

令和元年6月3日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K08626
研究課題名(和文) YAP1/TAZによる細胞間コミュニケーション

研究課題名(英文) Role of YAP1/TAZ in cell competition

研究代表者

西尾 美希 (Nishio, Miki)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：10467897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：二次元培養下のMDCK細胞では活性化型YAP発現細胞が野生型 YAP発現細胞に対して敗者となるが、この現象は NIH3T3細胞や PAM細胞などの哺乳類細胞においても観察された。PAM細胞では活性化型 YAP発現細胞は上方に突出し重層し、野生型YAP発現細胞株は扁平な単層状態で、dish底により強固に接着した。一方、低接着dish培養下の混合培養においては、活性化型YAP発現細胞が勝者となり、足場非依存性の強い増殖を示した。いずれの培養下においてもdishを細胞外マトリックスでコートすると敗者側細胞の増殖の回復が見られたことから、これらの細胞増殖変化は足場接着によることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異なる形質を有する同種の細胞間で適応度の高い細胞が生き残り、適応度の低い細胞が排除される「競合」現象が生じることが哺乳類細胞においても報告されたが、この細胞間コミュニケーション制御機構に關する遺伝子群はほとんど分かっていなかった。本研究ではこの細胞間「競合」現象におけるYAP1の役割を詳細に解析することで、哺乳類細胞の細胞間コミュニケーション制御機構におけるHippo経路の関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In mammalian cells, the cell with constitutively active YAP became "loser" and eliminated by the cell competition. This type of cell competition was observed in NIH3T3 cell and PAM cell in addition to previously reported MDCK cell. YAP-activated cells were prone to extrude and form a multi-stacked cell layer, when cultured with wild-type cells that were tightly attached to culture vessels and grew within flat monolayer. In contrast, when cultured on low-binding culture vessels, the YAP-activated cells turned to be "winner", because YAP-activated cells retained proliferation ability in anchorage-independent manner but wild-type cells did not. Intriguingly, in both cases, ECM coating of culture vessels strengthened binding of "loser" cells to the vessels and restored their proliferation, blunting "loser" cell elimination by cell competition. These observations suggest that the binding of cells to culture vessels and ECM may play a role in cell competition of mammalian cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：YAP1 細胞競合

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞間競合とは、適応度の高い細胞と低い細胞が共存した際、異なる細胞間の境界で生じる相互作用によって、適応度の高い細胞が「勝者」として生き残り、適応度の低い細胞が「敗者」となって組織から排除される細胞間コミュニケーション制御機構として知られていた。細胞間コミュニケーション研究は主にショウジョウバエを用いた遺伝学的な研究が先行していたが、近年哺乳類培養細胞を用いた実験によっても、正常上皮細胞とがん原性変異細胞間で細胞間競合現象が生じ、正常上皮細胞に隣接する変異細胞が上皮細胞層から排除されることなどが示されていた。このことは、「免疫細胞を介さない、同種細胞同士の細胞排除機構」という、生体恒常性維持における新たな細胞間コミュニケーションの分子メカニズムとして注目されつつあった。しかしながら、哺乳類の細胞間競合に関与する遺伝子群や、生体内における生理学的意義については未だほとんど分かっていなかった。

Hippo 経路はショウジョウバエにおいて細胞外力や張力などの細胞外環境を感知して細胞増殖を制御し、劇的な器官サイズ変化をもたらすことが報告された。Hippo 経路のコア複合体は、Hippo(哺乳類相同分子は MST), Warts(LATS)の2つのキナーゼと、Salvador(SAV1), Mats(MOB1)の2つのアダプター分子の合計4分子からなり、これらが Hippo 経路最下流で転写共役遺伝子の Yki(YAP1/TAZ)や転写因子 TEADs の活性を負に制御して作用する(図1)。近年になって、ショウジョウバエ Yki は細胞競合などの細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たすシグナル経路であることが明らかになりつつあり注目を集めていた。

Yki は、細胞競合に重要ながん遺伝子産物 Myc を転写標的とすること、細胞競合を制御する Apico-basal 極性に関連分子群は Hippo 経路を制御すること、実際に Yki を過剰発現させた細胞は「勝者」となり周囲の「敗者」細胞を排除し、自身の過形成を引き起こすことなどから、Hippo-Yki 経路は細胞競合を介した細胞間コミュニケーションの鍵プレーヤーと考えられていた。しかしながら哺乳類 Hippo 経路やその下流の YAP1/TAZ の役割は未だ不明であった。

申請者はこれまでに Hippo 経路ががんの発症・進展に重要であることを発見し、報告してきた。これらを基盤として、今回申請者らは Hippo 経路下流哺乳類 YAP1/TAZ による細胞間コミュニケーションの分子機構とその破綻病態の解析を試みた。

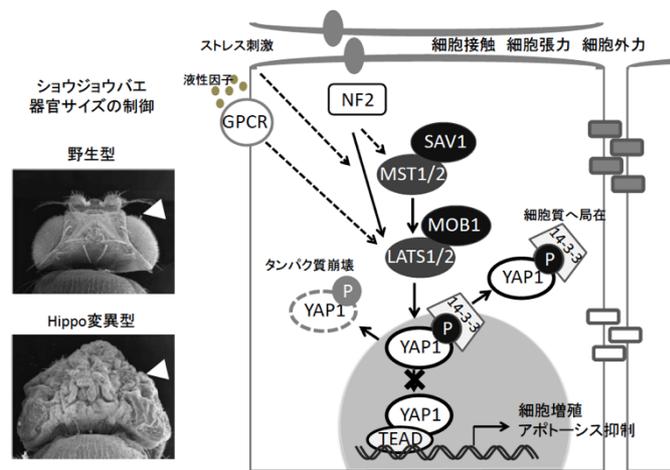


図1 哺乳類Hippo経路図

2. 研究の目的

本研究では、(1)YAP1/TAZ による細胞間競合現象とその生理的役割解析、(2)ライブラリースクリーニングによる YAP1/TAZ を活性化する細胞間競合関連分子の同定、(3)YAP1/TAZ 下流で細胞間競合を引き起こす最終標的の同定することで哺乳類 YAP1/TAZ による細胞間コミュニケーション制御機構とその破綻病態を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) YAP1/TAZ による *in vitro* 細胞間競合可視化モデルの作製・解析
- (2) YAP1/TAZ による *in vivo* 細胞間競合可視化モデルの作製・解析
- (3) マイクロアレイによる YAP1/TAZ 下流で細胞間競合を引き起こす標的の同定

4. 研究成果

ドキシサイクリン(DOX)添加によって 活性化型 YAP1(5SA)が誘導発現できるマウスケラチノサイト細胞株(PAM)、マウス線維芽細胞株(NIH3T3)やイヌ腎臓細胞株(MDCK)を樹立し、野生型

細胞と活性化型 YAP1 発現細胞を共培養して、単独培養の時と比較することによって、細胞間競合現象の解析を試みた。通常二次元培養下では、いずれの細胞株も活性化型 YAP1 発現細胞が野生型細胞に対して敗者となった。PAM 細胞では活性化型 YAP1 発現細胞は dish への接着能力が低下しており、野生型細胞の潜り込みをうけて上方に突出した。一方、野生型細胞は扁平で、dish 底により強く接着して接着による増殖シグナルが高く、勝者となった。実際、低接着 dish 培養下では、野生型細胞は足場（接着性）依存性の増殖シグナルが減弱し敗者となり、活性化型 YAP1 発現細胞は足場非依存性の強い増殖を示して勝者となった。これらのことから、野生型細胞の足場（接着性）依存性の増殖能力と活性化型 YAP1 による足場非依存性増殖能力のバランスで、哺乳動物細胞における「細胞競合」現象が変化することが考えられた。

そこで、マイクロアレイを用いて、活性化型 YAP1 発現細胞と野生型細胞を比較したところ、活性化型 YAP1 発現細胞ではいくつかの接着関連分子が低下していた。実際に、通常二次元培養下で細胞外マトリックスの一つであるフィブロネクチンを添加すると活性化型 YAP1 発現細胞の足場（接着性）依存性の増殖シグナルの増強と増殖の回復がみられた。

これらのことから、野生型細胞の足場（接着性）依存性の増殖能力と活性化型 YAP1 による足場非依存性増殖能力のバランスで、哺乳類細胞における「細胞競合」現象が変化することを見出した(図 2)。

in vivo では、野生型マウスあるいは皮膚特異的に内在性 YAP1 を活性化したマウスに野生型皮膚片あるいは YAP1 活性化皮膚片を移植したところ、野生型マウスに野生型皮膚片を移植しても、内在性 YAP1 を活性化したマウス YAP1 活性化皮膚片を移植しても皮膚の拒絶は見られず、野生型マウスに YAP1 活性化皮膚

片を移植した時のみ皮膚の縮小と剥離が観察された。

YAP1 活性化皮膚上皮では周囲を取り巻く野生型皮膚上皮に比べ、17 型コラーゲンの発現が減弱しており、これによる周囲からの力変化がその一因である可能性を見出した。

本研究によって、YAP を介した哺乳類細胞における「細胞競合」現象の一端を明らかにした。

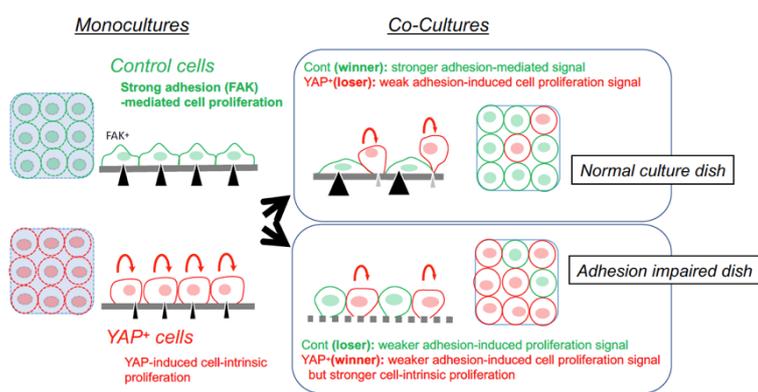


図2 YAP1を介した細胞競合様現象

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

①Nishio M, Miyachi Y, Otani J, Tane S, Omori H, Ueda F, Togashi H, Sasaki T, Mak TW, Nakao K, Fujita Y, Nishina H, Maehama T, Suzuki A.

Hippo pathway controls cell adhesion and context-dependent cell competition to influence skin engraftment efficiency.

FASEB J. (査読有) 2019 Jan 14:fj201802005R. doi: 10.1096/fj.201802005R.

②Nishio M, Maehama T, Goto H, Nakatani K, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A.

Hippo vs. Crab: tissue-specific functions of the mammalian Hippo pathway.

Genes Cells. (査読有) 2017 Jan;22(1):6-31. doi: 10.1111/gtc.12461.

③Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, Mimori K, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, Suzuki A.

MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation.

Oncogene (査読有) 2017 Jul 20;36(29):4201-4211. doi: 10.1038/onc.2017.58.

〔学会発表〕（計 29 件）

①西尾美希、Hippo 経路とその破綻病態
第 41 回日本分子生物学会年会ワークショップ（MBSJ2018）、2018 年

②西尾美希、Hippo シグナル経路による細胞増殖変化と細胞間コミュニケーション
新学術領域「幹細胞老化と疾患」「細胞競合」総括班主催「若手の会」、2018 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：新規化合物及びその製造方法、並びにその新規化合物を含有する医薬組成物

発明者：鈴木 聡、西尾美希、後藤裕樹

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所、一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム

番号：特許第2016-107726号 _

出願年：平成28(2016)年5月30日 _

国内外の別：国内

名称：癌モデル非ヒト哺乳動物

発明者：大森裕文、西尾美希、鈴木聡

権利者：神戸大学

番号：特願第2018-130573号

出願年：平成30(2018)年7月10日 _

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：宮地 洋祐

ローマ字氏名：MIYACHI, Yosuke

研究協力者氏名：大谷 淳二

ローマ字氏名：OTANI, Junji

研究協力者氏名：田根 正志

ローマ字氏名：TANE, Shoji

研究協力者氏名：大森 裕文

ローマ字氏名：OMORI, Hirofumi

研究協力者氏名：上田 史仁

ローマ字氏名：UEDA, Fumihito

研究協力者氏名：前濱 朝彦

ローマ字氏名：MAEHAMA, Tomohiko

研究協力者氏名：鈴木 聡

ローマ字氏名：SUZUKI, Akira

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。