

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293012

研究課題名(和文) 肝臓組織構築制御における細胞品質管理機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of cellular quality control in liver tissue formation

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) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：老化や形質転換あるいは損傷した細胞は、組織の機能を損ない、腫瘍形成に至る。しかしながら、この品質管理がどのように制御されているかはほとんど不明である。本研究で我々は、マウス肝臓におけるモザイク解析を行うことで、Hippo経路の不活性化によって誘導されるYAP活性化が、障害を受けた肝細胞を選択的に排除することを見出した。これら障害肝細胞は、毛細血管である類洞へ移動し、細胞死を経て、クッパー細胞によって貪食される。この過程には、細胞移動を制御するCDC42やRacの活性化が関与する。このように、YAPはストレスセンサーとして機能し、障害細胞の排除を誘導し、組織や器官の恒常性を維持する。

研究成果の概要(英文)：The presence of senescent, transformed, or damaged cells can impair tissue function or lead to tumorigenesis. However, how this quality control is regulated remains largely unclear. Here, using in vivo mosaic analysis in mouse liver, we show that YAP activation induced by inactivation of the Hippo pathway specifically in damaged hepatocytes induces their selective elimination. These damaged hepatocytes migrate into the hepatic sinusoids, undergo apoptosis, and are engulfed by Kupffer cells. This involves the activation of CDC42 and Rac to regulate cell migration. Thus, YAP acts as a stress sensor that induces the elimination of injured cells to maintain tissue and organ homeostasis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：肝臓 シグナル ストレス 器官形成

1. 研究開始当初の背景: 成体マウスやラットの肝臓に若い肝細胞を移植すると、肝臓のサイズは一定のまま若い移植肝細胞が宿主の古い肝細胞を競合的に排除して当該組織内の占有領域を順次拡大していく (Oertel *et al.*, *Gastroenterology* 2006)。この現象は、“哺乳動物組織における細胞競合”の例として知られ、高等動物の組織構築や老化細胞の排除、移植医療における細胞競合の重要性を示唆している。また、哺乳動物培養細胞を用いた実験から、細胞競合には1)細胞死誘導型と2)細胞隔離型の2種類の排除様式があると考えられる。しかしながら、哺乳動物組織における細胞競合の分子機構は未解明である。一方、強力な遺伝学とモザイク解析が利用可能なショウジョウバエを用いた研究から、細胞競合に関わるシグナル伝達系が明らかにされつつある。これまでにリボソームタンパク質遺伝子に変異を持つ異常細胞が野生型細胞に近接すると競合の敗者(loser)となり、JNK シグナル系に依存した細胞死を起こすこと (Moreno *et al.*, *Nature* 2002)。また、組織構築と器官サイズを制御する Hippo シグナル系のシグナル強度の差異がショウジョウバエ上皮細胞競合を引き起こすこと (Wu *et al.*, *Genetics* 2007; Neto-Silva *et al.*, *Dev Cell* 2010; Ziosi *et al.*, *PLoS Genet* 2010) が示されている。申請者は、遺伝子欠損マウスの作出と解析から、JNK シグナル系が哺乳動物の肝発生に必須であること (*Nature* 1997; *Development* 1999; *Nature Cell Biol* 2004)、さらには JNK 系と Hippo 系がクロストークすること (*EMBO J* 2006; *Mol Cell Biol* 2007; *Cell Death Diff* 2011) を明らかにしてきた。これらの結果を基盤として、申請者はマウス肝臓の細胞競合の分子機構を解明すべく、モザイク解析技術を駆使した哺乳類 Hippo 系の *in vivo* 解析に着手した。
 2. 研究の目的: 本研究では、マウス肝臓における正常細胞-異常細胞間の競合機構の解析を行い、免疫系とは異なる新たな細胞レベルの品質管理機構の解明を目的とした。申請者はこれまでに、変異遺伝子をマウス肝臓にモザイク状に導入する実験法により、Hippo シグナル伝達経路が破綻した異常肝細胞と正常肝細胞との間の競合モデルの確立に成功している。興味深いことに、この競合現象は免疫系とは独立した現象であり、この競合を制御することで肝細胞がんが発症する。(1) 異常肝細胞の運命を追跡することで、組織内で起こる細胞競合を詳細に解析し、正常肝細胞による異常肝細胞の排除機構の分子機構を解明する。また、(2) 細胞競合を制御することで発症する肝細胞がんの解析を行うことで、肝がん発症機構の解明を目指した。
 3. 研究の方法: マウス尾静脈から肝臓にモザイク状に遺伝子を導入する技術 HTVi 法を用いて、Hippo 系破綻を模倣した活性化 YAP を肝臓でモザイク状に発現するマウスを作成した。活性化 YAP を発現する異常肝細胞と正常肝細胞の間の競合を観察できる実験系を確立し、免疫組織染色、cDNA アレイ解析、ウエスタンブロット、PCR 解析などを行った。
 4. 研究成果: 1) Hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法を用いて活性化 YAP 発現肝細胞をモザイク状に肝臓内に誘導すると、これらは1週間以内に速やかに消失した。2) 活性化 YAP 発現肝細胞は類洞内に移動し、細胞死を経て、クッパー細胞に貪食されること、3) 免疫不全 NOG マウスにおいても活性化 YAP 発現肝細胞は同様に消失することが判明した。4) 一方、アデノウイルスベクターによって活性化 YAP 発現肝細胞をモザイク状に誘導すると、肝細胞は増殖し、肝臓サイズは増大した。5) 興味深いことに、HTVi 法の操作や EtOH を付加すると、活性化 YAP 発現肝細胞は増殖から排除へとその細胞運命は変化した。以上の結果は、障害肝細胞で YAP が活性化されると、移動/細胞死を経て、クッパー細胞によって排除されることを示唆する。Hippo-YAP 経路は肝臓の環境に応じて異なる細胞応答を誘導することで、肝臓の恒常性を維持していると考えられる。期待以上の研究成果が得られた。
 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40件)
英文論文はすべて査読有り
1. Yoshimi Okamoto-Uchida¹, Ruoxing Yu¹, Norio Miyamura, Norie Arima, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika, Suguru Yoshida, Takamitsu Hosoya, Makiko Nawa, Takeshi Kasama, Yoichi Asaoka, Reiner Wimmer Alois, Ulrich Elling, Josef M. Penninger, Sachiko Nishina, Noriyuki Azuma and Hiroshi Nishina (2016) The mevalonate pathway regulates primitive streak formation via protein farnesylation. *Scientific Reports* 6, 37697. (¹Contributed equally) Press release
 2. Takanori Chiba¹, Erika Ishihara¹, Norio Miyamura, Rika Narumi, Mihoko Kajita, Yasuyuki Fujita, Akira Suzuki, Yoshihiro Ogawa

- and Hiroshi Nishina (2016) Active form of YAP expressing MDCK cells are extruded apically depending on neighboring cells status. *Scientific Reports* 6, 28383. Press release
3. Yoichi Asaoka, Yoko Nagai, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2016) SLC7 family transporters control the establishment of left-right asymmetry during organogenesis in medaka by activating mTOR signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 146-153.
4. Miki Nishio, Keishi Sugimachi, Hiroki Goto, Jia Wang, Takumi Morikawa, Yosuke Miyachi, Yusuke Takano, Hiroki Hikasa, Tohru Itoh, Satoshi O Suzuki, Hiroki Kurihara, Shinichi Aishima, Andrew Leask, Takehiko Sasaki, Toru Nakano, Hiroshi Nishina, Yuji Nishikawa, Yoshitaka Sekido, Kazuwa Nakao, Kazuo Shin-ya, Koshi Mimori and Akira Suzuki (2016) Dysregulated YAP1/TAZ and TGF β signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, E71-E80.
5. Yusuke Nasu, Yoichi Asaoka, Misako Namae, Hiroshi Nishina, Hideaki Yoshimura and Takeaki Ozawa (2016) Genetically Encoded Fluorescent Probe for Imaging Apoptosis in vivo with Spontaneous GFP Complementation. *Analytical Chemistry* 88, 838-844.
6. Shunta Nagashima, Junichi Maruyama, Shodai Kawano, Hiroaki Iwasa, Kentaro Nakagawa, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika, Hiroshi Nishina and Yutaka Hata (2016) Validation of chemical compound library screening for transcriptional co-activator with PDZ-binding motif inhibitors using GFP-fused transcriptional co-activator with PDZ-binding motif. *Cancer Science* 107, 791-802.
7. Koichi Fujisawa, Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Takahiro Yamasaki, Toshihiko Matsumoto, Kazuhito Yamaguchi, Yuji Owada, Hiroshi Nishina, Takafumi Noma and Isao Sakaida (2016) Modulation of anti-cancer drug sensitivity through the regulation of mitochondrial activity by adenylate kinase 4. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 16, 35 (1), 48.
8. 石原えりか、仁科博史：メカノトランスダクションにおける Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達経路の役割 CLINICAL CALCIUM Vol 26, No 12, 101-106 (2016)
9. 石原えりか、仁科博史：Hippo-YAP/TAZ シグナルによる幹細胞・前駆細胞の分化制御 実験医学増刊「組織幹細胞」34, 62-67 (2016)
10. 石原えりか、仁科博史：Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達経路とメカノトランスダクション 医学のあゆみ 257: 1037-1042 (2016)
11. 宮村憲央、仁科博史：器官サイズを制御する Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達経路 ライフサイエンス 領域融合レビュー (2016)
12. 石原えりか、仁科博史：Hippo-YAP シグナル伝達経路を介した細胞競合 医学のあゆみ 257: 16108-16112 (2016)
13. 石原えりか、千葉恭敬、仁科博史：活性型 YAP 発現によって誘導される哺乳動物細胞の排除現象：生体の科学、Vol 67, No 2, 107-110 (2016)
14. 仁科博史：細胞のシグナル伝達 第1版 (Lim et al.) (翻訳分担) メディカル・サイエンス・インターナショナル (2016)
15. 仁科博史：分子細胞生物学 第7版 (Lodish et al.) (翻訳分担) 東京化学同人 (2016)
16. Sean Porazinski¹, Huijia Wang¹, Yoichi Asaoka¹, Martin Behrndt¹, Tatsuo Miyamoto¹, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabby Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura,

- Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina*, Carl-Philipp Heisenberg* and Makoto Furutani-Seiki* (2015) YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* 521, 217-221 (*Corresponding authors) Press release
17. Ruoxing Yu, Norio Miyamura, Yoshimi Okamoto-Uchida, Norie Arima, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika and Hiroshi Nishina (2015) A Modified Murine Embryonic Stem Cell Test for Evaluating the Teratogenic Effects of Drugs on Early Embryogenesis. *PLoS ONE* 10 e0145286
18. Koichi Fujisawa, Shuji Terai, Toshihiko Matsumoto, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Hiroshi Nishina, Makoto Furutani-Seiki and Isao Sakaida (2015) Evidence for a Role of the Transcriptional Regulator Maid in Tumorigenesis and Aging. *PLoS ONE* 10 e0129950
19. Shoudai Kawano, Junichi Maruyama, Shunta Nagashima, Kazutoshi Inami, Wenzhe Qiu, Hiroaki Iwasa, Kentaro Nakagawa, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika, Hiroshi Nishina, Yutaka Hata (2015) A cell-based screening for TAZ activators identifies ethacridine, a widely used antiseptic and abortifacient, as a compound that promotes dephosphorylation of TAZ and inhibits adipogenesis in C3H10T1/2 cells. *J. Biochem.* 158, 413-423.
20. Yuta Motimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima and Hideaki Tomura (2015) Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 493-499.
21. 仁科 博史：概論—多細胞社会を制御する Hippo シグナルと標的分子 YAP/TAZ ; 2908-2912
22. 古谷—清木 誠、浅岡 洋一、仁科 博史：細胞張力と 3D 臓器形成 ; 2913-2919
23. 仁科 博史：Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達経路：再生医療 Vol. 14, No. 4、91-93 (2015)
24. 千葉 恭敬、仁科 博史：肝臓形成および肝がんにおける Hippo-YAP シグナル経路の役割；別冊 医学のあゆみ 61-65 (2015)
25. 細胞工学別冊「最新バイオ論文解説総集編 1 今、この論文が熱い」(2015) 仁科 博史：Hippo-YAP/TAZ シグナル研究の展開と新機能の解明：18-21
26. 浅岡 洋一、古谷-清木 誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科 博史：扁平メダカの解析から判明した脊椎動物の新しい 3D 器官形成機構：44-45
27. 仁科 博史：扁平メダカを単離して 3D 器官形成の仕組みを探る！：BioResource Now! Vol.11, No.8, 2015
28. 浅岡 洋一、古谷-清木 誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科 博史：扁平メダカの解析から判明した脊椎動物の新しい 3D 器官形成機構：細胞工学 8月号 GRAPHIC HOT PRESS 34: 796-797 (2015)
29. 仁科 博史：細胞が重力でつぶれない仕組みを発見：nature ダイジェスト Japanese Author (インタビュー) 12, 18-20 (2015)
30. 古谷-清木 誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科 博史：脊椎動物の体の 3D 構造の形成に必須な重力耐性遺伝子の同定：実験医学 7月号 CURRENT TOPICS 33, 1769-1772 (2015)
31. 石原 えりか、仁科 博史：器官の形成と恒常性維持を制御する Hippo シグナル伝達経路：実験医学増刊 知る・見る・活かす！シグナリング研究 2015 33：50-55 (2015)
32. 浅岡 洋一、古谷-清木 誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科 博史：YAP は脊椎動物の三次元形態を生み出す組織張力の制御に必要不可欠である：ライフサイエンス統合データ

ベース FIRST AUTHOR'S

33. 宮村 憲央、仁科 博史：肝発生；肝胆膵70：335-341（2015）
34. Yoichi Asaoka^{*}, Shoji Hata, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina^{*} (2014) The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PLoS ONE* 9, e97365
35. Tadanori Shimomura, Norio Miyamura, Shoji Hata, Ryota Miura, Jun Hirayama^{*} and Hiroshi Nishina^{*} (2014) The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 917-923.
36. Zeyu Yang, Kentaro Nakagawa, Aradhan Sarkar, Junichi Maruyama, Hiroaki Iwasa, Yijun Bao, Mari Ishigami-Yuasa, Shigeru Ito, Hiroyuki Kagechika, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, Shinya Abe, Masanobu Kitagawa, Yutaka Hata (2014) Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1607-1621.
37. Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki (2014) Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardiac bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo. *J. Biochem.* 155, 235-241.
38. Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Koichi Fujisawa, Tsuyoshi Ishikawa, Yohei Urata, Haruko Tanimoto, Takuya Iwamoto, Yuko

- Mizunaga, Takashi Matsuda, Takashi Oono, Miho Marumoto, Guzel Burganova, Luiz Fernando Quintanilha, Isao Hidaka, Yoshio Marumoto, Issei Saeki, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Kenji Tani, Yasuho Taura, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita, and Isao Sakaida (2014) [review] Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 20, 1-5.
39. 千葉 恭敬、仁科 博史：肝臓形成および肝がんにおける Hippo-YAP シグナル経路の役割；医学のあゆみ 251：405-409（2014）
40. 畠 星治、堅田 利明、仁科 博史：器官サイズを調節する転写共役因子 YAP の活性制御；生化学 86：464-468（2014）

〔学会発表〕(計77件)

1. 仁科博史；器官サイズ制御シグナルHippo系による組織形成機構とその破綻病態[神戸大学医学部セミナー；2014年1月10日/神戸大学(神戸市)]
2. 仁科博史；Mouse Embryonic Stem Cell-Based Drug Screen for Novel Modulators of Cell Differentiation in Early Mammalian Embryogenesis[熊本大学HIGO Program；2014年2月12日/熊本大学(熊本市)]
3. 内田好海、仁科博史；マウス胚性幹細胞を用いた薬剤スクリーニングによる三胚葉分化制御シグナルの同定とスタチン催奇性発症機構の解明[第20回日本肝臓医生物学研究会；2014年2月15日/八重洲ホール(東京都)]
4. 有馬誉恵、仁科博史；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134回日本薬学会；2014年3月27-30日/熊本大学(熊本市)]
5. Ruoxing Yu and Hiroshi Nishina；Assessment of teratogenic mechanisms of FDA pregnancy category D and X drugs

- using murine ES cell-derived 3D culture system [第 134 回日本薬学会 ; 2014 年 3 月 27-30 日 / 熊本大学 (熊本市)]
6. 仁科博史 ; 器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態 [東京女子医科大学セミナー ; 2014 年 5 月 29 日 / 東京女子医大 (東京都)]
7. 内田好海、仁科博史 ; スタチンの初期胚発生に対する作用機構の解明 [第 13 回生命科学研究会 ; 2014 年 6 月 20-21 日 / 北海道大学 (札幌市)]
8. 浅岡洋一、仁科博史 ; 器官サイズ制御因子 Yap の網膜視細胞分化における機能解析 [第 13 回生命科学研究会 ; 2014 年 6 月 20-21 日 / 北海道大学 (札幌市)]
9. 宮村憲央、仁科博史 ; 成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する [第 21 回肝細胞研究会 ; 2014 年 6 月 27-28 日 / 東京医科歯科大学 (東京都)]
10. 内田好海、仁科博史 ; スタチン催奇性の分子機構の解明 [第 21 回肝細胞研究会 ; 2014 年 6 月 27-28 日 / 東京医科歯科大学 (東京都)]
11. 仁科博史 ; 器官サイズを制御する転写共役因子 YAP の役割 [第 23 回日本 Cell Death 学会 ; 2014 年 7 月 18-19 日 / 東京医科歯科大学 (東京都)]
12. 浅岡洋一、仁科博史 ; 器官サイズを制御する Hippo-Yap シグナル伝達系の網膜分化における機能解析 [第 23 回日本 Cell Death 学会 ; 2014 年 7 月 18-19 日 / 東京医科歯科大学 (東京都)]
13. 浅岡洋一 他 ; Hippo signaling regulates a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. [日本比較生理生化学会第 36 回大会 ; 2014 年 7 月 28 日 ~ 8 月 1 日 / 北海道大学 (札幌市)]
14. ~77. は、5 ページに収めるために省略。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/>

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

浅岡 洋一・助教 (ASAOKA, Yoichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

平成 26 年 4 月 ~ 平成 27 年 8 月

山口大学大学院医学系研究科・講師

平成 27 年 9 月 ~ 平成 28 年 3 月

研究者番号 : 10436644

(3) 連携研究者

平山 順 (HIRAYAMA, Jun)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

平成 26 年 4 月 ~ 平成 29 年 3 月

研究者番号 : 90510363

宮村 憲央 (MIYAMURA, Norio)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

平成 28 年 4 月 ~ 平成 29 年 3 月

研究者番号 : 10725493

(4) 研究協力者

堅田 利明 (KATADA, Toshiaki)

東京大学大学院薬学研究科・教授

宮島 篤 (MIYAJIMA, Atsushi)

東京大学大学分子細胞生物学研究所・教授