

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460358

研究課題名(和文) 上皮組織の立体構築過程におけるHippoシグナル伝達系の役割

研究課題名(英文) The role of Hippo signaling pathway in the construction of three-dimensional epithelial tissues

研究代表者

浅岡 洋一 (ASAOKA, Yoichi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10436644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ピペット吸引法やレーザー切断法など組織・個体レベルでの物理的張力を計測する技術を駆使し、YAPが組織張力の原動力となるアクチオシンの活性制御を司ることを突き止めた。また、単一細胞レベルでのタイムラプス解析から、YAP変異体では組織張力の異常により細胞積層が正常に進行せず、結果として神経管などの上皮組織が扁平化したと考えられた。さらに、YAPはアクチオシンの活性制御を介してフィブロネクチンの重合化を引き起こし、眼のレンズと網膜の正常な組織配置に関与することも明らかとなった。これらメダカで見出されたYAPの新機能はヒトにおいても保存されていることがヒト培養細胞の3次元培養法により示された。

研究成果の概要(英文)：Previously our group reported a unique medaka mutant, hirame (hir), which means flatfish in Japanese. Due to mutation of the yes-associated protein (YAP) transcriptional co-activator, hir embryos are sensitive to deformation by gravity and exhibit a markedly flattened body. In this study, we found that actomyosin-mediated tissue tension and fibronectin fibril formation are abnormal in hir embryos, leading to tissue flattening and tissue misalignment, both of which contribute to flattened body. YAP-knockdown human 3D spheroid also exhibits collapse upon exposure to external forces, which is reminiscent of the hir phenotype. Together, these findings reveal a novel mechanism of gravitational resistance in the 3D morphogenesis of a variety of animals including fish and humans.

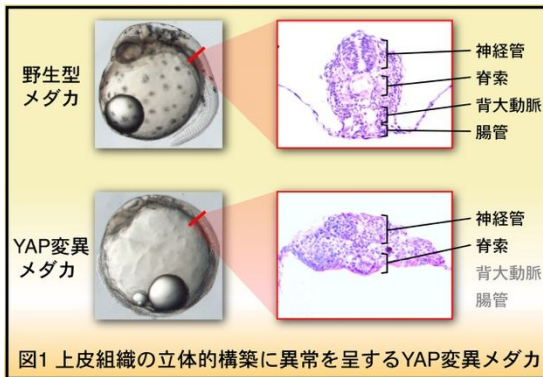
研究分野：発生生物学

キーワード：Hippoシグナル伝達系 YAP変異メダカ 細胞張力 蛍光イメージング

1. 研究開始当初の背景

上皮組織は多細胞生物を構成する器官の基盤的構造であり、その形状やサイズの適切な制御は機能的な器官の構築に極めて重要である。ここ数年の研究から、器官サイズ制御シグナルHippo 伝達系が上皮組織の構造制御と密接に関連することが明らかとなってきたが、上皮組織の3次元構築を規定する分子メカニズムの詳細は未解明な点が多い。

このような背景のもと研究代表者らは、初期胚形成不全メダカ変異体のスクリーニングの過程において、Hippo シグナル伝達系の標的分子YAP のメダカ変異体 (hirage) を同定した。hirame 変異体は初期形態形成期より胚の厚みが扁平であり、神経管や血管などの上皮組織の構築異常と維持不全という特徴的な表現型を示す (図1)。Hippo シグナル伝達系は、隣接細胞間の接触情報に基づいて細胞増殖と細胞死の双方を制御することにより、組織や器官の形状やサイズを決定する新しいシグナル経路として近年国内外より注目を浴びている (図2)。しかし hirame 変異体の特徴的な表現型は、組織を構築する個々の細胞の増殖や細胞死の観点だけからでは説明をつけることは難しい。そこで新たに細胞張力の観点から hirame 変異体の表現型を精査することにより、Hippo シグナル伝達系による上皮組織の立体構築を統御する新規機構に迫れるとの着想に至った。



2. 研究の目的

極性上皮細胞は常にたわみや湾曲など変形の中でその時々細胞間の張力変化を感知し、適切かつ巧みに細胞骨格を変化させる。こうした Hippo シグナル伝達系による細胞内張力の制御機構は、これまでに培養細胞を用いて解析が行われてきた。しかしながら、組織内部に存在する応力分布や歪み分布など3次元的情報を捉えることが難しく、生体内の個々の細胞が「いつ」「どこで」力学的な微細環境を制御し、どのように最終的

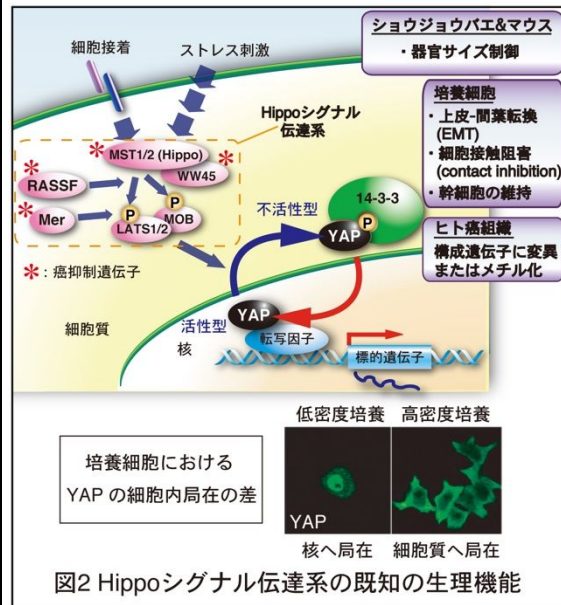


図2 Hippoシグナル伝達系の既知の生理機能

なマクロスケールの器官構築に反映させているのかについては知見が非常に乏しい。そこで本研究においては、生きたメダカ個体全体の中で、細胞張力をリアルタイムに計測し、Hippo シグナル活性化の上皮組織形成過程における役割を明らかにすることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

ピペット吸引法やレーザー切断法など組織・個体レベルでの物理的張力を計測する技術を駆使し、YAP が組織張力の制御に関与する可能性を検討した(図3)。また、単一細胞レベルでのタイムラプス解析をメダカ神経管の形成過程において実施した。さらにメダカの解析により導かれたモデルがヒトにおいても成立するかどうかを検証するため、ヒトの網膜色素上皮細胞からスフェロイドを作成し、YAP の機能解析を行なった。

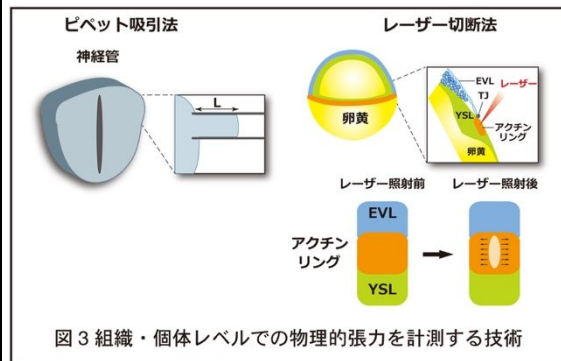
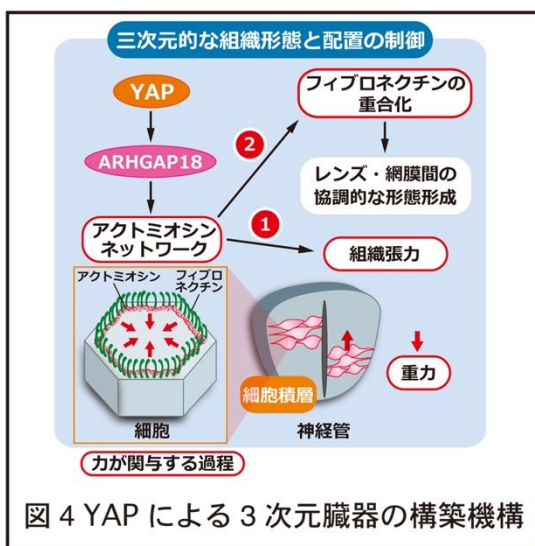


図3 組織・個体レベルでの物理的張力を計測する技術

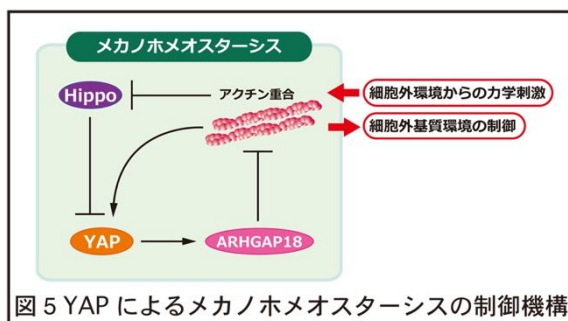
4. 研究成果

上記の方法により、YAP が組織張力の原動力となるアクトミオシンの活性制御を司ることを突き止めた。また、単一細胞レベルで

のタイムラプス解析から、hirame 変異体では組織張力の異常により細胞積層が正常に進行せず、結果として神経管などの上皮組織が扁平化したと考えられた。さらに、YAP はアクチオシンの活性制御を介してフィブロネクチンの重合化を引き起こし、眼のレンズと網膜の正常な組織配置に関与することも明らかとなった。これらメダカで見出された YAP の新機能はヒトにおいても保存されていることが、ヒト網膜色素上皮細胞から作成したスフェロイドを用いた解析により示され、YAP が RhoGTPase 活性化分子の発現を介してアクチオシン活性を制御していることが判明した (図 4)。



今回の我々の研究成果は、YAP がメカノホメオスタシス制御の一翼を担うことを強く示唆している (図 5)。細胞外環境からの力学刺激はアクチン繊維の張力を高め YAP の活性化を惹起する (力の感知)。活性化した YAP は ARHGAP18 遺伝子の発現誘導を介してアクチオシン活性を適切なレベルにまで抑制し、フィブロネクチンなどの細胞外基質環境を変化させる (力学環境への適応)。その後 YAP の活性は再び恒常状態に戻る。すなわち、こうした YAP を中心としたネガティブフィードバック機構の存在により、細胞は自ら



置かれた力学環境を常に感知し適応することが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

(1) Yusuke Nasu, Yoichi Asaoka, Misako Namae, Hiroshi Nishina, Hideaki Yoshimura and Takeaki Ozawa. Genetically Encoded Fluorescent Probe for Imaging Apoptosis in Vivo with Spontaneous GFP Complementation. Anal Chem. 88: 838-844. (2016) 査読有 DOI:10.1021/acs.analchem.5b03367

(2) 古谷-清木誠、浅岡洋一、仁科博史: 細胞張力と 3D 臓器形成; 実験医学 2015 年 11 月号 Vol.33 (No.18), 2913-2919. 査読無 <https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758101455/>

(3) 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; 細胞工学別冊「最新バイオ論文解説総集編 1 今、この論文が熱い」44-45. (2015) 査読無

<https://gakken-mesh.jp/book/detail/9784780909210.html>

(4) 浅岡洋一、古谷-清木誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科博史: GRAPHIC HOT PRESS 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 2015 年 8 月号 Vol.34 (No.8), 796-797. 査読無

<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901696.html>

(5) 浅岡洋一、古谷-清木誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科博史: 転写共役因子 YAP は脊椎動物の 3 次元的な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 新着論文レビュー 2015 年 査読無 first.lifesciencedb.jp/archives/9945

(6) Sean Porazinski#, Huijia Wang#, Yoichi Asaoka#, Martin Behrndt#, Tatsuo Miyamoto#, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabriel 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. YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. Nature. 521: 217-221. (2015)

(#Contributed equally) 査読有

DOI:10.1038/nature14215

(7) 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. Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebra fish. *Biochem Biophys Res Commun.* 457: 493-499. (2015) 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.12.105

(8) Yoichi Asaoka*, Shoji Hata, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina*. The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PLoS ONE.* 9: e97365. (2014) (*Corresponding authors) 査読有

DOI:10.1371/journal.pone.0097365

(9) Yoichi Asaoka, Shuji Terai, Isao Sakaida, and Hiroshi Nishina. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. *Dis Model Mech.* 6: 905-914. (2013) 査読有

DOI:10.1242/dmm.011981

(10) 浅岡洋一: 初期発生期における JNK シグナル伝達経路の多様な生理的役割; 比較生理生化学 2013 年 Vol.30 (No.2), 59-67. 査読有

DOI:10.3330/hikakuseiriseika.30.59

[学会発表](計 16 件)

(1) Yoichi Asaoka: Multiple Roles of Hippo-YAP Signaling Pathway in Organ Development: Lessons from Medaka and Zebrafish. [International Meeting on Aquatic Model Organisms for Human Disease and Toxicology Research 2016 年 3 月 18 日 (岡崎カンファレンスセンター, 愛知県岡崎市)]

(2) Yoichi Asaoka, Makoto Furutani-Seiki, Carl-Philipp Heisenberg and Hiroshi Nishina: YAP is essential for tissue tension to ensure proper formation of vertebrate 3D organs. [第 40 回日本比較内分泌学会・第 37 回日本比較生理生化学会 合同大会 2015 年 12 月 11-13 日 (JMS アステールプラザ, 広島県広島市)]

(3) 浅岡洋一, 白井睦訓: 宿主・病原体相互作用の解明に向けたメダカモデルの構築 [第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会 2015 年 10 月 3-4 日 (岡山大学, 岡山県岡山市)]

(4) Yoichi Asaoka, Makoto Furutani-Seiki, Carl-Philipp Heisenberg and Hiroshi Nishina: YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. [第 21 回小型魚類研究会 2015 年 9 月 19-20 日 (大阪大学, 大阪府吹田市)]

(5) 浅岡洋一: 脊椎動物の初期胚発生期における Hippo-Yap シグナル伝達系の解析 [むさしのバイオ研究会 Fish&Fly 2015 2015 年 8 月 29 日 (杏林大学, 東京都三鷹市)]

(6) 浅岡洋一, 古谷-清木誠, 仁科博史: 初期胚発生期における Hippo-YAP シグナル伝達系の機能解析 [第 14 回生命科学研究会 2015 年 6 月 26-27 日 (三浦市民ホール, 神奈川県三浦市)]

(7) 浅岡洋一, 仁科博史: 網膜光受容細胞の分化における Hippo-Yap シグナル伝達系の役割 [第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25-27 日 (パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市)]

(8) 浅岡洋一, 仁科博史: Hippo-Yap シグナル伝達系による網膜視細胞の分化制御機構 [第 7 回 RRM (レチナ・リサーチミーティング) 2014 年 11 月 22 日 (JP タワーホール&カンファレンス, 東京都千代田区)]

(9) 浅岡洋一, 仁科博史: Hippo-Yap signaling acts as a molecular switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation. [第 20 回小型魚類研究会 2014 年 9 月 20 日 (慶應義塾大学薬学部芝共立キャンパス, 東京都港区)]

(10) Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina: Hippo signaling regulates a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. [2014 ICN / JSCPB 2014 年 7 月 28 日-8 月 1 日 (札幌コンベンションセンター, 北海道札幌市)]

(11) 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, 東京都文京区)]

(12) 浅岡洋一: 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 日 (JR タワ

ーホテル日航札幌，北海道札幌市)]

(13) Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina : Analysis of the Hippo-Yap signaling pathway controlling the retinal cell differentiation. [第 19 回小型魚類研究会 2013 年 9 月 20-21 日 (仙台 AER ビル，宮城県仙台市)]

(14) 浅岡 洋一 : The Hippo signaling pathway: its diverse functions in embryonic development. [日本比較生理生化学会 比較三学会合同シンポジウム講演 2013 年 7 月 14 日 (イーグレひめじ，兵庫県姫路市)]

(15) Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina : Analysis of the Hippo signaling pathway during zebrafish ocular development. [日本比較生理生化学会第 35 回大会 2013 年 7 月 14 日 (イーグレひめじ，兵庫県姫路市)]

(16) Yoichi Asaoka, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina : Hippo signaling pathway-mediated three dimensional construction of the epithelial tubular structures. [1st International Meeting for Epithelial Tubulology 2013 年 6 月 22-23 日 (北海道大学，北海道札幌市)]

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

浅岡 洋一 (ASAOKA, Yoichi)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10436644

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

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