

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02438

研究課題名(和文)細胞内Hippoシグナルによる免疫システムの制御機構とその生理機能の解明

研究課題名(英文)Elucidating the regulatory mechanisms and physiological functions of immunomodulation by the Hippo intracellular signaling pathway

研究代表者

諸石 寿朗(Moroishi, Toshiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：30647722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫系は、病原体やがん細胞などの異常物質を認識して排除することにより、病気をふせく役割を担っている。しかし、細胞が免疫応答を誘導する仕組みは十分に明らかになっていない。本研究課題では、Hippo細胞内リン酸化シグナル伝達経路に着目し、本経路が免疫応答を制御する仕組みの解明とがんなどの疾患治療法開発を試みた。細胞におけるHippo経路の抑制は、インターフェロン応答を介して周囲の免疫細胞の種類と質を変化させ、これにより免疫応答を炎症の抑制から促進へと大きく変容させることが明らかとなった。本研究の遂行により、Hippo経路による免疫系の制御機構とその生物学的意義の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫系は異物から自己を守る防衛機構として働いており、その機能不全は感染症やがんなどの病態、逆に機能過剰は自己免疫疾患などにつながる。本研究により得られた成果は、細胞内のシグナル伝達経路(=信号)によって生体の免疫応答がどのように制御されるかという学術的理解を深めるだけでなく、今回解明された個々の分子機構を基盤に将来的な研究を進展させることによって、がんに対する免疫療法などの治療法開発への一助となることも期待される。

研究成果の概要(英文)：The immune system plays a pivotal role in preventing illness by recognizing and eliminating abnormal pathogens and cancer cells. However, the mechanism by which cells induce an immune response is not fully understood. In this research project, we focused on the Hippo intracellular signaling pathway to elucidate the mechanisms by which this pathway controls the immune response, aiming to develop therapeutic methods for diseases such as cancer. We found that suppression of the Hippo pathway in cells changes the characteristics of the surrounding immune cells through an interferon response, thereby significantly changing the immune response from immunosuppression to immunostimulation. Our study proposed a regulatory mechanism by which the Hippo pathway controls the immune system as well as its biological significance.

研究分野：基礎医学

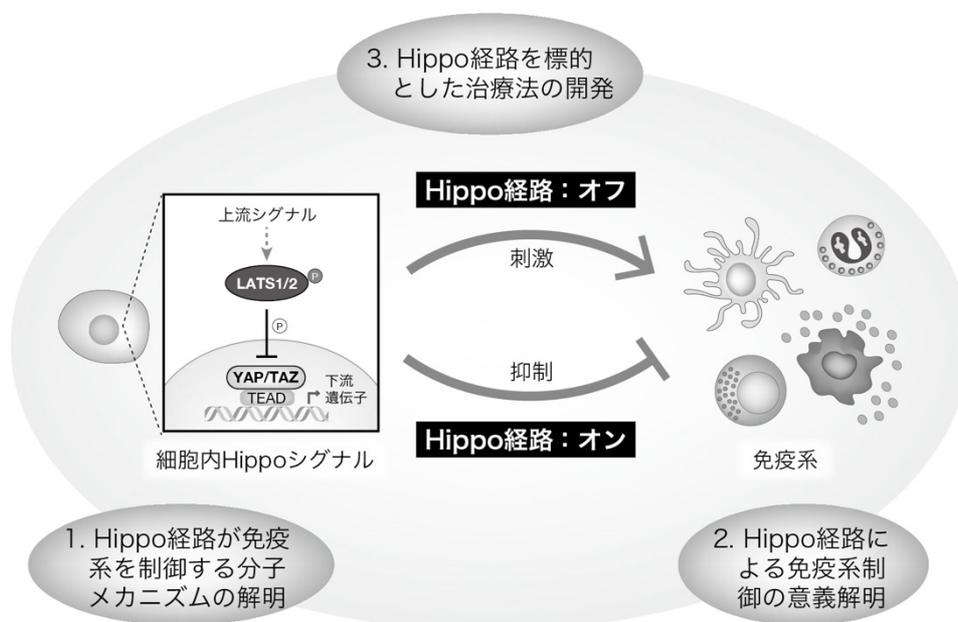
キーワード：Hippoシグナル 免疫応答 免疫原性

1. 研究開始当初の背景

生体において免疫系は、病原体などの非自己物質、および、がん細胞などの異常な自己物質を認識して排除することにより、病気をふせぐ役割を担っている。特に自己物質の排除においては、異常な細胞に対して選択的に免疫応答が惹起されるべきであり、生体自身の正常な細胞は守られなければならない。また、免疫応答によって引き起こされる炎症は病的なものばかりでなく、個体発生など正常な生理機能にも必要であることが分かっている。このように、免疫応答は「しかるべき細胞が」「しかるべき時に」誘導することによってその生理機能を最大限に発揮できるが、細胞が免疫応答を誘導する仕組み、すなわち細胞の免疫原性を制御する分子メカニズムは十分に明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の免疫原性を規定する仕組みについて細胞内 Hippo シグナルを手がかりに理解することを目的とした。われわれは過去の研究で、がん細胞内の Hippo シグナルが宿主のがんに対する免疫応答を制御することを発見した [Cell 167, 1525-39, 2016]。しかし、その詳細な分子メカニズムや生物学的意義、疾病予防・治療への応用性など、解決すべき課題多く残されていた。そこで、本研究においては、Hippo 経路が免疫応答において担う役割の解明、および、Hippo 経路を標的としたがんなどの疾患治療法開発につながる論理的基盤の創造を目標とし、以下の研究目標を設定した (下図)。



1. Hippo 経路が免疫系を制御する分子メカニズムの解明
2. Hippo 経路と免疫系の相互作用が織りなす生命現象の解明
3. Hippo 経路を標的とした治療法の開発

3. 研究の方法

(1) Hippo 経路が免疫系を制御する分子メカニズムの解明

現在までに 30 以上の構成因子が明らかになっている複雑な Hippo シグナル伝達経路であるが、Hippo 経路のおもな分子機能は「LATS1 および LATS2 キナーゼの活性化」とそれによる「転写共役因子 YAP および TAZ のリン酸化を介した抑制」である。前述のようにこれまでの研究では、がん細胞において LATS1/2 を欠損させ Hippo 経路をオフにすると、宿主の強力な免疫応答が誘導され、がん細胞が排除されることを明らかにした [Cell 167: 1525-39 (2016)]。この詳細な分子メカニズムを解明するため、主に 3 つのアプローチを試みた。1 つ目は野生型および LATS1/2 を欠損させ Hippo 経路をオフにした細胞の比較解析で、主に RNA シーケンス解析を用いて細胞のトランスクリプトの違いを比較し、これにより免疫原性の違いをもたらす細胞の状態の差異を描写した。2 つ目は CRISPR ライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニングで、LATS1/2 の欠損に加えて他の様々な遺伝子を欠損したような変異細胞ライブラリーを作出しマウスに移植し、免疫応答の誘導を回避し腫瘍を形成するような変異体をスクリーニングした。これにより、細胞の免疫原性を高めるのに必要な遺伝子を探索した。3 つ目のアプローチは LATS1/2 の分子機能に注目したものであり、野生型および LATS1/2 欠損細胞のリン酸化プロテオミクス解析により LATS1/2 の新規基質で細胞の免疫原性制御に関わる分子を探索した。

(2) Hippo 経路と免疫系の相互作用が織りなす生命現象の解明

研究開始当初は、正常な細胞における Hippo 経路の変容が免疫応答の誘導に与える影響を調べ、生理的な炎症（妊娠初期着床部における炎症反応など）や自己免疫疾患の発症メカニズムを解明することを目標としていた。この目的のため、Hippo 経路を構成する様々な分子の遺伝子改変マウスを作出していたが、新型コロナウイルス感染拡大等の影響から当初の規模で動物実験を遂行することが困難となった。そのため、まずは、腫瘍に対する免疫応答を詳しく調べることに研究の焦点を絞った。すなわち、がん細胞における Hippo 経路と免疫系の相互作用が織りなす生命現象の解明を目標とし、腫瘍微小環境でどのような免疫細胞が変化するかをフローサイトメーター解析により調べた。

(3) Hippo 経路を標的とした治療法の開発

細胞における Hippo 経路の抑制（=LATS1/2 の阻害）は免疫応答の活性化につながる。この概念に基づき、がん細胞で Hippo 経路を抑えることで宿主のがんに対する免疫応答を増強し、がん細胞を破壊する治療法の開発に取り組んだ。この目的のため、過去に開発されたキナーゼ阻害剤のデータベースをもとにデータ解析を行い、実際に LATS1/2 のキナーゼ活性を直接阻害する低分子化合物を探索した。また、YAP/TAZ の転写活性化によって luciferase を発現するレポーター細胞を作出し、この細胞を用いて YAP/TAZ の活性化を起こす薬剤をスクリーニングすることで LATS1/2 阻害剤を探索した。これらのアプローチにより得られた LATS1/2 阻害剤を用いてマウスがんモデルで治療効果を検討した。

4. 研究成果

(1) Hippo 経路が免疫系を制御する分子メカニズムの解明

RNA シーケンス解析により野生型と Hippo 経路を抑制した細胞の遺伝子発現を比較したとこ

る、Hippo 経路を抑制した細胞ではインターフェロン応答に関連する一連の遺伝子発現が上昇していることが明らかとなり、このことが宿主の免疫応答を誘導している可能性を見出した。また、リン酸化プロテオミクスや CRISPR 遺伝学的スクリーニング法を用いた解析から、Hippo シグナルが細胞内の小胞輸送を制御する可能性を見出した。これにより、細胞が放出する微小な粒子、すなわち細胞外小胞を介した機構により免疫細胞にがん細胞由来の核酸が伝搬され、インターフェロン応答を介した機構により免疫応答が誘導されるメカニズムが示唆された。

(2) Hippo 経路と免疫系の相互作用が織りなす生命現象の解明

野生型と Hippo 経路を抑制した腫瘍の腫瘍微小環境に存在する免疫細胞をフローサイトメーター解析にて比較したところ、がん細胞における Hippo 経路の抑制は、樹状細胞や細胞傷害性 T 細胞の増加、および、マクロファージの M2（免疫抑制性）から M1（免疫刺激性）への性質変化など、周囲に存在する免疫細胞を大きく変化させることがわかった。また、MDSC（骨髄由来免疫抑制細胞）の割合は逆に低下し、CAF（がん関連線維芽細胞）の種類も変化していた。これらの結果から、細胞における Hippo シグナルの抑制は、周囲に存在する免疫細胞の種類を免疫刺激性の細胞に変化させ、免疫応答を炎症抑制から炎症促進へと大きく変容させることが明らかとなった。

(3) Hippo 経路を標的とした治療法の開発

レポーター細胞を用いて、化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、Hippo 経路を阻害して YAP/TAZ の転写活性を増強する薬剤を同定した。その後の生化学的な解析により、LATS1/2 キナーゼの阻害剤を選定し、最も効果の強かった化合物を用いて、マウスがんモデルでの治療実験をおこなった。B16 メラノーマモデルで化合物による治療を行ったところ、治療群では無治療群に比べてがん部に浸潤している細胞傷害性 T 細胞が増加しており、その結果、腫瘍の増殖が有意に抑制された。しかし、現行の阻害剤は LATS1/2 キナーゼ以外の阻害効果もあるため、今後はより特異性・効果の高い化合物の同定を試みる必要がある。

(4) まとめ

以上の結果から、Hippo 経路が免疫系を制御するメカニズムとその生物学的意義の一端が明らかとなり、本研究で得られた知見をもとに、免疫応答を活性化または抑制する手法に関する手掛かりが得られたと考えている。今後、Hippo 経路と免疫系のクロストークを詳細な分子メカニズムを含めてさらに探究していくことで、多細胞生物における Hippo 経路の役割への理解がより進んでいくものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimoda Mayuko, Moroishi Toshiro	4. 巻 43
2. 論文標題 The Emerging Link between the Hippo Pathway and Non-coding RNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi Takayoshi, Moroishi Toshiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 398~398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8050398	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Pan Wei-Wei, Moroishi Toshiro, Koo Ja Hyun, Guan Kun-Liang	4. 巻 38
2. 論文標題 Cell type-dependent function of LATS1/2 in cancer cell growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2595~2610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0610-8	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 該当する
1. 著者名 Luo Min, Meng Zhipeng, Moroishi Toshiro, Lin Kimberly C., Shen Guobo, Mo Fei, Shao Bin, Wei Xiawei, Zhang Ping, Wei Yuquan, Guan Kun-Liang	4. 巻 22
2. 論文標題 Heat stress activates YAP/TAZ to induce the heat shock transcriptome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1447~1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-020-00602-9	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 該当する

1. 著者名 Yamauchi Takayoshi、Moroishi Toshiro	4. 巻 169
2. 論文標題 The Yin and Yang of tumour-derived extracellular vesicles in tumour immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 155 ~ 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa132	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Toshiro Moroishi
2. 発表標題 The Hippo pathway in cancer and immunity
3. 学会等名 TFC International Symposium: Cancer Etiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 諸石寿朗
2. 発表標題 細胞外小胞による免疫応答の制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Moroishi, T.
2. 発表標題 Targeting the Hippo intracellular signaling pathway for cancer immunotherapy
3. 学会等名 THE 45th NAITO CONFERENCE: Immunological and Molecular Bases for Cancer Immunotherapy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 諸石寿朗
2. 発表標題 Hippo経路と細胞外小胞によるがん免疫の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 諸石寿朗
2. 発表標題 Regulation of anti-tumor immunity by extracellular vesicles and the Hippo pathway
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 諸石寿朗
2. 発表標題 がん細胞内のシグナルと細胞外小胞による腫瘍微小環境の制御
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学 大学院生命科学研究部 シグナル・代謝医学講座
<https://www.moroishi-lab.com>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California, San Diego			