

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14984

研究課題名(和文) parafibrominによる発がん関連転写ネットワークの包括的制御機構

研究課題名(英文) Comprehensive elucidation of the cancer-related signal network controlled by parafibromin

研究代表者

菊地 逸平 (Kikuchi, Ippei)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員

研究者番号：80772376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近の研究から、核内タンパク質Parafibrominが発がんに関わる3つのシグナル伝達経路(Wntシグナル、Hedgehogシグナル、Notchシグナル)の遺伝子発現を協調的に制御することが明らかとなった。本研究ではさらに、Parafibrominチロシン脱リン酸化の亢進が細胞分裂期の異常を誘発することを明らかにした。また、ParafibrominはYAPおよびTAZと複合体形成することでHippo経路の標的遺伝子発現に機能することを発見した。さらに、Parafibrominのリン酸化を担う複数のチロシンキナーゼを欠損した新規遺伝子改変マウスモデルの樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々ながん種において細胞のがん化を促進する因子として近年大きな注目を集めるYAP・TAZタンパク質の機能制御にParafibrominならびにそのチロシンリン酸化が重要な役割を果たすことを世界に先駆けて明らかにした。本研究結果に基づいてParafibromin-YAP・TAZ複合体形成を阻害する薬剤などをスクリーニングすることで、これまで有効な治療法が確立されていないがんに対する新たな治療法の開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have indicated that a nuclear protein Parafibromin integrates the transcriptional outputs of multiple cancer-related signaling pathways such as Wnt, Hedgehog, and Notch signaling. In the present study, we found that increased tyrosine dephosphorylation of Parafibromin in cells leads to mitotic defects, thereby resulting in the decreased cell growth. We also demonstrated that Parafibromin forms a protein complex with YAP and TAZ, thereby promoting the transcriptional activation of Hippo signal target genes. Furthermore, we succeeded in establishing the new genetically engineered mouse model in which the multiple tyrosine kinases responsible for Parafibromin phosphorylation are simultaneously deleted.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん シグナル伝達 リン酸化 Hippoシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

がんは、細胞に蓄積したゲノム異常・エピゲノム異常が各種の細胞内シグナル伝達経路を攪乱することによって生じる疾患である。中でも、Wnt シグナル、Hedgehog シグナル、Notch シグナルなどの生物の形態形成に関わる形態形成シグナル経路群の機能異常は、消化器がん、血液がん、脳腫瘍などの多様ながん種の形成に深く関与することから、とりわけ重要な発がん関連シグナル経路としてこれまで精力的に研究が行われてきた。

こうした背景の中、我々は最近、細胞の核内に局在するタンパク質 Parafibromin が Wnt シグナル、Hedgehog シグナル、Notch シグナルの3つの発がん関連シグナル経路の遺伝子発現を協調的に制御する「転写足場タンパク質」として機能することを発見した。さらに、この Parafibromin の機能は PTK6 チロシンキナーゼならびに SHP2 チロシンホスファターゼによってそれぞれ調節される Parafibromin 分子内のチロシンリン酸化-脱リン酸化依存的であることを明らかにした。

しかしながら、このように複数の重要な発がん関連経路を協調的に制御する Parafibromin が細胞内で担う遺伝子発現応答の全容についてはいまだ明らかにされておらず、また、組織恒常性の維持や疾患発症などの生物個体レベルでの生命現象に Parafibromin が果たす生理学的・病態生理学的役割については、これまで謎のまま残されていた。

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では Parafibromin ならびにそのチロシンリン酸化-脱リン酸化制御が細胞内遺伝子発現ネットワークの制御に果たす機能的役割を明らかにし、細胞レベルおよび個体レベルの生命現象に Parafibromin が果たす生理的・病態生理的役割を解明することを目的とした。本研究を通して、様々な組織・臓器におけるがんの発生や先天性の形態異常といった病態に深く結びついている発がん関連シグナル経路群の制御機構を Parafibromin という新たな視点から解析することで、有効な治療法がいまだ十分に確立されていない難治性疾患に対する新たな治療法・予防法の開発につながることを期待できる。

## 3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、本研究では以下の研究項目を実施した。(1)Parafibromin チロシンリン酸化が細胞機能の調節に果たす役割の検討 (2)Parafibromin が遺伝子発現制御する新規シグナル伝達経路の探索 (3)Parafibromin チロシンリン酸化の生理的・病態生理的役割の検討を可能にする新規遺伝子改変マウスモデルの樹立

### (1)Parafibromin チロシンリン酸化が細胞機能の調節に果たす役割の検討

Parafibromin およびそのチロシンリン酸化制御が細胞増殖・細胞死などの細胞機能の調節に果たす役割を調べるため、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞および初代培養マウス胎児線維芽細胞 (MEF 細胞) に野生型 Parafibromin ならびにリン酸化を受けるチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したチロシンリン酸化抵抗性 Parafibromin 変異体を発現させた。これらの細胞を用いて、細胞増殖曲線 (cell growth curve) の測定 フローサイトメーターを用いた細胞周期解析 生細胞タイムラプスイメージング顕微鏡を用いた細胞分裂のタイムラプス観察を行った。

### (2)Parafibromin が遺伝子発現制御する新規シグナル伝達経路の探索

Parafibromin によって機能制御される新規のシグナル伝達経路の探索のため、がん抑制シグナル伝達経路として近年大きな注目を集める Hippo シグナル伝達経路への Parafibromin の関与を調べた。HEK293T 細胞に野生型 Parafibromin、チロシンリン酸化抵抗性 Parafibromin 変異体を発現させ、Hippo 経路の転写制御因子 YAP および TAZ との複合体形成を共免疫沈降実験により解析した。また、TEAD 依存的ルシフェラーゼレポーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイならびに定量的リアルタイム逆転写 PCR 法 (qRT-PCR) によって Parafibromin が Hippo シグナル標的遺伝子 (TEAD 標的遺伝子) の発現誘導に関与するか否かを調べた。

### (3)Parafibromin チロシンリン酸化の生理的・病態生理的役割の検討を可能にする新規遺伝子改変マウスモデルの樹立

Parafibromin のチロシンリン酸化-脱リン酸化が生物個体レベルで担う生理的・病態生理的役割を明らかにするために、Parafibromin のチロシンリン酸化を担うチロシンキナーゼ群を複数同時欠損させた新規遺伝子改変マウスモデルの樹立を CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集技術により試みた。具体的には、先行研究で我々が既に作製した PTK6 単独欠損マウスを用いて体外受精により PTK6 単独欠損受精卵を作出し、この受精卵にさらなる他のキナーゼを標的とした small guide RNA (sgRNA) と Cas9 タンパク質を電気穿孔法により共導入することによって、複数の標的チロシンキナーゼ遺伝子に不活性化変異が同時導入されたファウンダー (F0) マウスを作出した。ここで得られるファウンダーマウスは遺伝学的モザイク (変異導入細胞と

そうでない細胞が体内で混在している)であるため、複数のファウンダーマウス同士の交配により、目的の変異遺伝子が生殖系列伝播した次世代(F1)マウスを作出した。さらに、得られたマウスに対しジェノタイピング PCR 解析および DNA 配列解析(DNA シークエンシング)を行うことで、期待する遺伝子変異の有無を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1)チロシンリン酸化-脱リン酸化依存的な Parafibromin による細胞増殖制御

野生型 Parafibromin ならびにチロシンリン酸化抵抗性 Parafibromin 変異体を発現させた HEK293 細胞および MEF 細胞において細胞増殖曲線(cell growth curve)の測定を行った結果、興味深いことに、Parafibromin のチロシン脱リン酸化依存的に細胞の増殖・生存が著しく抑制されることがわかった。さらに、これらの細胞でフローサイトメーターを用いた細胞周期解析ならびに生細胞タイムラプスイメージング顕微鏡を用いた細胞分裂のタイムラプス観察を行ったところ、細胞内における Parafibromin チロシン脱リン酸化の亢進は細胞分裂期(M期)における分裂異常を誘発することで、細胞増殖の抑制を引き起こすことが明らかとなった。以上の実験結果から、哺乳動物細胞の増殖・分裂には Parafibromin チロシンリン酸化状態の制御が重要な役割を果たすことが示唆された。したがって Parafibromin チロシンリン酸化-脱リン酸化の制御異常は染色体不安定性を誘導することでがん細胞の悪性化に寄与する可能性が考えられる。

##### (2)Parafibromin による Hippo シグナル伝達経路制御機構

Parafibromin のチロシンリン酸化-脱リン酸化依存的に機能制御される新たな標的経路として、がん抑制シグナル経路として近年大きな注目を集める Hippo 経路への Parafibromin の関与を調べた。初めに HEK293T 細胞で共免疫沈降実験を行った結果、Hippo シグナル経路の転写コアクチベーターとして知られる YAP ならびに TAZ と Parafibromin が細胞内で複合体形成することが明らかとなった。また、TEAD 依存的ルシフェラーゼレポーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイならびに定量的リアルタイム逆転写 PCR 法(qRT-PCR)を行ったところ、YAP ならびに TAZ との複合体形成依存的に Parafibromin が Hippo シグナル標的遺伝子(TEAD 標的遺伝子)の発現を促進させることがわかった。さらに、チロシンリン酸化抵抗性 Parafibromin 変異体を用いた各種の解析から、チロシンリン酸化型 Parafibromin は YAP 特異的に結合する一方で、チロシン脱リン酸化型 Parafibromin は TAZ 特異的に結合して機能制御することが明らかとなった。これまでの知見において、Hippo シグナルのエフェクター分子である YAP と TAZ は互いに重複した機能を有する一方で、細胞の置かれた周囲の状況によっては互いに異なる特有の機能を発揮することが知られていた。本研究の結果から、そのような YAP と TAZ それぞれに特異的な機能制御には Parafibromin のリン酸化に依存した活性化機構が働いていることが強く示唆された。Hippo シグナル経路の破綻ならびに YAP・TAZ の異常活性化は消化器癌や肝臓がんなどの様々ながんの発がん原因となっていることから、本研究結果に基づいて Parafibromin-YAP・TAZ 複合体形成を阻害する薬剤などの新たな治療法の開発につながることを期待できる。

##### (3)Parafibromin チロシンリン酸化の生理的・病態生理的役割の検討を可能にする新規遺伝子改変マウスモデルの樹立

Parafibromin チロシンリン酸化-脱リン酸化が生物個体内(*in vivo*)で果たす役割の検討のため、Parafibromin のチロシンリン酸化を担うチロシンキナーゼ群を複数同時欠損させた多重欠損マウスを CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集技術により作製した。PTK6 単独欠損マウスの受精卵を用いたゲノム編集操作の結果、標的とする複数のチロシンキナーゼ遺伝子に不活性化変異が同時導入されたファウンダー(F0)マウスを作出することに成功した。さらに、ファウンダーマウス同士の交配により変異遺伝子が生殖系列伝播した次世代マウス(F1マウス)の樹立に成功した。今後の研究の展開としては、この新たに作製した遺伝子改変マウスを用いて各種の発がん実験(dextran sulfate sodium 投与による腸炎誘導性発がん実験等)や腸内細菌叢のメタゲノム解析、免疫系に対する影響の解析等を行うことで Parafibromin チロシンリン酸化の生理的・病態生理的役割のさらなる解明を目指す。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Tang, C., Takahashi-Kanemitsu, A., Kikuchi, I., Ben, C., Hatakeyama, M. Transcriptional Co-activator Functions of YAP and TAZ Are Inversely Regulated by Tyrosine Phosphorylation Status of Parafibromin. *iScience*, 査読有, 1 巻, 2018, 1-15  
DOI: 10.1016/j.isci.2018.03.023

〔学会発表〕(計 4件)

唐超、高橋昌史、菊地逸平、賁馳、畠山昌則 Inverse control of transcription co-activator function of YAP and TAZ by tyrosine phosphorylation status of Parafibromin. 第77回 日本癌学会学術総会(国際学会)2018年

唐超、高橋昌史、菊地逸平、賁馳、畠山昌則 Transcriptional co-activator function of YAP/TAZ are inversely regulated by phosphorylation status of Parafibromin. 第37回 札幌がんセミナー国際シンポジウム(国際学会)2018年

菊地逸平、高橋昌史、先山奈津紀、畠山昌則 Parafibromin acts as a transcriptional scaffold protein that integrates multiple morphogen signaling pathways. 第37回 札幌がんセミナー国際シンポジウム(国際学会)2018年

菊地逸平 Dephosphorylated parafibromin is a transcriptional coactivator of the Wnt/Hedgehog/Notch pathways 日本プロテインホスファターゼ研究会 第9回(平成28年度)研究会賞 受賞講演(招待講演)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microbiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。