

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 18 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04043

研究課題名(和文) YAPによる臓器全体の物理特性制御の分子機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of YAP control of whole organ mechanical property

研究代表者

清木 誠 (SEIKI, Makoto)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50226619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：3次元臓器形成のメカニズムの存在は想定されていなかった。私たちは、転写共役因子YAPの細胞力学制御により、重力に抗した3次元臓器が構築されることを初めて見出した。そのメカニズムとして、細胞と細胞外基質間の双方向性の力学制御により細胞の増殖分化が制御されるメカノホメオスタシスにYAPが必要であることを示した。本研究では、YAPメカノホメオスタシスの分子ネットワークをBioID解析により明らかにした。3次元臓器の形成には、臓器の細胞の中でも間葉幹細胞でYAPが必要であること、の解析により見出したCSPG4の過剰発現により、組織の繊維化と細胞増殖の異常を起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞や組織レベルでの力学制御の解析は行われてきたが、臓器レベルでの力学制御については不明な点が多かった。特に、細胞と細胞外基質間の双方向性の力学制御を司る遺伝子は知られていなかった。本研究により明らかにしたYAPによるメカノホメオスタシス制御の分子機構の解明は、iPS/ES細胞から、より生体機能に近く、かつ治療に使える大きな3次元臓器を作るのに役立つ知見である。また、間葉系細胞でのYAPの働きの異常により、臓器が硬化する肝硬変などの繊維化疾患やがん発症につながる分子メカニズムの同定は、これらの難治性疾患の治療薬の開発に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Organs are three-dimensional (3D) but the presence of its underlying mechanism was not expected. We identified for the first time the mechanism by which YAP, a transcription co-activator, is essential for generating 3D organs withstanding gravity. We thus proposed that YAP is essential for the mechano-homeostasis in which bidirectional force mediated control between cell and its extracellular matrix (ECM) mediates cell proliferation and differentiation. In this study, we first uncovered the molecular network of YAP mediated mechano-homeostasis by the BioID approach. We also revealed that YAP is required in mesenchymal stem cells for generating 3D organs. Finally, we showed the potential mechanism causing tissue fibrosis and cell proliferation abnormalities by overexpression of CSPG4 identified by the BioID approach.

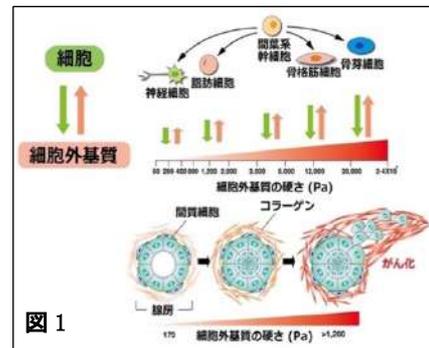
研究分野：発生遺伝学

キーワード：YAP メカノホメオスタシス 臓器 力学制御 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

(1)メカノホメオスタシス: 双方向性力学的制御による組織恒常性の維持

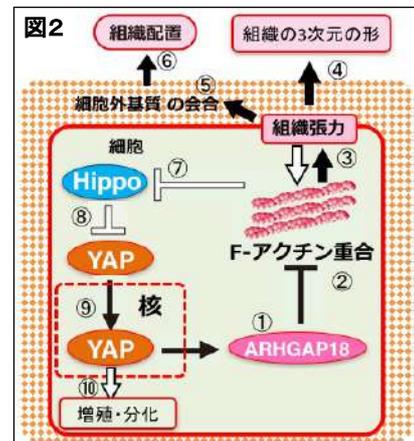
組織の中で細胞は絶えず物理的な力を受けている。組織の物理的特性の維持は、双方向の制御、すなわち細胞外基質 (ECM: Extra Cellular Matrix) の硬さが細胞の分化・増殖を規定し、逆に細胞は自分自身や細胞外基質の硬さを調整することにより行われる(図1上図 上下矢印)。各々の種類の細胞分化には適切な ECM の硬さがあり、より硬い ECM では正常細胞ですえがん化し、がん細胞も適切な硬さの ECM では正常化する (図1下図)。



すなわち、細胞の増殖・分化は、細胞と ECM 間の物理特性の相互制御により維持され、がん化を防いでいる (メカノホメオスタシス)。しかし、メカノホメオスタシスを司るマスター分子の存在は想定されていなかった。

(2)メカノホメオスタシスのマスター遺伝子 YAP の発見

私たちは、メダカを用いた網羅的変異体スクリーニングにより、重力に抗した体の形作りができない *hirame* (*hir*) 変異体を同定した(文献 1)。この変異体の原因遺伝子である転写共役因子 YAP は、重力に抗した 3 次元臓器形成に必須であることを報告した(文献 2)。



その分子メカニズムとして、YAP は、①標的遺伝子 ARHGAP18 を介した②アクチンの重合抑制により、③細胞の張力を介して、④組織の三次元形態を制御すると共に、⑤ECM の会合・硬さを調整し、⑥組織の配置を統御して 3 次元臓器を構築する (図 2 黒矢印)。これまで

YAP は、⑦臓器の大きさを制御する⑧Hippo シグナルの最下流因子として⑨細胞質から核に移行し、⑩細胞の増殖・分化を調整する標的遺伝子の転写を活性化する転写共役因子と考えられてきた(図 2 白抜き矢印; 文献 3)。従って YAP は、細胞や ECM の力学制御をすると共に ECM の硬さに従って活性化される、すなわち YAP は、細胞と ECM 間の双方向性の力学調節を介した細胞の増殖・分化制御をすることからメカノホメオスタシス制御因子と考えられた。

2. 研究の目的

YAP の活性化 (核移行) は、正常臓器を拡大し臓器の再生を促進する反面、ネガティブフィードバックが効かない持続的活性化変異 YAP を持つマウスはがんを発症する。実際に、ヒトのさまざまな臓器のがんの 60% で異常な YAP の活性化が起こっている。そこで YAP 機能を標的にした再生医療・がん治療の基盤研究として、YAP の組織メカニクスの制御が、ネガティブフィードバックとして細胞の増殖・分化を制御する分子メカニズムを明らかにするために、以下の解析を行った。

- (1) メカノホメオスタシスを支える分子ネットワークの同定
- (2) メカノホメオスタシスに関わる ARHGAP18 以外の YAP 標的遺伝子の同定
- (3) 臓器全体における力学制御細胞の同定

(4) 臓器繊維化・がん発症過程での YAP 活性化メカニズムの解析

3. 研究の方法

(1) メカノホメオスタシスを支える分子ネットワークの同定

既知の YAP メカノホメオスタシスの蛋白をビオチンリガーゼ蛋白で標識し(図 3 下: 黒星印)、蛋白の距離に応じて蛋白複合体の蛋白をビオチン化した。それらを精製し質量分析を行い、標識蛋白複合体の近傍にある蛋白を同定した。

(2) メカノホメオスタシスに関わる ARHGAP18 以外の YAP 標的遺伝子の同定

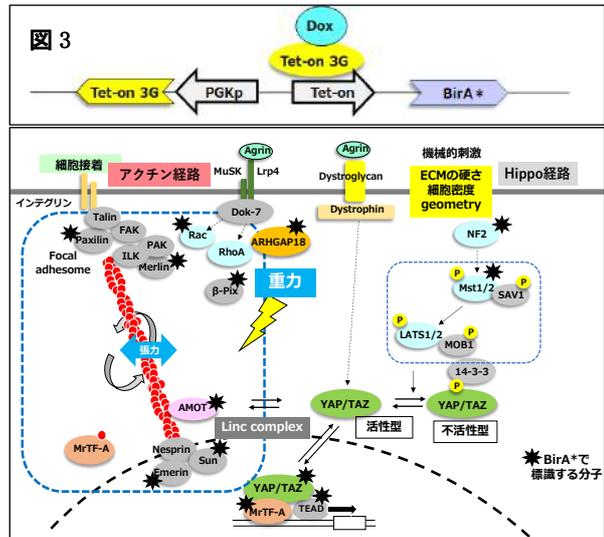
RNA sequencing 解析、クロマチン免疫沈降法(ChiP)解析を用いた。

(3) 臓器全体における力学制御細胞の同定

siRNA を用いて YAP をノックダウンした細胞を用いて 3 次元オルガノイド(後述)を作成し解析した。

(4) 臓器繊維化・がん発症過程での YAP 活性化メカニズムの解析

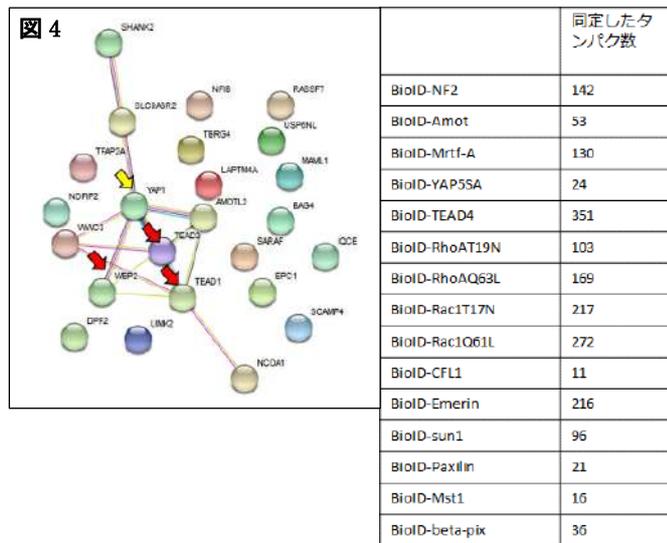
BioID 法で同定した蛋白が実際に結合しているかどうかを確認するために、タグ付きタンパク質を用いたタンパク質相互作用解析 (pull-down) 解析を行った。



4. 研究成果

(1) メカノホメオスタシスを支える分子ネットワークの同定

YAP メカノホメオスタシスを介した再生・病態の理解にはその分子ネットワークの同定が必須である。BioID 法は、標識した蛋白が作る複合体の蛋白を効率よく同定できる。そこで、piggybac tet-on システムによるビオチン化タグ誘導システムを構築し(図 3 上)、既知の YAP-メカノホメオスタシス分子ネットワークの 14 分子を組み込んだ(図 3 下)。これを RPE-1 ヒト網膜上皮細胞株で発現させ、標識蛋白の近傍に存在する蛋白を質量分析法で解析し、多数の



タンパク質を同定することができた(図 4 右)。例えば、既知の YAP (図 4 左: 黄色矢印) 相互作用蛋白、TEAD、WBP2、MAML1 が同定できたことから(赤矢印) 解析の有効性が示唆された。同定した半分以上が未知の蛋白であり、現在、その解析を進めている。本研究の当初の目的であった ARHGAP18 の BioID 解析の結果が近々得られる予定であり、ARHGAP18 のネガティブフィードバック機構に関する新しい知見が期待できる。

(2)組織メカニクス制御に関わる ARHGAP18 以外の YAP 標的遺伝子の同定

組織のメカニクス制御を担う ARHGAP18 以外の YAP 標的遺伝子を見出すために、上皮細胞株を用いて 2 次元培養と 3 次元培養を行い、RNA sequencing 解析、ChIP 解析を行った。RPE1 細胞の①野生型株、②YAP ノックダウン、③YAP ノックアウト、④YAP が活性化した Hippo 経路分子(NF2)欠損株の 3D スフェロイドを作製した。対照実験として、通常のプラスチックプレートを使用した 2 次元培養でも同様な実験を行った。

RNA sequencing データの Gene Set Enrichment Analysis (GSEA 解析) 及び Gene ontology Analysis (GO 解析) を行った。YAP ノックダウンで遺伝子発現が変動する Gene Set として、がん、細胞周期、細胞分裂関連したものが、2 次元培養 (図 5 左) と 3 次元培養 (図 5 右) に共通して認められた。

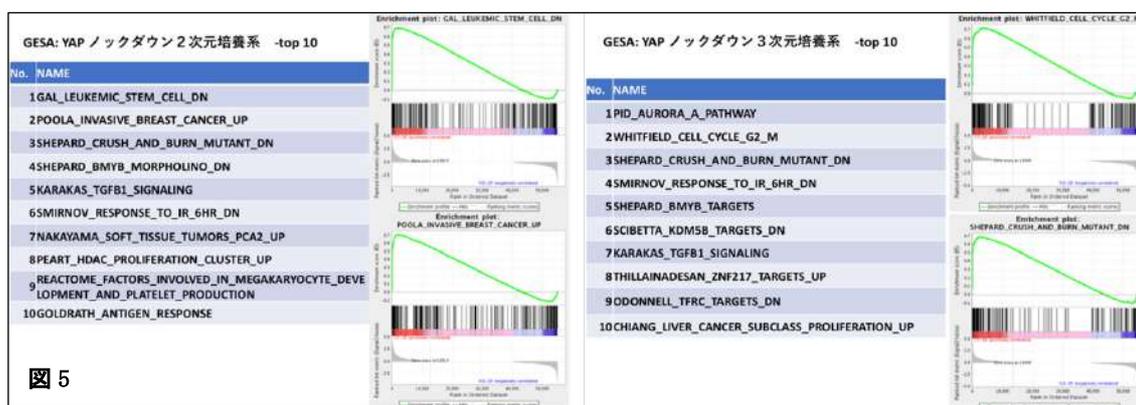


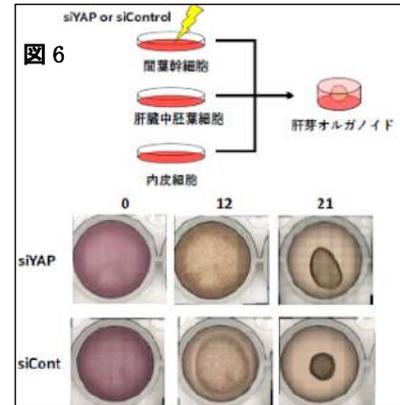
図 5

組織の力学制御の観点から、3 次元培養で特異的に発現が変動する遺伝子を絞り込み、Gene ontology Analysis (GO 解析) を行った。その結果、細胞外マトリクス、情報伝達系、そして代謝に関わる遺伝子群が 3 次元培養で特異的に遺伝子発現が変動することが判明した。細胞外マトリクスに関わる 46 遺伝子には、collagen type XII alpha 1 chain や secreted protein acidic and cysteine rich (osteonectin)等、が含まれた。代謝に関わる 30 遺伝子には、farnesyl diphosphate synthase や hexokinase 2 など、コレステロール合成や脂肪酸代謝および解糖系の酵素などが含まれていた。これは、細胞の代謝状態が YAP の活性化に影響することや、逆に YAP が代謝調節酵素の遺伝子発現を誘導する最近の報告と一致する。現在、ARHGAP18 以外のメカノホメオスターシス制御因子を同定するため、RNA sequencing のデータ解析と 3D スフェロイドでのノックダウン解析を進めている。

(3) 臓器全体における力学制御細胞の同定

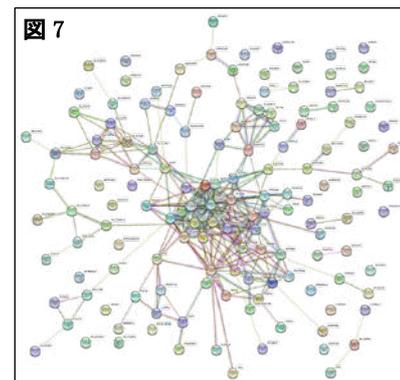
私たちは YAP が 3 次元臓器構築に必須であることを報告したが(文献 2)、臓器のどの細胞で必要か不明であった。これを明らかにする目的で、肝内胚葉細胞、内皮細胞および間葉系幹細胞 (MSC) を混合し 2 次元培養すると、24 時間で 3 次元化した肝臓臓器原基 (Liver-bud) ができる系を用いた (文献 4)。YAP をノックダウンした MSC を使用して、Liver-bud を作成したところ、siControl MSC と比べ siYAP MSC では収縮力が低下し、Liver-bud の 3 次元化が抑制され、臓器の 3 次元化には間葉系細胞で YAP が必要であることが示唆された(図 6)。

続いて、間葉系細胞のかわりに、肝星細胞株 LI90 を用いて Liver-bud を作成した。1 つの Liver-bud の代わりに、小さな細胞塊が複数個出来上がる大変興味深い結果が得られた。そこで、MSC と LI90 の様々な比率で混合し、Liver-bud を作成したところ、LI90 の比率が上がるにつれて細胞塊が増加したことから、肝星細胞は MSC に比べより強く収縮する可能性が高いと考えられた。現在、以上を証明するために MSC の力学特性の測定を進めている。

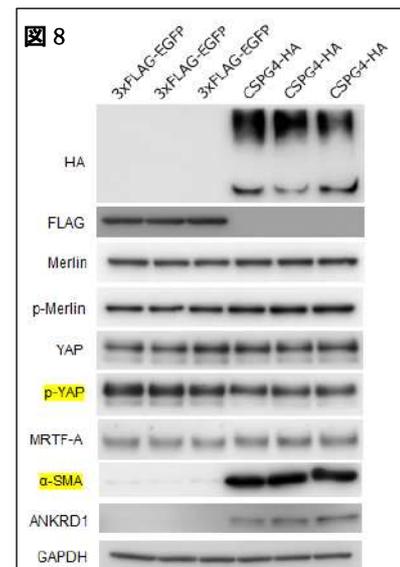


(4) 臓器繊維化・がん発症過程での YAP 活性化メカニズムの解析

Hippo シグナル経路の Merlin の BioID 解析から同定された多数の相互作用候補分子の中で(図 7)、創薬の標的となりやすい細胞外因子である CSPG4 に着目し、組織の繊維化、細胞増殖への役割を解析した。



まず、CSPG4 の RPE1 細胞での強制発現は、収縮力が強く繊維化を促進する間葉細胞の筋原繊維化に働く α -SMA の発現を転写レベル誘導し、YAP の脱リン酸化を起こし YAP の活性化を起こすことを見出した (図 8)。



更に、Merlin の pull-down 解析から、Merlin は、CSPG4、Integrin β 1 と結合することを確認した。以上から、CSPG4 の過剰発現により、臓器の繊維化を引き起こす可能性が示された。現在、肝硬変を伴った肝臓がんの CSPG4 の組織染色を行っている。

以上の結果と進行中の解析結果をまとめて、本年 9 月までに投稿予定である。

引用文献

1. Furutani-Seiki et al., A Systematic Genome-Wide Screen for Mutations Affecting Organogenesis in Medaka, *Oryzias Latipes*. *Mech Dev*.121:647-58. 2004
2. Porazinski& Furutani-Seiki YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* 521: 217-221, 2015
3. Dupont et al., Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474: 179-183. 2011
4. Takebe et al., Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature Protocols* 9: 396-409. 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asaoka Yoichi, Morita Hitoshi, Furumoto Hiroko, Heisenberg Carl-Philipp, Furutani-Seiki Makoto	4. 巻 1893
2. 論文標題 Studying YAP-Mediated 3D Morphogenesis Using Fish Embryos and Human Spheroids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 167 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8910-2_14	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shinagawa-Kobayashi Y, Kamimura K, Goto R, Ogawa K, Inoue R, Yokoo T, Sakai N, Nagoya T, Sakamaki A, Abe S, Sugitani S, Yanagi M, Fujisawa K, Nozawa Y, Koyama N, Nishina H, Furutani-Seiki M, Sakaida I, Terai S.	4. 巻 496
2. 論文標題 Effect of histidine on sorafenib-induced vascular damage: Analysis using novel medaka fish model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 556-561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.01.057.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asaoka Y, Furutani-Seiki M	4. 巻 49
2. 論文標題 YAP mediated mechano-homeostasis - conditioning 3D animal body shape.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Opin Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 64-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceb.2017.11.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 浅岡 洋一, 古谷-清木 誠	4. 巻 30
2. 論文標題 再生医療-重力に抗した複雑な立体臓器の構築機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 季刊 腎と骨代謝	6. 最初と最後の頁 227-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅岡 洋一, 荻野 英賢, 白井 睦訓
2. 発表標題 宇宙環境における宿主-病原体の相互作用の解析に向けた感染モデルの構築
3. 学会等名 第70回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masayuki Tokunaga, Yoichi Asaoka, Carl-Philipp Heisenberg, Hiroshi Nishina, Makoto Furutani-Seiki et al.
2. 発表標題 YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body/organ shape
3. 学会等名 The Hippo pathway across species and disciplines (EMBO workshop) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浅岡 洋一 (ASAOKA Yoichi) (10436644)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	北川 孝雄 (KITAGAWA Takao) (20614928)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (特命) (15501)	
研究分担者	古元 礼子 (FURUMOTO Hi roko) (70311818)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	