア形成能を持つ LATS1/2 を発現抑制した MCF10A-TAZ 細胞で TAZ をノックダウンするとやはりスフィアの形成能は失われる (図 1C)。TAZ の活性化によりスフィアを形成する MCF10A-TAZ 細胞を利用して、東京医科歯科大学所有の化合物ライブラリーから、TAZ 活性化化合物の探索を行うこととした。合計 18,548 個の化合物から TAZ 依存的にスフィア形成を誘導する化合物を 50 個獲得した。これらの化合物に関して、TAZ による転写因子 TEAD の活性化や TAZ による細胞応答に与える効果を測定し、特に骨格筋の分化を促進する化合物に焦点をあてて解析を行った。

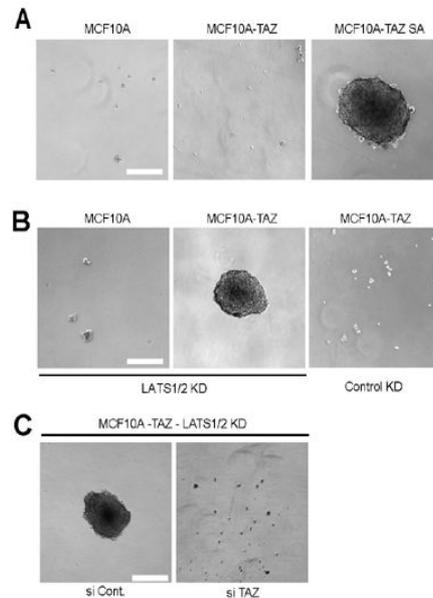


図1. MCF10A細胞はTAZの活性化依存的にスフィアを形成する。

4. 研究成果

(1) TAZ 活性化化合物の解析と C2C12 マウス筋芽細胞の筋分化に対する TAZ 活性化化合物の効果の検討

HEK293 細胞を用いた TEAD 応答レポーターアッセイにより TAZ の転写活性化に対する 50 個の化合物の添加効果を検討し、絞り込みを行った。TAZ を共発現させると TEAD レポーター活性が上昇するが、47 個の化合物の添加により更に活性の上昇が確認された。この 47 個の化合物に関して 10 μ M の化合物存在下で C2C12 細胞の筋管形成を誘導し、myofusion index により化合物の筋分化促進効果を定量した。さらに、筋分化マーカーである myosin heavy chain (MHC)、myogenin の発現を比較し、筋分化促進活性の高い IBS008738 という化合物を本研究の解析対象とした (図 2A)。

(2) IBS008738 の C2C12 細胞の筋分化に対する作用

C2C12 細胞は細胞密度が高くなっている状態で 2%ウマ血清を含む分化誘導培地で培養すると、細胞が融合し多核の筋管細胞へと分化する。この分化誘導時に IBS008738 を添加するとコントロールの DMSO を添加した細胞に比べて形成される筋管の太さ、長さともに増大している様子が観察された。筋分化マーカーである myogenin や MHC の免疫蛍光染色画像からも IBS008738 によりこれらのマーカーを発現する細胞が増えている様子が観察された (図 2B)。筋管細胞分化の指標である fusion index を用いて IBS008738 の添加効果を定量したところ、1 μ M の濃度で筋分化を促進していることが認められた (図 2C)。この IBS008738 による筋分化促進効果は TAZ をノックダウンすると認められなくなることから TAZ を介した作用であると考えられる (図 2D)。

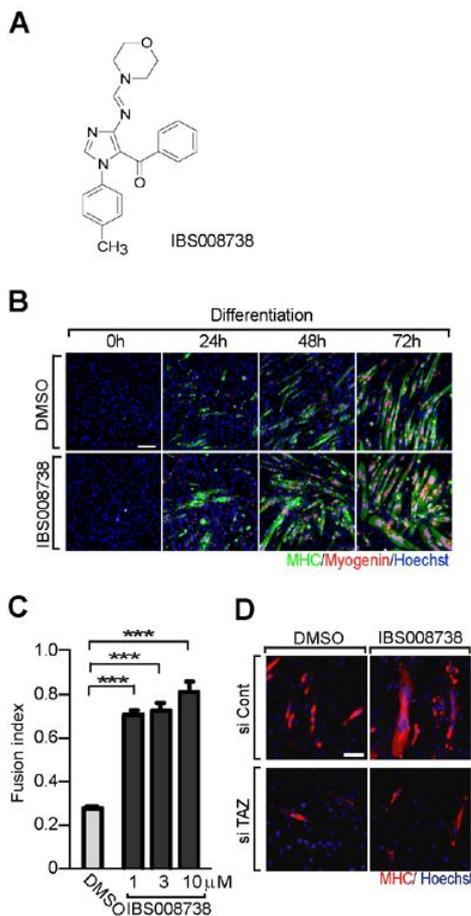


図2. TAZ活性化化合物 IBS008738 はC2C12細胞の筋分化を促進する

(3) マウス筋損傷・再生モデルとステロイド誘発性筋萎縮モデルに対する IBS008738 の投与効果

個体レベルでの IBS008738 の骨格筋に対する作用の解析を行った。蛇毒 cardiotoxin を DMSO もしくは IBS008738 と共にマウスの前脛骨筋に局所投与して筋壊死を惹起し、その後の筋再生における IBS008738 の効果を検討した。Hematoxylin-eosin (HE)染色像から、IBS008738 を投与したマウスにおいて再生後の骨格筋に特徴的な中心核を有する筋線維が増えていることが認められた。筋線維基底膜を構成する分子の一つである laminin の染色画像から筋線維横断面積を画像処理ソフトである Image J を用いて計測したところ、IBS008738 投与マウスでは個々の筋線維がコントロールのマウスにくらべて肥大している様子が観察された。成体マウスでは筋衛星細胞が組織幹細胞として機能し、筋損傷からの回復時に増殖して筋芽細胞に分化し筋線維の回復に寄与することが知られている。IBS008738 を投与したマウスの骨格筋では基底膜下に存在する Pax7 陽性の筋衛星細胞が 5 日目には増加しており、7 日目には 14 日後と同様の割合まで低下している様子が認められた。このことは、IBS008738 投与により筋損傷に応じて早い段階で筋衛星細胞が

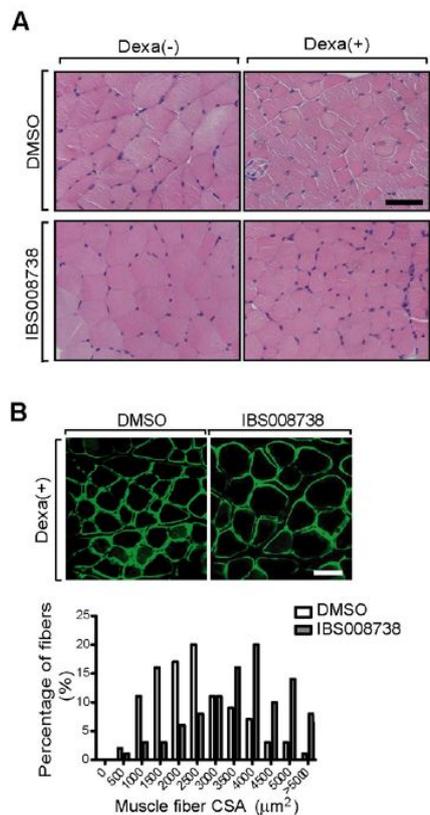


図3. IBS008738はステロイド誘導性の筋萎縮を抑制する。

増加していることを示唆する。

さらに Dexamethasone (Dex) 25mg/kg/day の 1 週間連日腹腔投与によりステロイド筋萎縮モデルを作成し、Dex 連日投与後にマウス下肢に IBS008738 ないし DMSO を隔日投与、14 日目に効果を判定した。Dex 投与により筋線維が細くなり筋線維間に間隙が生じるが、IBS008738 を筋注したマウスの骨格筋ではこの筋線維の萎縮が緩和している様子が認められた(図 3 A)。Laminin で染色し、筋線維の筋線維横断面積を計測したところ、IBS008738 を投与した骨格筋では筋線維横断面積が大きい細胞が対照群に比べて多く存在していることが判明した(図 3 B)。このことから IBS008738 にはステロイド筋萎縮からの回復を促進する作用があることが示唆される。

本研究では IBS008738 に着目し解析を進めたが、IBS008738 以外にも TAZ 活性化化合物のなかには複数の筋分化を促進する活性を有する化合物が含まれており、TAZ 活性化化合物の解析および展開は筋萎縮に有効な薬剤の開発につながる可能性が考えられる。

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 12 件)

Yang Z, Nakagawa K, Sarkar A, Maruyama J, Iwasa H, Bao Y, Ishigami-Yuasa M, Ito S,

Kagechika H, Hata S, Nishina H, Abe S, Kitagawa M, Hata Y. Screening with a Novel Cell-Based Assay for TAZ Activators Identifies a Compound That Enhances Myogenesis in C2C12 Cells and Facilitates Muscle Repair in a Muscle Injury Model. *Mol. Cell Biol.* 34 巻9号 1607-21. (2014) 査読有

Iwasa H, Kudo T, Maimaiti S, Ikeda M, Maruyama J, Nakagawa K, Hata Y. The RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis in the cell cycle via MDM2 protein and p53 protein. *J. Biol. Chem.* 288 巻42号 30320-30329 (2013) 査読有

Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa K, Mitsudomi T, Osada H, Hata Y, Sekido Y. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 83 巻1号 23-9. (2014) 査読有

Iwasa H, Maimaiti S, Kuroyanagi H, Kawano S, Inami K, Timalisina S, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. Yes-associated protein homolog, YAP-1, is involved in the thermotolerance and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Cell Res.* 319 巻7号 931-45 (2013) 査読有

Iwasa H, Kuroyanagi H, Maimaiti S, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. Characterization of RSF-1, the *Caenorhabditis elegans* homolog of the Ras-association domain family protein 1. *Exp. Cell Res.* 319 巻3号, 1-11 (2013) 査読有

Nishio M, Hamada K, Kawahara K, Sasaki M, Noguchi F, Chiba S, Mizuno K, Suzuki S, Dong Y, Tokuda M, Morikawa T, Hikasa H, Eggenschwiler J, Yabuta N, Nojima H, Nakagawa K, Hata Y, Nishina H, Mimori K, Mori M, Sasaki T, Mak TW, Nakano T, Itami S, Suzuki A. Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice. *J. Clin. Invest.* 122 巻12号 4505-4518 (2012) 査読有

Kudo T, Ikeda M, Nishikawa M, Yang Z, Ohno K, Nakagawa K, Hata Y. The RASSF3 candidate tumor suppressor induces apoptosis and G1/S cell cycle arrest via p53. *Cancer Res.* 72 巻11号 2901-2911 (2012) 査読有

Reynolds N, Latos P, Hynes-Allen A, Loos R, Leaford D, O'Shaughnessy A, Mosaku O, Signolet J, Brennecke P, Kalkan T, Costello I, Humphreys P, Mansfield W, Nakagawa K, Strouboulis J, Behrens A, Bertone P, Hendrich B. NuRD Suppresses Pluripotency Gene Expression to Promote Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment. *Cell Stem Cell* 10 巻5号 583-94 (2012) 査読有

Withanage K, Nakagawa K, Ikeda M, Kurihara H, Kudo T, Yang Z, Sakane A, Sasaki T, Hata Y. Expression of RASSF6 in kidney and the implication of RASSF6 and the Hippo signal in the sorbitol-induced apoptosis in renal proximal

tubular epithelial cells. *J. Biochem.* 152 巻1号 111-119 (2012) 査読有

Hata S, Hirayama J, Kajihito H, Nakagawa K, Hata Y, Katada T, Furutani-Seiki M, Nishina H. A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo signal is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 287 巻26号 22089-22098 (2012) 査読有

Bao Y, Nakagawa K, Yang Z, Ikeda M, Withanage K, Ishigami-Yuasa M, Okuno Y, Hata S, Nishina H, Hata Y. A cell based-assay to screen stimulators of the Hippo signal reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. *J. Biochem.* 150 巻2号 199-208 (2011) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

中川 健太郎、Yang Zeyu、Kanchanamala Withanage、畑裕：「ハイスループット細胞機能探索システムを用いた Hippo pathway 活性化化合物探索の試み」第84回日本生化学会大会シンポジウム(2011年9月21日)。京都国際会館(京都)

中川 健太郎、どど 孝介 世話人シンポジウム：「ケミカルライブラリースクリーニング再考：アカデミアで意味あるケミカルライブラリースクリーニングを実現するために」第86回日本生化学会大会シンポジウム(2013年9月11日)。パシフィコ横浜(神奈川県)

中川 健太郎、Yang Zeyu、畑裕「転写共役因子 TAZ を活性化する薬剤はマウスモデルにおける骨格筋の再生を促進する」(2013年9月11日)。パシフィコ横浜(神奈川県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：筋形成促進剤、筋萎縮抑制剤、医薬組成物及び TAZ 活性化剤

発明者：畑 裕、影近 弘之、中川 健太郎、伊藤 茂

権利者：同上

種類：特許

番号：2014-22287

出願年月：2014年02月12日

国内外の別：国内

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

(1)研究代表者
中川 健太郎 (NAKAGAWA KENTARO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：70451929

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：