

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293061

研究課題名(和文) 腫瘍抑制ヒッポ・シグナルの非規範的制御機構と非癌疾病の病態における役割の解析

研究課題名(英文) Study on the tumor suppressor Hippo pathway and RASSF proteins

研究代表者

畑 裕 (Hata, Yutaka)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80313237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍抑制Hippo シグナルの標的分子YAP1、TAZは組織幹細胞の維持に必要で活性が不十分だと組織恒常性が破綻する。逆に活性が強すぎると発がんにつながる。従ってYAP1、TAZの活性化剤は組織再生に、抑制剤はがん治療に有用と考えられる。YAP1、TAZの活性を計測するアッセイ系を作り、活性化剤、阻害剤を探索した。得られた候補をがん細胞や筋芽細胞のモデル細胞に投与して、がん治療、筋萎縮治療への応用の可能性を検討した。YAP1、TAZの新しい制御機構の発見を期待して、標的分子の同定も試みている。Hippo シグナルと関係が深いRASSF6が細胞周期停止、細胞死誘導を起こす機構の詳細も解明した。

研究成果の概要(英文)：YAP1 and TAZ, targets of the tumor suppressor Hippo pathway, regulate cell proliferation and differentiation. Hyperactive YAP1 and TAZ provide cancer cells with malignant properties and shorten disease-free survival. On the other hands, YAP1 and TAZ play essential roles in tissue stem cells and their activities are crucial for tissue homeostasis. Thereby, YAP1 and TAZ inhibitors and activators are useful in cancer therapy and regenerative medicine, respectively. We established cell-based assays to search for YAP1 and TAZ inhibitors and activators, and performed the chemical compound screening. We characterized the obtained candidates, validated the assays and evaluated their therapeutic potentiality. We also studied RASSF6, a tumor suppressor that is closely related to the Hippo pathway. We revealed that RASSF6 blocks MDM2-mediated degradation of p53. Ras signaling strengthens the binding of RASSF6 to MDM2. In this way, RASSF6 functions as a tumor suppressor against oncogenic Ras.

研究分野：医化学

キーワード：シグナル伝達 腫瘍抑制

1. 研究開始当初の背景

Hippo シグナルは器官サイズを決定するシグナル伝達系として、ショジョウバエの遺伝学的解析から見出された。まず、細胞の増殖制御に異常を起こす遺伝子変異が探索され、Warts と Hippo という 2 つのキナーゼの遺伝子変異が細胞増殖異常を示し、器官の肥大を招くことが見出された。前後して、同じような表現型を示す遺伝子変異が次々と見つかった。しかも、それらがコードする遺伝子産物が相互作用することが示され、全体として一つのシグナル系を構成することが明らかとなり、Hippo の名前をとって Hippo シグナルと命名された。しかし、その後、Hippo シグナルの中核を構成するのは、Hippo そのものよりも、むしろ、Hippo によって活性化される Warts、Warts によって抑制される転写共役因子 Yorkie、Yorkie と共役する転写因子 Scal loped の 3 つであることが明らかになった。ショウジョウバエで見つかった Hippo シグナルの構成分子はヒトでも保存され、それらの変異ががんを高頻度に見いだされることから、Hippo シグナルはヒトでも増殖を制御し腫瘍抑制機構として働くと考えられる。ヒトには Warts のホモログとして LATS1 と LATS2、Yorkie に相当して YAP1 と TAZ、Scal loped に相当して 4 つの TEAD があり、複雑化している。ヒトがんでは、しばしば Hippo シグナルが機能せず、YAP1 と TAZ が活性化して TEAD 標的遺伝子の発現が高まり、悪性を招く。したがって、Hippo シグナルの機能不全をもつ悪性の高いがんで、YAP1 と TAZ を抑制すれば、がんの予後が改善すると期待される。そのため、多くの研究者、製薬企業が、YAP1、TAZ の阻害剤、特に TEAD との共役を阻害する薬剤の開発に取り組んでいる。

YAP1、TAZ を阻害することががん治療に有用と判断される一方で、YAP1、TAZ の活性は、組織幹細胞の維持に重要であり、組織の損傷修復では、むしろ YAP1、TAZ の活性を高める方が有益とも推定される。したがって、YAP1、TAZ の活性化剤にも利用価値がある。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、私たちはがん治療目的で YAP1、TAZ 阻害剤を、再生医療目的で YAP1、TAZ 活性化剤を探索することを企図した。ただし、単に応用のみをめざすのではなく、獲得された阻害剤、活性化剤の標的を同定することを通じて、まだ、十分に明らかでない YAP1、TAZ の制御系を解明したいと考えた。また、獲得された阻害剤、活性化剤を試薬として使用することにより、生理的な条件下で YAP1、TAZ が果たす役割に洞察を得ることも期待した。Hippo シグナルと同じように、ヒトがんで高頻度に機能低下を認める腫瘍抑制分子に RASSF がある。RASSF は Hippo シグナルと関係が深く、両者は協働して腫瘍抑制機能を発揮すると推定される。しかし、RASSF の腫瘍抑制機能は多彩であり、その機

構が十分に明らかでない。本研究では RASSF の解析も目的とした。

3. 研究の方法 (一般的な生化学、分子生物学、細胞生物学的方法については省略し、YAP1、TAZ 阻害剤、活性化剤の探索方法を紹介する)

YAP1、TAZ は細胞核内で TEAD などの転写因子と共役して遺伝子転写を制御するが、Hippo シグナルを介してリン酸化されると、細胞質にトラップされ、蛋白分解される。すなわち、YAP1、TAZ の細胞内局在を指標として、YAP1、TAZ の活性状態を評価できる。YAP1、TAZ は TEAD 以外の転写因子とも共役するが、クロマチン免疫沈降による網羅的解析から、7 割以上が TEAD 応答性遺伝子の近傍に位置することが示され、上皮細胞では TEAD との共役が主体とされる。そこで、TEAD 応答プロモーターの下にルシフェラーゼや蛍光蛋白を発現させるレポーターを使って、YAP1、TAZ の活性を測定することもできる。私たちは、ヒト骨肉腫 U2OS 細胞にオワンクラゲの緑色蛍光蛋白を融合させた YAP1、TAZ を発現させ、細胞内局在を観察するアセイ系 (アセイ系、) と、TEAD 応答プロモーターの下に赤色蛍光蛋白を融合したヒストンを発現するレポーターを、YAP1 と共にヒト網膜色素上皮 ARPE-19 細胞に、TAZ と共にヒト肺がん A549 細胞に導入し、蛍光蛋白の発現を観察するアセイ系 (アセイ系、) を構築した。加えて、ヒト乳腺上皮 MCF10A 細胞において TAZ の活性を高めると、非接着浮遊状態でも生存可能となり、乳腺組織幹細胞と同じようなスフェアと呼ばれる細胞集団を作れるようになることに着目し、スフェア形成を指標として TAZ 活性化剤を探索するアセイ系 (アセイ系、) を作った。以上 5 種類のアセイ系を使い、東京医科歯科大学が所有する 18,000 個あまりの低分子化合物を対象にスクリーニングを行い、YAP1、TAZ 阻害剤、活性化剤の候補を集めた。

4. 研究成果

(1) YAP1 活性化剤の探索と応用

ARPE19 レポーター系 (アセイ系、) から得られた YAP1 活性化剤のうち、著明に細胞核内の脱リン酸化 YAP1 を増加させる化合物を解析し、本アセイ系の有効性を確認した。YAP1 は一般には腫瘍を起こす分子と見なされるが、いくつかのがんでは細胞死を誘導し腫瘍抑制的に働く。TEAD の発現が低い血球系細胞でこの傾向が強い。正常の血球系細胞では、DNA 傷害ストレスに曝露されると ABL が活性化し細胞核に移行して YAP1 をチロシンリン酸化し p73 との共役を強め細胞死を起こす。ところが多発性骨髄腫細胞では細胞核内の YAP1 の量が少ないため、DNA 傷害を起こす抗がん剤に抵抗性を示す。細胞核内の YAP1 を増やす YAP1 活性化剤は多発性骨髄腫治療に有用と推論される。獲得された YAP1 活性化

剤を用いて、この考えを検証し、期待する結果を得た。

(2)TAZ 活性化剤の探索と解析

A549 レポーター系(アセイ系)を使って TAZ 活性化剤を探索し消毒薬 ethacridine が TAZ の脱リン酸化を起こすことを見出した。興味深いことに、上記(1)で得られた YAP1 活性化剤と ethacridine は構造が類似している。どちらも YAP1、TAZ の双方に働き、同じような効果を出すので、標的分子が同一と推定される。その同定を行っている。

(3)TAZ 阻害剤の探索と解析

U2OS における TAZ の細胞内局在を指標とするアセイ系(アセイ系)から、TAZ を細胞質に集める阻害剤を獲得した。そのうちのいくつかは、Hippo シグナルを介して TAZ のリン酸化を起こしていることが確認され、本アセイ系の有効性が保証された。しかし、Hippo シグナルとは別の作用機序で TAZ の細胞内局在を制御すると思われる化合物も獲得された。現在、その標的を解析している。

(4)TAZ 活性化による筋萎縮治療薬の開発

乳腺上皮細胞のスフェア形成を指標とするアセイ系(アセイ系)から得られた TAZ 活性化剤の中から、さらに、マウス筋芽 C2C12 細胞の筋分化を促進する化合物を選抜した。得られた化合物は、マウスの骨格筋損傷時の修復を促進し、ステロイドなどによる筋萎縮を抑える効果を発揮した。この化合物をもとに誘導体を展開し、筋萎縮治療薬の開発を試みている。

(5)筋分化を促進する化合物の探索系の開発

C2C12 細胞はマウスから確立された筋芽細胞のモデルで適切な条件に置くと、筋分化を始め、細胞融合し多核の筋管細胞になる。上記(4)の成果が示すように、C2C12 細胞の筋分化を促進する化合物は、動物実験でも筋萎縮を抑制するので、C2C12 細胞の筋分化に対する促進効果を指標として筋萎縮治療薬の探索が行えると推論される。しかし、C2C12 細胞の筋分化を定量的に評価するのは容易でない。オワンクラゲの緑色蛍光蛋白には 11 個のストランドがある。N 末端の 10 個と C 末端の 1 個に分割すると、それぞれは蛍光を発しない。しかし、両者が会合すると蛍光が復活する。N 末端の 10 個と C 末端の 1 個をそれぞれ発現する C2C12 細胞を作り、両者を混合培養した。すると、筋分化が起こるにつれ、細胞が融合し、N 末端と C 末端が会合して蛍光が生じた。この系では、蛍光強度が筋分化と相関するので、容易に定量的な評価が行える。この系は、企業の関心を引き、製品化に向けてライセンス契約を結んだ。

(6)腫瘍抑制分子 RASSF6 と MDM2 の関係

ヒト肺がんではしばしば相同染色体の片側の欠損を認める領域に RASSF1A という遺伝子がある。RASSF1A には Ras 結合ドメインの他、Hippo シグナルのキナーゼ Hippo の哺乳動物ホモログ MST と結合する SARAH ドメインという配列がある。同様に Ras 結合ドメインと

SARAH ドメインをもつ蛋白がヒトには RASSF1 から RASSF6 まで 6 個ある。いずれも腫瘍抑制分子として機能する。私たちは主に RASSF6 を解析対象としている。RASSF6 には強い細胞死誘導能がある。しかし、RASSF6 の細胞死誘導の分子機構は十分に明らかでなかった。本研究では、RASSF6 が p53 の分解を担う E3 リガーゼ MDM2 に結合して、MDM2 による p53 の分解を抑制し、p53 依存的に細胞死を起こすことを明らかにした。さらに、RASSF6 の Ras 結合ドメインが MDM2 の E3 リガーゼ・ドメインに結合し、p53 の安定化に強く寄与するが、定常状態では、SARAH ドメインが Ras 結合ドメインに結合して、Ras 結合ドメインの MDM2 の E3 リガーゼ・ドメインへの結合を阻害するため、p53 の発現が抑えられていること、しかし、活性型 Ras が Ras 結合ドメインに結合すると、SARAH ドメインによる抑制を解除し、MDM2 の結合を強め、p53 の発現を高めることを明らかにした。すなわち、Ras による腫瘍源性のストレスに際して、RASSF6 は MDM2 を通じて p53 の発現を高めて、安全弁として作動すると推定される。

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 16 件)

Sarkar A, Iwasa H, Hossain S, Xu X, Sawada T, Shimizu T, Maruyama J, Arimoto-Matsuzaki K, Hata Y. Domain analysis of Ras-association domain family member 6 upon interaction with MDM2. FEBS Lett. 591, 260-272. 2017 doi: 10.1002/1873-3468.12551. 査読有

Mandai S, Furukawa S, Kodaka M, Hata Y, Mori T, Nomura N, Ando F, Mori Y, Takahashi D, Yoshizaki Y, Kasagi Y, Arai Y, Sasaki E, Yoshida S, Furuichi Y, Fujii NL, Sohara E, Rai T, Uchida S. Loop diuretics affect skeletal myoblast differentiation and exercise-induced muscle hypertrophy. Sci Rep. 18, 46369. 2017 doi: 10.1038/srep46369. 査読有

Nagashima S, Bao Y, Hata Y. The Hippo pathway as drug targets in cancer therapy and regenerative medicine. Current Drug Targets 18, 447-545. 2017 doi: 10.2174/1389450117666160112115641 査読有

Nagashima S, Maruyama J, Kawano S, Iwasa H, Nakagawa K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nishina H, Hata Y. Validation of the chemical compound library screening for TAZ inhibitors by use of green fluorescence protein-fused TAZ. Cancer Sci. 107, 791-802. 2016 doi: 10.1111/cas.12936. 査読有

Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. *eNeuro*. 2016 Oct 17;3(5). pii: ENEURO.0110-16.2016. 査読有

Iwasa H, Jiang X, Hata Y. RASSF6; the Putative Tumor Suppressor of the RASSF Family. *Cancers (Basel)*. 9, 2415-2426. 2015 doi: 10.3390/cancers7040899 . 査読有

Kodaka M, Yang Z, Nakagawa K, Maruyama J, Xu X, Sarkar A, Ichimura A, Nasu Y, Ozawa T, Iwasa H, Ishigami-Yuasa M, Ito S, Kagechika H, Hata Y. A new cell-based assay to evaluate myogenesis in mouse myoblast C2C12 cells. *Exp Cell Res*. 336, 171-181. 2015 doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.015. 査読有

Kawano S, Maruyama J, Nagashima S, Inami K, Qiu W, Iwasa H, Nakagawa K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nishina H, Hata Y. A cell-based screening for TAZ activators identifies ethacridine, a widely used antiseptic and abortifacient, as a compound that promotes dephosphorylation of TAZ and inhibits adipogenesis in C3H10T1/2 cells. *J Biochem*. 158, 413-423. 2015 doi: 10.1093/jb/mvv051 . 査読有

Lefebvre J, Clarkson M, Massa F, Bradford ST, Charlet A, Buske F, Lacas-Gervais S, Schulz H, Gimpel C, Hata Y, Schaefer F, Schedl A. Alternatively spliced isoforms of WT1 control podocyte-specific gene expression. *Kidney Int*. 88, 321-331. 2015 doi: 10.1038/ki.2015.140. 査読有

Nagashima S, Kodaka M, Iwasa H, Hata Y. MAGI2/S-SCAM outside brain. *J Biochem*. 157, 177-184. 2015 doi: 10.1093/jb/mvv009 . 査読有

Kodaka M, Hata Y. The mammalian Hippo pathway: regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cell Mol Life Sci*. 72, 285-306. 2015 doi: 10.1007/s00018-014-1742-9. 査読有

Yang Z, Nakagawa K, Sarkar A, Maruyama J, Iwasa H, Bao Y, Ishigami-Yuasa M, Ito S, Kagechika H, Hata S, Nishina H, Abe S, Kitagawa M, Hata Y. Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. *Mol Cell Biol*. 34, 1607-1621. 2014 doi: 10.1128/MCB.01346-13. 査読有

Fukatsu A, Ishiguro F, Tanaka I, Kudo T, Nakagawa K, Shinjo K, Kondo Y, Fujii M, Hasegawa Y, Tomizawa K, Mitsudomi T, Osada

H, Hata Y, Sekido Y. RASSF3 downregulation increases malignant phenotypes of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 83, 23-29 2014. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.10.014. 査読有

Iwasa H, Kudo T, Maimait S, Ikeda M, Maruyama J, Nakagawa K, Hata Y. The RASSF6 tumor suppressor protein regulates apoptosis in the cell cycle via MDM2 protein and p53 protein. *J Biol Chem*. 288, 30320-30329. 2013 doi: 10.1074/jbc.M113.507384. 査読有

Yang Z, Hata Y. What is the Hippo pathway?: Is the Hippo pathway conserved in *Caenorhabditis elegans*? *J Biochem*. 154, 207-209. 2013 doi: 10.1093/jb/mvt060. 査読有

Sanada Y, Kumoto T, Suehiro H, Nishimura F, Kato N, Hata Y, Sorisky A, Yanaka N. RASSF6 expression in adipocytes down-regulated by interaction with macrophages. *PLoS One* 8, e61931. 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0061931 . 査読有

〔学会発表〕(計5件)

丸山順一、江欣亮、岩佐宏晃、湯浅 石上磨里、影近弘之、仁科博史、畑裕：新規に同定した YAP1 活性化化合物は多発性骨髄腫において YAP1-p73 経路依存的な細胞死を誘導する 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2016年12月1日 横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

長島俊太、丸山順一、湯浅 石上磨里、影近弘之、仁科博史、畑裕：細胞内局在を指標とする探索系による転写共役因子(TAZ)抑制剤探索の有効性の検証 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2016年12月1日 横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

小高愛未、那須雄介、小澤岳昌、湯浅 石上磨里、伊藤茂、影近弘之、畑裕：マウス筋芽C2C12細胞を用いた筋形成評価のための新しいアセイ系の構築 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2016年12月2日 横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

岩佐宏晃、清水尊仁、畑裕：UNC119Aは腫瘍抑制分子 RASSF6と共にDNA損傷応答を制御する 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2015年12月1日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

畑裕：がん治療、再生医療の治療標的としての転写共役因子 YAP1、TAZの有効性について 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2015年12月3日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：筋形成促進剤、筋萎縮抑制剤、医薬組成物及びT A Z活性化剤
発明者：畑裕、影近弘之、中川健太郎、伊藤茂
権利者：畑裕、影近弘之、中川健太郎、伊藤茂
種類：特許
番号：日本：特願 2015-561058、米国：15/117340、欧州：15746721.8
出願年月日：2015年2月6日
国内外の別：日本、米国、欧州

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
<http://www.tmd.ac.jp/mbc/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

畑 裕 (Hata Yutaka)
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：80313237

(2)研究分担者

()
研究者番号：

(3)連携研究者

岩佐 宏晃 (Iwasa Hiroaki)
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：70582188

丸山 順一 (Maruyama Junichi)

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：30723639

(4)研究協力者

()