

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2012～2012
 課題番号：24659030
 研究課題名（和文）器官サイズ制御因子 YAP 依存的肝癌誘発系の開発とマイクロRNAの網羅的発現解析
 研究課題名（英文）Development of YAP-dependent hepatic tumor formation and analysis of global expression of related microRNAs
 研究代表者
 仁科 博史（NISHINA HIROSHI）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
 研究者番号：60212122

研究成果の概要（和文）：Hippo シグナル伝達系は、近年、発生・分化・器官サイズ・癌の発症進展を制御することが明らかにされ、国内外から急速に注目されている。本研究では、hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法という簡便に肝臓特異的に遺伝子を導入する方法を用いて、Hippo 系主要標的転写共役因子 YAP の活性の gain of function による肝癌誘発状態を作り出し、マイクロアレイ解析によって、マウス肝臓での転写情報を解析することを目的とした。その結果、1) 効率の良い肝癌誘発系の確立に成功した。また、2) cDNA マイクロアレイによる発現解析を行い、YAP によって発現が亢進する遺伝子を約 20 種類同定することに成功した。ヒト肝癌発症のメカニズム解明に貢献する研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently, YAP was shown to play an important role in organ size control and to be inhibited by the Hippo signaling pathway. Either transgenic overexpression of YAP or knockout of Hippo pathway genes in mouse liver results in enlargement of this organ and the eventual development of hepatic tumors. In this study, we used the method of hydrodynamic tail vein injection (HTVi) that is specific for gene transfer into liver. As a results, we succeeded in establishing an efficient system of liver cancer induction due to gain of function of the active YAP. Secondly, we analyzed the gene expression by cDNA microarray and identified more than 20 genes whose expression is increased by active YAP. Thus, our results could contribute to elucidate the mechanism of human liver cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：YAP、肝癌、細胞競合、アポトーシス、cDNA、マイクロRNA、HTVi 法、網羅的遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

Hippo シグナル伝達系は、ショウジョウバエの器官サイズを制御することが明らかにされていたが、哺乳動物における器官サイズ制御や肝癌発症における役割に関しては未解明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

Hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法というモザイク状に肝臓特異的に遺伝子を導入する方法を用いて、1) Hippo 系主要標的転写共役因子 YAP の活性の gain of functionによる肝癌誘発状態を作り出すこと、2) マイクロアレイや Chip-seq 解析によって、マウス肝臓での転写情報を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

肝臓での安定な発現を期待して、アルブミンプロモーターの下流に、メダカと保存性の高いヒトの野生型および 5SA 変異 YAP をコードする cDNA を挿入したベクターを利用した。hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法によって、4~8週令のマウスに、上記発現ベクターを導入した。導入後3~6ヶ月の肝臓に肝癌が形成されているか否かを検討した。癌が発症した場合は、タンパク質解析用、microRNA マイクロアレイ用、cDNA マイクロアレイ用、Chip-seq 解析用、組織染色用に肝臓を分けて処理した。

4. 研究成果

本研究で用いた HTVi 法による肝細胞への導入効率は約30%であり、活性型 YAP 変異体 (5SA) はモザイク状に導入された。野生型 YAP の導入によっては肝癌の誘導は観察されなかったが、活性型の YAP (5SA) を導入した場合は、6ヶ月後にはほぼ100%の頻度で肝細胞癌の誘導に成功した。また、各種変異体の解析から、肝癌の誘導には遺伝子の転写が必須であることが示された。次に cDNA マイクロアレイによる発現解析を行い、YAP によって発現が亢進する遺伝子を約20種類同定することに成功した。現在、これらが発現誘導に及ぼす効果を検討している。マイクロRNA の解析も同様に進行している。

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14件)

1. Shoji Hata, Jun Hirayama, Hiroaki Kajiho, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Toshiaki Katada, Makoto

Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2012) A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 287, 22089-22098.

2. Yoshimi Uchida, Tomomi Osaki, Tokiwa Yamasaki, Tadanori Shimomura, Shoji Hata, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata, Takeshi Todo, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Involvement of the Stress Kinase Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7 in the Regulation of the Mammalian Circadian Clock. *J. Biol. Chem.* 287, 8318-8326.

3. Yoshimi Uchida, Tadanori Shimomura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activate ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells. *Appl. Magn. Reson.* 42, 69-77.

4. Miki Nishio, Koichi Hamada, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Fumihito Noguchi, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno, Satoshi O. Suzuki, Youyi Dong, Masaaki Tokuda, Takumi Morikawa, Hiroki Hikasa, Jonathan Eggenschwiler, Norikazu Yabuta, Hiroshi Nojima, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Hiroshi Nishina, Koshi Mimori, Masaki Mori, Takehiko Sasaki, Tak W. Mak, Toru Nakano, Satoshi Itami, and Akira Suzuki (2012) Cancer Susceptibility and

- embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice. *J. Clin. Invest.* 122(12):4505-4518.
5. Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi, Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tohru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma (2012) Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential. *PLoS ONE* 7(1):e29677
 6. Ken Okada, Akihide Kamiya, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hidenori Ito, Hiroki Kondou, Hiroshi Nishina and Hiromitsu Nakauchi (2012) Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem Cells and Development* 21, 1124-1133.
 7. Takuya Iwamoto, Shuji Terai, Yuko Mizunaga, Naoki Yamamoto, Kaoru Omori, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, and Isao Sakaida (2012) Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion and improves liver function in cirrhotic mice and patients *J. Gastroenterol.* 47, 300-312.
 8. Toshiyuki Oishi, Shuji Terai, Shinya Kuwashiro, Koichi Fujisawa, Toshihiko Matsumoto, Hiroshi Nishina and Isao Sakaida (2012) Ezetimibe reduces fatty acid quantity in liver and decreased inflammatory cell infiltration and improved NASH in medaka model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 22-27.
 9. Shoji Hata and Hiroshi Nishina (2012) [Letters to the Editor] Reply to Sun et al.: Targeting YAP acetylation in cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 35443.
 10. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina (2012) [review] Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain. *J. Signal Trans.* 2012: 459265.
 11. Hiroshi Nishina (2012) [commentary] hDlk-1: A cell surface marker common to normal hepatic stem/progenitor cells and carcinomas. *J. Biochem.* 152, 121-123.
 12. 平山順、仁科博史：活性酸素シグナルと概日リズム：実験医学 2012 年 11 月増刊号 羊土社 36-41 (2012)
 13. 宮村憲央、仁科博史：モデル生物を用いた肝発生および肝サイズ制御機構の解明：肝胆膵 65：21-28 (2012)
 14. 宮村憲央、瀬藤光利、仁科博史：質量顕微鏡法を用いたマウス再生肝の解析：生化学 84：680-684 (2012)
- [学会発表] (計 31 件)
1. Tokiwa Yamasaki; Analyses of physiological functions of stress kinase MKK7 in developing cortex and adult nervous system [Yale CNR seminar, New Haven, USA, April 2012]
 2. Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents [2012 FASEB Science Research Conference, Aspen, USA, July 2012]

3. Tokiwa Yamasaki; Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex [Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, New Orleans, USA, Oct 2012]
4. Shoji Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents [International Symposium on GENETIC AND EPIGENETIC CONTROL OF CELL FATE, Kyoto, Japan, November 2012]
5. Hiroshi Nishina; Liver Formation and Disease: Lessons from Fish and Mouse [4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Taipei, Taiwan, November 2012]
6. 仁科博史; Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [第9回心血管幹細胞研究会; 2012年1月/東京]
7. 仁科博史; Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [東京大学薬学セミナー; 2012年1月/東京]
8. 仁科博史; モデル生物を用いた器官形成機構の解明 [山口大学医学部セミナー; 2012年1月/宇部]
9. 岩月麻美子他; 神経組織特異的Mkk7欠損マウスの解析 [第132回日本薬学会; 2012年3月/札幌]
10. 畠星治; がん遺伝子産物YAPの新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第16回日本肝臓医学研究会; 2012年3月/熱海]
11. 宮村憲史; がん遺伝子YAPによる肝細胞がんの発症機構の解明 [第16回日本肝臓医学研究会; 2012年3月/熱海]
12. 仁科博史; 質量顕微鏡法 [第55回日本腎臓学会学術総会; 2012年6月/横浜]
13. 畠星治他; がん遺伝子産物YAPの新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第19回肝細胞研究会; 2012年6月/札幌]
14. 宮村憲史他; がん遺伝子産物YAPによる細胞競合および肝がん誘導系の確立 [第19回肝細胞研究会; 2012年6月/札幌]
15. 内田好海他; ストレス応答性キナーゼMKK7による概日リズム制御機構の解明 [第11回生命科学研究会; 2012年6月/秋田]
16. 浅岡洋一; ストレス応答性MAPキナーゼシグナル伝達系のゼブラフィッシュ初期胚における役割の解明 [第34回日本比較生理生化学会; 2012年7月/葉山] 第21回吉田奨励賞受賞講演
17. 山崎世和他; 細胞の生死を制御するストレス応答性MKK7の神経系における生理的役割の解明 [第21回日本Cell Death学会; 2012年7月/名古屋]
18. 仁科博史; マウスとメダカから学ぶ肝形成と肝疾患 [秋田大学医学部セミナー; 2012年8月/秋田]
19. 有馬蒼恵他; 神経細胞特異的欠損マウスを用いた概日リズム制御機構におけるストレス応答性キナーゼMKK7の機能解析 [第11回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム; 2012年9月/福岡]
20. 内田好海他; ストレス応答性MKK7-JNKシグナル経路による分子時計制御 [第11回ファーマバイオフォーラム2012; 2012年9月/福岡]
21. 平山順他; ストレス応答性リン酸化酵素による概日リズム制御 [第19回日本時間生物学会学術大会; 2012年9月/札幌]

22. 山崎世和他 ; JNK signaling is required for the maintenance of motor performance in old-age animals [第35回日本神経科学大会 ; 2012年9月 / 名古屋]
23. 平山順他 ; Light-dependent UV-tolerance in zebrafish early embryo [第18回小型魚類研究会 ; 2012年9月 / 京都]
24. 浅岡洋一他 ; Analysis of the Hippo signaling pathway regulating neuronal differentiation in the retina. [第18回小型魚類研究会 ; 2012年9月 / 京都]
25. 宮村憲央 ; がん遺伝子YAPによる肝細胞癌発症機構の解明 [第17回日本肝臓医生物学研究会 ; 2012年10月 / 旭川]
26. 千葉恭敬 ; がん遺伝子YAP誘導性肝細胞がんのゲノム解析 [第17回日本肝臓医生物学研究会 ; 2012年10月 / 旭川]
27. 斎藤光介 ; YAPパラログTAZの肝がん誘導能の検討 [第17回日本肝臓医生物学研究会 ; 2012年10月 / 旭川]
28. 浅岡洋一 ; 器官サイズ制御因子YAPの網膜分化における機能解析 [第5回RRM; 2012年12月 / 東京]
29. 仁科博史 ; がん遺伝子 *yap* 依存的異常肝細胞の排除と肝細胞がんの発症 [第35回日本分子生物学会年会 ; 2012年12月 / 福岡]
30. 平山順他 ; ストレス応答性キナーゼによる概日リズム制御 [第35回日本分子生物学会年会 ; 2012年12月 / 福岡]
31. 畠星治他 ; がん遺伝子産物YAPアセチル化サイクルの同定 [第85回日本生化学会大会 ; 2012年12月 / 福岡]

[図書] (計2件)

1. 畠星治、仁科博史 : Hippoシグナリング : シグナル伝達キーワード事典 ; 羊土社 58-60 (2012)
2. 仁科博史 : 薬学用語辞典、東京化学同人

(分担執筆) (2012)

[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
<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.html>
1

6. 研究組織
(1) 研究代表者
仁科 博史 (NISHINA HIROSHI)
東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授
研究者番号 : 60212122