

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370072

研究課題名（和文）哺乳類 Hippo 経路によるインテグリン依存性細胞増殖と機能の制御

研究課題名（英文）Integrin dependent cellular growth and functions through the mammalian hippo pathway

研究代表者

木梨 達雄（KINASHI TATSUO）

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：30202039

研究成果の概要（和文）：哺乳類 Hippo ホモログである Mst1/Mst2 は Rap1 エフェクター分子 RAPL と会合しリンパ球インテグリン LFA-1 を介する接着や移動する。さらに RAPL は G1 サイクリン阻害分子である p27Kip1 を介して細胞周期を負に調節していることがわかった。また、組織イメージングの解析から Mst1 は胸腺細胞の移動や選択に必要であることが判明した。これらの過程が障害されるとリンパ増殖性病態や自己免疫様病態を呈することが分かった。

研究成果の概要（英文）：Mst1/Mst2, Mammalian homolog of Hippo associates with Rap1 effector RAPL and regulates lymphocyte adhesion and migration through leukocyte integrin LFA-1. Furthermore, RAPL negatively regulate cell cycle through G1 cyclin inhibitor p27Kip1. In addition, tissue imaging analysis has revealed that Mst1 is required for efficient thymocyte trafficking and selection. Consequently, deficiencies of RAPL and Mst1 lead to lymphoproliferative and autoimmune-like disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Mst1, Mst2, インテグリン、Outside-in シグナル、Rap1

1. 研究開始当初の背景

細胞接着は個体発生、器官形成、創傷治癒、生体防御など、多細胞生物の成り立ちに必須な機能である。インテグリンは細胞外マトリックスや他の細胞への接着に介在することによってこれらの過程を調節する重要な役割を担っている。インテグリンは単に細胞接着分子として機能するのではなく、細胞内シグナルによる接着性調節（inside-out シグナ

ル）を受け、細胞接着の強さをダイナミックに変化させる働きと、接着によって細胞外環境の情報を感知し、細胞内へと伝える働き（outside-in シグナル）があり、これらのインテグリンを介する双方向性のシグナル伝達が、細胞形態変化や細胞移動生み出し、さらに細胞機能、増殖、生存に影響を与える。線維芽細胞など付着性の細胞は、インテグリン

ンを介する接着が増殖・生存に必要であり、増殖後、細胞間接着がおこると、接触阻害 (contact inhibition) によって増殖が停止することが知られている。一方、血液・免疫系の細胞のように浮遊系の細胞では、サイトカイン、ケモカイン、抗原などの受容体を介して inside-out シグナルが惹起され、インテグリンの接着性が亢進し、血管内皮細胞や細胞外マトリックスに接着する。このような接着は活発な細胞移動を誘導し、炎症局所への移動を促進する。本研究課題提案は、このような接着現象を背景に、二つの異なる研究の流れが Mst1/Mst2 シグナルの同定に至ったことに基づいている。一つは哺乳類の免疫担当細胞のインテグリン調節機構の研究において、低分子量 G タンパク質 Rap1 による接着調節のシグナル伝達から、もう一つはショウジョウバエの Hippo と呼ばれる接触阻害と器官サイズの調節シグナルからである。Rap1 については、K-ras による形質転換された線維芽細胞をもとの形質に戻す作用があることが報告されたが (Kitayama, Cell 56: 77, 1989)、細胞伸展や増殖の接触阻害などの細胞接着の障害よりはむしろ、Ras のアンタゴニストとしての作用に重点が置かれた研究がなされた。申請者らは、免疫系におけるインテグリン LFA-1 の活性化に Rap1 が重要なシグナルとして機能していることを最初に見出し (Katagiri, Mol. Cell. Biol. 20:1956, 2000)、抗原受容体やケモカインによる inside-out シグナルとして機能していることを明らかにした (Katagiri, Mol. Cell. Biol. 22:1001, 2002、Shimonaka, J Cell Biol 161, 417, 2003)。また、新規 Rap1 エフェクター分子 RAPL を同定し (Katagiri, Nat. Immunol 4: 741, 2003)、RAPL 欠損マウスの解析から、これらはリンパ球や抗原提示細胞のインテグリン接着や生体内動態に不可欠であることを示した (Katagiri, Nat Immunol 5: 1045-1051, 2004、Katagiri,)。さらに RAPL の下流ターゲット分子として、Ste20-like キナーゼに属する Mst1 を同定した (Katagiri, Nat Immunol 7: 919, 2006)。Mst1 は従来、アポトーシスに関連していると報告されていたが、生体内での役割は不明であった。申請者らは、Rap1/RAPL は Mst1 に結合しキナーゼ活性と細胞内局在を調節することによって細胞極性とインテグリンの局在を調節し、リンパ球などの免疫担当細胞の

接着や生体内動態に必須であることを明らかにした (Katagiri, EMBO J 28:1319, 2009)。一方、ショウジョウバエ Hippo (Hpo) は、哺乳類 Mst1/Mst2 のホモログであり、その変異は翅や眼の原基における細胞増殖亢進とアポトーシス阻害に至る。Hippo 経路に関与する分子が同定され、哺乳類にいたるまで保存されていることがわかった。Hippo 経路は、Hipo (Mst1/2) (カッコ内哺乳類ホモログ、以下同様)、Salvador (WW45)、Mats (MOB)、Warts (Lats1/2) などのアダプター分子、タンパク質キナーゼをコアとして、転写因子 Yorkie (YAP) をリン酸化し、核内移行を阻害している。この制御が働かなくなると、Yorkie は核に移行し、細胞増殖亢進とアポトーシス阻害、器官サイズの増大に至る。Hippo の上流のシグナルとして、FERM ドメインをもった細胞骨格分子 Merlin, Expanded や Fat (protocadherin) などの細胞接着関連分子が報告されており、細胞接着による増殖・アポトーシス制御に関わることが予想されている (Zeng, Cancer Cell 13:188, 2008)。哺乳類では、Lats2, WW45 欠損マウス由来の MEF 細胞は接触阻害が障害されていることから、Hippo 経路は哺乳類においても細胞接着を介する増殖制御による器官サイズをコントロールすると考えられている (Kango-Singh, Dev Dyn 238:1627:2009)。しかし、哺乳類において Hippo 経路が生理的にどのような機能をもつか明らかにされていない。意外なことに RAPL 欠損マウスはリンホーマ、肝癌、肺癌を、また、Mst1 欠損マウスでは活性化リンパ球、ミエロイド系細胞 (好中球、単球) の増加や組織浸潤がおこる (投稿準備中)。したがって、Mst1 はインテグリン細胞接着とともに、細胞増殖を制御している可能性があり、Hippo の保存された機能がインテグリン接着を介して機能していることが予想されることから、その制御機構を免疫系、非免疫系を総合して、明らかにすることを提案するに至った。

2. 研究の目的

ショウジョウバエ Hippo 経路はがん抑制遺伝子として機能し、接触阻害による増殖抑制、アポトーシス、細胞周期制御に関与している。Hippo の哺乳類ホモログの一つである Mst1 は免疫系においてインテグリンによる接着を制御していることから、接着を介する細胞活

性化、増殖、生存に関与している可能性がある。しかし、Mst2を含め、その機能はいまだ不明である。本計画では、インテグリンを介する増殖・生存シグナル伝達におけるMst1/Mst2の役割とその分子基盤を明らかにする。そのため、Mst1、Mst2欠損マウスを用いてインテグリン接着による機能、増殖と生存について調べる。また、Mst1/2のキナーゼ基質を同定し、その機能を明らかにする。これらの結果に基づいて、Mst1/2の生理的役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) RAPL, Mst1, Mst2欠損マウス由来リンパ球を用いて抗原受容体(TCR, BCR)架橋刺激による増殖、細胞周期解析をFACS, ウェスタンブロット法にて行う。サイクリン・サイクリンキナーゼの発現と細胞内局在を共焦点顕微鏡を用いて解析する。

(2) RAPLシグナルによるp27Kip1の核内移行、S10リン酸化への効果。RAPL過剰発現、ノックダウンによるp27Kip1の発現レベル、局在を解析する。

(3) p27Kip1 S10A knock-in:RAPL KOマウスを用いて核外移行シグナル変異によるリンパ球増殖効果の是正およびin vivoにおけるリンパ増殖性病態への効果を調べる。

(4) Mst1 KOマウス、Mst2 KOマウスの表現系を明らかにし、リンパ増殖性病態の原因を明らかにする。そのため、TCRトランジェニックマウスと交配し、胸腺細胞選択過程について調べる。

(5) Mst1KOマウス胸腺において胸腺細胞の動態と活性化の解析を胸腺組織と2光子レーザー顕微鏡を用いて行う。

4. 研究成果

RAPLノックアウトマウスでは加齢とともに抗2本鎖DNA抗体などの自己抗体価が上昇し、腎臓に免疫複合体が沈着しループス腎炎を発症した。1年以内に30%の割合でリンパ節および脾臓においてBリンパ腫を発症することが明らかになった。RAPL欠損B細胞およびRAPL欠損T細胞では、CDK2活性が2~3倍も上昇していた。しかしp27kip1は分解されず、細胞質に蓄積していた。p27kip1は核においてCDK2の活性を阻害できなければ、細胞増殖を抑制することができない。抗原刺激によって正常なB細胞ではp27kip1は数分

以内に細胞質から核へと移行するのに対し、RAPL欠損B細胞では細胞質にとどまったままであった。正常なT細胞では抗原刺激後、p27kip1は核から細胞質へと移行するが、RAPL欠損T細胞ではその割合が2倍に増加していた。さらにp27kip1の核から細胞質への移行には10番目のセリン残基のリン酸化が必要であるが、RAPLはそのリン酸化を抑制することでp27kip1の核への移行を促進していることが明らかになった。p27kip1の10番目のセリン残基をアラニン残基に変換したp27kip1変異体をノックインしたRAPL欠損マウスでは自己免疫疾患やリンパ腫の発症が抑制された。

Mst1欠損マウスはT細胞のみ増殖亢進がみられ、加齢すると自己免疫様症状を呈するが、p27の異常は見られなかった。Mst1はリンパ組織に多く発現し、免疫細胞に特に発現が多いのに対して、Mst2は多くの組織で発現している。Mst2欠損マウスは発生および発育に異常は認められなかった。リンパ節、脾臓、胸腺のリンパ球数、各サブセット(naiveリンパ球、制御性T細胞、辺縁洞B細胞、など)、も正常であった。T細胞を単離し、抗原刺激による増殖やアポトーシスを調べたが、野生型と同じ程度で特に異常は見られなかった。また、T細胞をラベルし、野生型マウスに移入してリンパ球ホーミングを調べたが異常は見られなかった。Mst1/Mst2のダブルノックアウトは胎性致死であるので、Lck-Creマウスと交配し、T細胞系列でダブル欠損マウスを作製した。その結果、Mst1で見られた末梢リンパ組織(リンパ節や脾臓)でのTおよびBリンパ球数と比較してさらに減少していた。T細胞を単離しリンパ球のホーミングを調べたところ、著しい低下がみられた。Mst1欠損では加齢とともに活性化エフェクター細胞が増加するが、ダブル欠損では若齢からエフェクター細胞が増加傾向であった。Mst1の下流分子と報告されている、Mob, Foxo1, Foxo3などの発現は正常であった。in vivoでnaive T細胞の異常な活性化はMst1で見られた自己寛容の破綻である可能性がある。in vitroではMst1同様に、明らかなRAPLとSARAHドメインを介した結合がみられた。これらの結果から、Mst2は少なくともリンパ球に関してはMst1と同様な機能をもつが、必須ではないことが明らかになった。

Mst2がredundantであることからMst1欠

損マウスに絞って解析を行った。Mst1 欠損マウスでは活性化 T 細胞の増加と多臓器への浸潤、自己抗体の産生が加齢とともに顕著になることが判明した。活性化 T 細胞の増加は T 細胞特定の Mst1 欠損でおこることから T 細胞の異常であった。胸腺細胞の選択過程では、Mst1 欠損によって正の選択、負の選択過程の障害が認められた。さらに ICAM-1 欠損胸腺細胞を T 細胞欠損マウスに移入によって活性化 T 細胞の増加、肺、肝臓などへの浸潤が引き起こされたことから、Mst1 による LFA-1/ICAM-1 を介する接着制御の異常が免疫寛容破綻につながり、活性化 T 細胞必要であることが示唆された。胸腺組織では ICAM-1 は髄質内の樹状細胞 (DC)、胸腺上皮細胞 (mTEC) に発現していることから、これらの抗原提示細胞と胸腺細胞の相互作用を 2 光子顕微鏡による胸腺組織イメージングを用いて解析した。その結果、CD4+胸腺細胞の髄質内での移動、および抗原認識に Mst1 による LFA-1/ICAM-1 を介した接着が必要であることが判明した。

現在、Mst1 の下流分子について、リン酸化ターゲット候補分子の解析を進めており、今後、分子基盤を明らかにしていく。また、Mst1/Mst2 の機能として細胞動態制御のほか、細胞分化やアポトーシスにかかわる可能性がある。免疫応答における Hippo 経路の関与を今後明らかにする必要がある。

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)

- Ueda Y., Katagiri K., Tomiyama T., Yasuda K., Habiro K., Katakai T., Ikehara S., Matsumoto M, Kinashi T. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen-recognition in the thymus. *Nat. Commun.* 2012 Oct 2;3:1098. (査読有) (doi: 10.1038/ncomms2105.)
- Sekine K., Kawauchi T., Kubo K., Honda T., Herz J., Hattori M., Kinashi T., and Nakajima K. Reelin controls neuronal migration and positioning by promoting neuronal adhesion to extracellular matrix via the inside-out activation of integrin alpha5beta1, *Neuron.* 76:353-369, 2012. (査読有)
- Harada Y., Tanaka Y., Terasawa M., Pieczyk M., Habiro K., Katakai T., Hanawa-Suetsugu K., Kukimoto-Niino M., Nishizaki T., Shirouzu M., Duan X., Uruno T., Nishikimi A., Sanematsu F., Yokoyama S., Stein J.V., Kinashi T., and Fukui Y.. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood.* 119:4451-61. 2012 (査読有) (doi:10.1182/blood-2012-01-407098)
- Kinashi, T. Overview of integrin signaling in the immune system. *Methods Mol. Biol.* 757:261-78 (2012) (査読有) (doi: 10.1007/978-1-61779-166-6_17)
- Katagiri, K., Ueda, Y., Tomiyama, T., Yasuda, K., Toda, Y., Ikehara, S., Nakayama, K. I., Kinashi, T. RAPL deficiency caused lymphoproliferative disorders through the mislocalization of p27^{kip}. *Immunity.* 34 1-15. 2011 (査読有) (doi:10.1016)

[学会発表] (計 7 件)

- Kinashi T., Katakai T., Ueda Y., Kondo N.. Regulation of Lymphocyte “Stop and Go”: Analysis of Lymphocyte Trafficking using Live Imaging Techniques, 第 23 回 CDB ミーティング “Building multicellular systems from cellular cross-talk”, 2013 年 1 月 22 日 神戸
- KINASHI Tatsuo. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus. 第 41 回日本免疫学会学術集会シンポジウム 2012 年 12 月 5 日 - 7 日 神戸
- 木梨達雄、片貝智哉、植田祥啓、羽廣克嘉 関西医科大学附属生命医学研究所分子遺伝学部門 免疫細胞の組織内移動と停止の制御：イメージング手法による接着制御の解析 バイオイメージング学会 2012 年 8 月 28 日 京都国際会館
- Ueda Y., Katagiri K., Tomiyama T., Yasuda K., Habiro K., Katakai T., Ikehara S., Kinashi T. Mst1 regulates thymocyte trafficking and antigen recognition within thymic tissues. 2011 The Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Chiba Japan, Nov. 2011

5. Kinashi T., Katagiri K., Katakai T., Ueda Y., Habiro K.. Crucial roles of Mst1 and RAPL (RASSF5) in lymphocyte adhesion and proliferation. 2nd International RASSF Symposium, Oxford UK, July 2011
6. Kinashi.T. "Distinct signaling processes in regulation of lymphocyte arrest and adhesion strengthening under shear flow" The 16th International Vascular Biology Meeting Los Angeles, USA, June 20 - 24, 2010
7. Kinashi T., Katagiri K., Katakai T., Ueda Y., Habiro K., Crucial roles of Mst1 and RAPL (RASSF5b) in lymphocyte adhesion and proliferation, The second workshop on the HIPPO tumor suppressor pathway, Rome, Italy, Nov 2-5, 2010

〔図書〕 (計1件)

- 1 木梨達雄 インテグリンファミリー (LFA-1, VLA-4/ICAM-1, VCAM-1) <Series モデル動物利用マニュアル>疾患モデルの作成と利用—免疫疾患、岩倉洋一郎編、エル・アイ・シー、1:515-522, 2011

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木梨 達雄 (KINASHI TATSUO)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：30202039

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：