

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K07052
研究課題名(和文) Hippo経路制御因子および破綻シグナルの検索

研究課題名(英文) Search for YAP/TAZ-regulating factors

研究代表者

日笠 弘基 (HIKASA, Hiroki)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：40596839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制シグナルであるHippo経路の分子基盤を解明するために、その活性を制御し、機能的に相互作用する遺伝子や化合物を、細胞ベースのハイスループットスクリーニングや質量分析法により同定し、機能解析を行った。これらの研究により、その活性制御剤として、イベルメクチンを始めとする複数の薬剤を特許出願して一部を論文発表するとともに、Hippo経路の新規抑制標的として、がん遺伝子産物であるmicroRNA制御タンパク質Lin28Bを見出し、発表した。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the molecular basis of Hippo pathway that is a tumor-suppressive signal, we performed cell-based high throughput screening and mass spectrometry to search for genes and compounds which control or functionally interact with Hippo pathway. We successfully identified several compounds including ivermectin and its derivative milbemycin D as mediators of Hippo pathway and applied for patents. In addition, we revealed that Hippo pathway drives a tumor-suppressive pathway that is dependent on Lin28B, a microRNA regulator and an oncoprotein.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：Hippo経路 YAP/TAZ 活性制御

1. 研究開始当初の背景

Hippo シグナル伝達経路は、細胞接触等の細胞間コミュニケーションを起点として細胞増殖を抑制し (接触抑制)、器官の大きさと組織の恒常性を維持する新しいがん抑制経路として注目されている。一般的に受け入れられている主要シグナル経路は、まず細胞接触等の細胞間相互作用を起点として、細胞内アダプター因子 MERLIN、KIBRA が SAV1/MST キナーゼ複合体を活性化し、続いて MOB/LATS キナーゼ複合体がリン酸化によって活性化される。最終的には MOB/LATS キナーゼ複合体が、細胞増殖に正に働く転写共役因子 YAP/TAZ をリン酸化し、その機能を抑制する。一方、Hippo 経路の制御下でない非リン酸化型 YAP/TAZ は、核内において転写因子 TEAD と結合し、標的遺伝子を活性化して細胞増殖および腫瘍形成を促進する。マウスにおいて Hippo 経路関連遺伝子を人為的に欠損させると、抑制が解除された転写共役因子 YAP/TAZ が多様な組織で悪性腫瘍を形成させることから、Hippo 経路は普遍的ながん抑制シグナルであるとともに、YAP/TAZ は Hippo 経路破綻による腫瘍形成の主要な原因因子の一つであることが明らかとなった。ヒトにおいても、多くの悪性腫瘍において、Hippo 経路因子の発現低下や YAP/TAZ の活性化と予後不良との相関が報告されている。ゆえに、YAP/TAZ の機能阻害は Hippo 経路上流因子の破綻によって引き起こされる種々の腫瘍化の抑制に有効な治療標的となり、YAP/TAZ 阻害剤が新規の抗腫瘍薬となることが期待されている。そして、Hippo 経路は EGF 経路などとも相互作用して YAP/TAZ 以外を標的にすることも示唆されており、Hippo 経路がもつ抗腫瘍活性のよりどころとなる鍵因子・分子機構の解明が急務となっている。

2. 研究の目的

これまで、遺伝子欠損マウスを用いた人為的

な Hippo 経路破綻による解析とヒト遺伝病の解析により、Hippo 経路は本来多様な組織において腫瘍抑制シグナルとして機能していることが明らかとなった。また、YAP/TAZ は恒常性の破綻を引き起こすがん遺伝子である一方、恒常性を維持する器官再生にも必要であるという多面的な機能因子であることが明らかになりつつあり、生体内において種々の因子によって幾重にも Hippo 経路および YAP/TAZ の活性がコントロールされていることが予想される。しかしながら、その伝達経路の全貌は未だ不明であり、さらに、生体内において、YAP/TAZ を活性化し、腫瘍化や再生の引き金になるシグナル・ストレスに関する知見はほとんどない。これらの命題の解明はがんの予防・治療・創薬および器官再生の観点においても急務であることから、内在性の YAP/TAZ 活性を指標とするハイスループットスクリーニングシステムに、siRNA ライブラリーやシグナル阻害・活性化剤を適用することで、YAP/TAZ の活性を大きく変動させる遺伝子やシグナル・ストレス刺激を絞り込み、Hippo 経路の制御・破綻因子を網羅的に検索する。さらに、細胞接着を起点とした Hippo 経路上流因子の活性化機構も不明なため、上流因子の一つである MERLIN に注目して、質量分析法によるタンパク質相互作用の観点から、Hippo 経路の分子基盤を探る。以上のような、YAP/TAZ の活性制御因子と Hippo 経路上流因子の検索し、その機能を解析することで、Hippo 経路の分子機構の全貌解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) YAP/TAZ 活性の制御因子・化合物の検索
申請者は、YAP/TAZ の機能を阻害する新規抗がん剤の開発のため、内在性の YAP/TAZ の活性を具現化できるレポーターシステム (YRE レポーター遺伝子) の構築に取り組み成功した。YRE レポーターを遺伝子導入したヒト乳

腺上皮細胞を多検体プレートで培養し、siRNA ライブラリー、シグナル剤ライブラリー、化合物ライブラリーを添加して、蛍光タンパク強度およびルシフェラーゼ活性をハイスループットシステムで測定する。これにより、YAP/TAZ の転写活性を大きく変動させる遺伝子、シグナル、化合物を体系的に検索する。そして、本スクリーニングで同定された因子・化合物による YAP/TAZ 制御機構および Hippo 経路への作用点を、培養細胞を用いた生化学的解析により明らかにし、細胞増殖や腫瘍形成への作用を検討し、特許出願を目的とする。さらに有望なものは遺伝子欠損マウスやシグナル亢進マウスを作製し、これらのマウスの胎生期および成体における形態形成変化、細胞増殖、細胞死、腫瘍形成等の表現型と、YAP/TAZ 活性化との関連性を検討することを目指す。

(2) Hippo 経路上流因子と結合する因子の検索と解析

細胞接触により Hippo 経路が活性化され、がん抑制シグナルを伝達する分子機構に注目した。そこで、flag 標識が付与された Hippo 経路上流因子 Merlin を発現する細胞を用意し、細胞接触時に MERLIN と結合量が上昇する蛋白質を免疫沈降で回収して、ショットガン形式による質量分析法で検索した。結果、得られたタンパク質の一つがマイクロ RNA を制御することで知られる Lin28B であった。ヒト培養細胞を用いた生化学的、細胞生物学的な解析により、細胞接触および非接触時の Merlin と Lin28B の相互作用、マイクロ RNA の変動、細胞増殖・自己複製能への効果を検討する。

4. 研究成果

(1) YAP/TAZ 活性の制御因子・化合物の検索
これを利用した化合物・天然物ライブラリー

スクリーニングにより、YAP/TAZ を阻害し抗腫瘍効果を示す物質（イベルメクチン等、特許出願済）が特定される等の成果をあげ、このシステムの有効性を示した (PNAS., 113(1), 2015) (図1)。また、腫瘍化の引き金となり、一方で組織再生にも必須である YAP/TAZ 活性の制御機構を解明するために、このシステムと siRNA ライブラリーや標準シグナル剤キッ

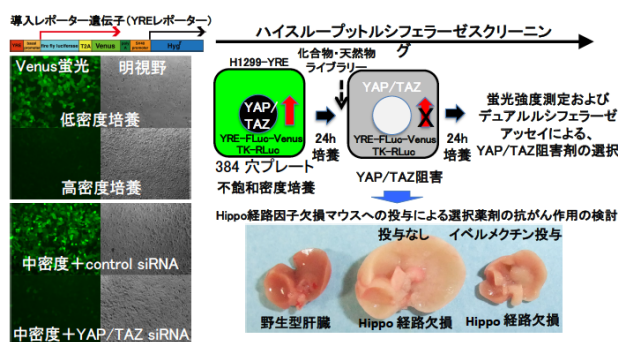
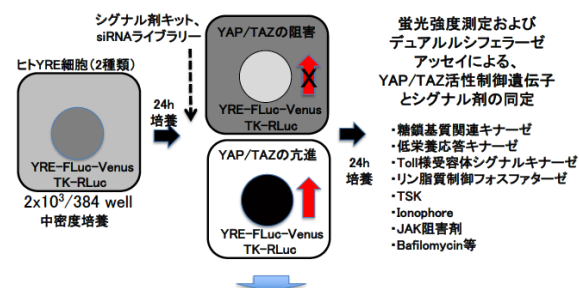


図1 YAP/TAZ特異的転写活性を視覚化・定量化できる安定細胞株の樹立と、それを利用した新規抗腫瘍剤の開発トを用いたスクリーニングを実行し、

YAP/TAZ の活性を制御する因子を網羅的に検索した。その結果、糖鎖修飾、低栄養応答、炎症応答関連遺伝子、機能未知キナーゼや、種々のストレス応答に関わる薬剤が YAP/TAZ の活性制御に関与する可能性が示唆され、その作用点を解明するとともにその効果に関する特許の申請も行った (図2)。



同定したシグナル因子のHippo経路への作用点の検討と特許出願

図2 YAP/TAZ活性制御因子・シグナルの検索と解析

(2) Hippo 経路上流因子と結合する因子の検索と新規がん抑制経路の発見

Lin28B は核において、未成熟 let-7 マイクロ RNA に結合して成熟化を阻害し、成熟 let-7 の標的である Myc 等のがん遺伝子の mRNA 翻訳を亢進することで、腫瘍形成や iPS 誘導を促進する因子である (図 3)。本研究によ

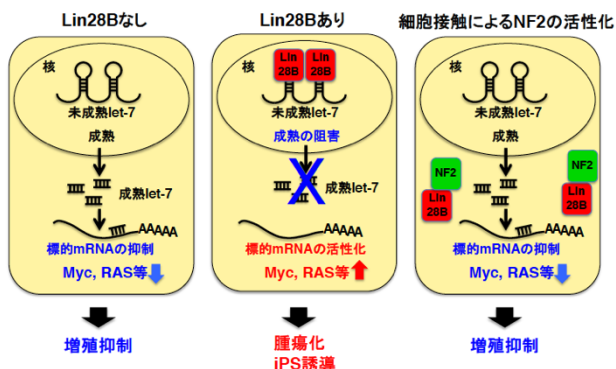


図3 NF2によるLin28Bを介した増殖抑制の分子機構

て、細胞接触が起点となり、Hippo 経路因子 NF2 がリン酸化依存的に Lin28B と結合することで Lin28B の核局在を阻害し、Lin28B と未成熟型 let-7 の複合体形成を抑制して、成熟 let-7 の増加と細胞増殖の低下を引き起こすことが明らかとなりその成果を発表した (Cell report 14(12), 2016) (図 3)。このことより、Hippo 経路における Lin28B/let-7 を介した新規がん抑制経路の存在が示唆された。

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 3 件)

1 : Kitajima S, Lee KL, Hikasa H, Sun W, Huang R YJ, Yang H, Matsunaga S, Yamaguchi T, Araki M, Kato H and Poellinger L Hypoxia-inducible factor-1 α promotes cell survival during ammonia stress response in ovarian cancer stem-like cells. Oncotarget, 8 (70):114481-114494 doi:10.18632/oncotarget.23010. 2017 査読有

2 : Hikasa H, Sekido Y and Suzuki A Merlin/NF2-Lin28B-let7 is a novel

tumor-suppressive pathway that is cell density-dependent and Hippo-independent. Cell Reports, 14(12) pp2950-61, doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.075. 2016 査読有

3 : Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, Takano Y, Hikasa H, Itoh T, Suzuki SO, Kurihara H, Aishima S, Leask A, Sasaki T, Nakano T, Nishina H, Nishikawa Y, Sekido Y, Nakao K, Shin-ya K, Mimori K and *Suzuki A

Dysregulated YAP1/TAZ and TGF β signaling mediate hepatocarcinogenesis in *Mob1a/1b*-deficient mice.

PNAS, 113(1) E71-80,

doi:10.1073/pnas.1517188113. 2015 査読有 [学会発表] (計 2 件)

1 日笠弘基 平良真規 鈴木聡 上野光 Hippo 経路エフェクター YAP/TAZ を制御する因子の検索

Searching for signals controlling Hippo pathway effectors YAP/TAZ 第 40 回日本分子生物学会年会 神戸 12 月 2017

2 Hiroki Hikasa, Yoshitaka Sekido, Akira Suzuki.

Merlin regulates the let-7 biogenesis via Lin28B suppression in a cell density-dependent manner.

第 38 回日本分子生物学会年会 神戸 12 月 2015

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : がん遺伝子産物 YAP1/TAZ 機能調節剤 発明者 : 日笠弘基、上野光

権利者 : 同上

種類 : 特許権

番号：特願 2017-218926

出願年月日：2017/11/14

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日笠 弘基 (HIKASA Hiroki)

産業医科大学医学部・生化学・講師

研究者番号：40596839