

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670021

研究課題名(和文) 器官サイズ制御因子 YAP 標的転写産物の網羅的発現解析

研究課題名(英文) Analysis of YAP-dependent gene expression that regulates organ size.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：Hippoシグナル伝達系は、器官サイズや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、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、効率の良い肝癌誘発系の確立に成功し、関連遺伝子を約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 result, 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.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学

キーワード：器官サイズ 転写 シグナル伝達 YAP アセチル化 リン酸化

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、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、また、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。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

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、肝癌の誘発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5件)

1. Norie Arima, Yoshimi Uchida, Ruoxing Yu, Koh Nakayama and Hiroshi Nishina (2013) Acetylcholine Receptors Regulate Gene Expression that Is Essential for Primitive

Streak Formation in Murine Embryoid Bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 447-453.

2. Menno J. Oudhoff, Spencer A. Freeman, Amber L. Couzens, Frann Antignano, Ekaterina Kuznetsova, Paul H. Min, Jeffrey P. Northrop, Bernhard Lehnertz, Dalia Barsyte-Lovejoy, Masoud Vedadi, Cheryl H. Arrowsmith, Hiroshi Nishina, Michael R. Gold, Fabio M.V. Rossi, Anne-Claude Gingras, and Colby Zaph (2013) Control of the Hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Dev. Cell* 26, 188-194. □□
3. Yoichi Asaoka, Shuji Terai, Isao Sakaida and Hiroshi Nishina (2013) [review] The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Disease Models & Mechanisms* 6, 905-914.

和文

1. 浅岡洋一：初期発生期における JNK シグナル伝達経路の多様な生理的役割：比較生理生化学 30: 59-67 (2013)
2. 山崎世和、仁科博史：脳における SAPK/JNK シグナルの役割：CLINICAL NEUROSCIENCE；中外医学社 31: 654-656 (2013)

[学会発表](計22件)

国際学会発表

1. Shoji Hata, Yutaka Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of YAP is triggered to S_N2 alkylating agentnts [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
2. Norio Miyamura and Hiroshi Nishina; A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal hepatocyte

- disappearance [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
3. Menno J. Oudhoff et al.; Control of the Hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
 4. Yoichi Asaoka et al.; Hippo signaling pathway-mediated three dimensional construction of the epithelial tubular structures. [1st International Meeting for Epithelial Tubulology, Sapporo, June 22-23, 2013]
 5. Yoshimi Uchida ; Mouse embryonic stem cell-based drug screen for novel modulators of mesoderm and ectoderm differentiation. [8th International Symposium of the Institute Network, Kyoto, June 27-28, 2013]
 6. Hiroshi Nishina ; A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal hepatocyte disappearance. [The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells, Osaka, September 26-27, 2013]
- 国内学会発表
1. 仁科博史 ; ストレス応答性 MKK の生化学・生理機能の解明 [新潟大学医歯学系分子細胞機能学セミナー; 2013年3月4日 / 新潟]
 2. 内田好海他 ; 標的既知化合物ライブラリーを用いた中胚葉分化制御シグナルの探索 [第 133 回日本薬学会年会; 2013 年 3 月 27-30 日 / 横浜]
 3. 有馬誉恵他 ; 心筋細胞分化におけるアセチルコリン受容体の機能解析 [第 133 回日本薬学会年会; 2013 年 3 月 27-30 日 / 横浜]
 4. 仁科博史 ; 肝臓のサイズとがん発症を制御する Hippo シグナル伝達系 [日本生化学会関東支部例会; 2013 年 6 月 15 日 / 山梨]
 5. 山崎世和他 ; ストレス応答性キナーゼ MKK7 の高次脳機能における役割 [第 12 回生命科学研究会 ; 2013 年 6 月 28-29 日 / 青森]
 6. 仁科博史 ; 細胞の生死を制御する JNK シグナル伝達系の新規生理機能の解明 [第 22 回日本 Cell Death 学会; 2013 年 7 月 19-20 日 / 京都]
 7. 畠星治他 ; DNA 損傷誘導性 YAP アセチル化修飾の同定 [第 22 回日本 Cell Death 学会; 2013 年 7 月 19-20 日 / 京都]
 8. 仁科博史 ; Roles of Hippo signaling pathway in murine liver [第 86 回日本生化学会大会; 2013 年 9 月 11-13 日 / 横浜]
 9. 有馬誉恵他 ; マウス初期胚におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析 [第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム; 2013 年 9 月 14-15 日 / 東京]
 10. 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と機能解析 [第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム ; 2013 年 9 月 14-15 日 / 東京]
 11. 平山順他 ; Study on a light signaling pathway for circadian entrainment in zebrafish [第 19 回小型魚類研究会 ; 2012 年 9 月 20-21 日 / 仙台]
 12. 浅岡洋一他 ; Analysis of the Hippo-Yap signaling pathway controlling the retinal cell differentiation. [第 19 回小型魚類研究会; 2013 年 9 月 20-21 日 / 仙台]
 13. 平山順他 ; Analysis of a light signaling pathway for circadian entrainment using *zCry1a* and *zPer2* knock out zebrafish [第 20 回日本時間生物学会学術大会; 2013 年 11 月 9-10 日 / 東大阪]
 14. 平山順他 ; ゼブラフィッシュ初期胚における概日リズム形成の分子機構 [定量生物学の会 第 6 回年会 ; 2013 年 11 月 23-24 日 / 吹田]

15. 仁科博史；異常肝細胞排除現象の発見と
機構解明 [第 19 回日本肝臓医生物学研究会；2013 年 11 月 30 日 / 札幌]
16. 有馬誉恵他；マウス三胚葉形成における
ムスカリン性アセチルコリン受容体の機能
解析 [第 36 回日本分子生物学会年会；
2013 年 12 月 3-6 日 / 神戸]

〔図書〕(計 0 件)

〔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.htm](http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.html)
l

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

(2) 研究分担者：

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：