

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06232

研究課題名(和文) Hippo経路エフェクターYAP/TAZの方向性を規定するシグナルの検索と解析

研究課題名(英文) Searching for signals controlling Hippo pathway effectors YAP/TAZ

研究代表者

日笠 弘基 (Hikasa, Hiroki)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40596839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo経路エフェクターYAP/TAZの活性は生体恒常性の維持のため生体内で厳密にコントロールされており、腫瘍化及び組織再生の双方に関連する。我々は『多くのヒト疾患の原因となる生体恒常性破綻の端緒・過程とはどのようなものか』という問いの手がかりを得るため、YAP/TAZの制御機構に関わる因子の網羅的検索及び解析を行なった。その結果、種々のシグナル経路・因子がYAP/TAZの活性制御に関与することを見出した。さらに、それらの因子の1つが線維化・発がんシグナルであるWnt/ β -カテニン経路の制御にも密接に関わるという新発見も得られ、さらに研究の発展につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

YAP/TAZはヒトの多様ながんにおいて機能亢進や過剰発現が確認されており、腫瘍化や悪性化の原因となっている。だが一方で、YAP/TAZは損傷した組織の修復にも必要であり、人為的にYAP/TAZを損傷組織に活性化させるとより再生が改善され、iPS細胞の誘導にも寄与することがわかっている。本研究により同定されたYAP/TAZ活性化因子はiPS細胞誘導の最適化や、損傷組織の再生医療薬の開発への貢献が期待でき、YAP/TAZ抑制因子は抗がん剤開発の糸口になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Hippo pathway effectors YAP/TAZ are under the strict control to maintain biological homeostasis in vivo and are involved in both tumorigenesis and tissue regeneration. In order to obtain clues to address how the homeostasis breakdown begins and proceeds, we carried out the systematic screening to search for YAP/TAZ-regulating factors and identified potassium ionophores, a ER-stress inducer, genotoxic molecules, Jak3 inhibitors and several signaling kinases as novel modulators of YAP/TAZ activity, suggesting that YAP/TAZ are regulated by multiple cellular cues.

研究分野：細胞生物学 生化学

キーワード：Hippo経路 YAP/TAZの制御機構 恒常性の破綻 炎症性シグナル

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。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責任因子であることが明らかとなっている。ヒトにおいても、多くの悪性腫瘍において、Hippo 経路関連因子の発現低下や YAP/TAZ の活性化と予後不良との相関が報告されているが(文献1)、これらの遺伝子変異はあまり生じていないことが知られており、悪性腫瘍形成における YAP/TAZ の活性化機構の解明は依然大きな課題のままである。一方で、心臓、肝臓、皮膚、小腸等が損傷を受けると、損傷部位で YAP/TAZ が活性化され、それらの組織再生に必須であること、更に人為的に損傷組織に YAP/TAZ を活性化させると、組織再生がより改善することも示されている(文献2)。このように、YAP/TAZ は腫瘍形成要因であるが、組織再生でも主要な役割を果たし、生体組織の破綻と維持の両方に関する諸刃の剣であり、通常は生体において YAP/TAZ 活性は厳密にコントロールされていることを予想させる。しかしながら、どのような細胞環境、ストレスおよび制御機構の差異で、YAP/TAZ 活性が腫瘍化、片や組織再生のどちらに作用するのかは全く不明であり、時期及び空間的な YAP/TAZ の活性制御機構の解明はがんの治療戦略及び再生医療の進展に急務となっている。

2. 研究の目的

内的・外的ストレスに絶えず曝されている生体内の各組織では、異物侵入や軽微な損傷が頻繁に生じているが、生来、我々の体内には免疫応答や組織修復機構が備わっており、このようなストレスに対しても生体恒常性を維持し得る。生体恒常性の維持には多様な細胞シグナル伝達経路が関わっていることが知られており、その多くが生体内で厳密な制御下にあると想定されるが、ひとたび破綻に陥ると、慢性炎症やがんなどの重篤な疾患を引き起こす。それでは『本来生体恒常性の維持すべきシグナル伝達経路が破綻する端緒・過程』とはどのようなものか。我々はこの主問題を追求する上で、上記に述べたがん、組織再生に関わる Hippo 経路エフェクター YAP/TAZ の制御機構に注目した。本研究では、『生体組織における腫瘍化と再生化に至るまでの YAP/TAZ 活性化のプロセスの差異とは何か』を明らかにするため、初手のアプローチとして、Hippo 経路もしくは YAP/TAZ の活性を制御するシグナル因子を網羅的に明らかにすることが必要だと考えた。そして、得られたシグナル因子の Hippo 経路因子や YAP/TAZ への作用機序を解析することで、種々のシグナルやストレスによる YAP/TAZ の制御機構の全貌の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) YAP/TAZ 活性を制御するシグナル因子の同定

YAP/TAZ の転写活性に高感度で応答する DNA 配列を最適化して(YRE)、内在性 YAP/TAZ の活性に視覚化・定量化できる YAP/TAZ 応答レポーター遺伝子を独自に開発し、これをレンチウイルスベクターに導入することで、広範囲のヒト細胞に遺伝子導入できるレポーターシステムを開発した(図1)。それをヒト乳腺上皮細胞 MCF10A とヒト肺がん細胞株 H1299 に導入し、安定したレポーター導入細胞を作成した(MCF10A-YRE、H1299-YRE)。MCF10A-YRE および H1299-YRE を多検体プレートで培養し、ヒトキナーゼ、ヒトホスファターゼ siRNA ライブラリー、新学術領域分子プロファイリング支援が提供する標準阻害剤キット、化合物ライブラリー(NPDepo, 理研)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(図2)。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。

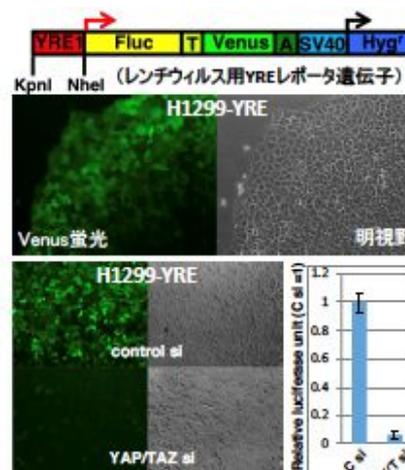


図1 内在性YAP/TAZ活性によりVenusとLuciferaseを発現するH1299-YREの樹立。単一細胞から、コロニーを形成させると、接触抑制の弱いコロニー周辺部でYAP/TAZがより強く活性化される。VenusとLuciferase活性はYAP/TAZ siRNAにより抑制される。

(2) 同定された因子の Hippo 経路に対する作用点の解析

レポータースクリーニングで同定された遺伝子・シグナル阻害剤・化合物について、Hippo 経路および YAP/TAZ を制御する分子機構（作用点）を MCF10A-YRE 及び H1299-YRE 細胞を用いて明らかにする。遺伝子の解析に関しては、機能阻害・亢進の両面から、Hippo 経路因子-YAP/TAZ シグナル軸に対する必要性・十分性を検討する。さらに、それらの Hippo 経路因子や YAP/TAZ への作用点について、タンパク質結合性、リン酸化能、細胞内局在制御を、生化学的、細胞生物学的手法により解析し、Hippo シグナル伝達における作用点の位置を明らかにする。興味深い因子は機能欠損もしくは組織特異的機能亢進マウスを作製し、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、組織線維化、自然腫瘍形成率を検討する。また、薬剤によって細胞障害や炎症を起こした組織においても同様の検討を目指す。

4. 研究成果

(1) YAP/TAZ 特異的高感度レポーターシステムを利用した Hippo 経路因子研究

我々が開発したレポーターシステムは、多様なヒト細胞に遺伝子導入が可能であり、目的とする種々のヒト細胞株で内在性の YAP/TAZ の転写活性を特異的に再現性高く検出することが可能となった(図1)。これにより Hippo 経路因子 Mob1 の欠損による子宮がん及び口腔がんに関連する研究に有用なツールとなり、これを利用した論文を近年2報発表し、1報をリバイス中である。

(2) YAP/TAZ 活性を制御するシグナル因子の同定

このレポーターシステムとシグナル標準阻害剤キットを用いた YAP/TAZ を制御するシグナル阻害剤検索では、カリウムイオノフォア(バフィロマイシン B1、バリのマイシン、ニジェリシン)、オートファジー阻害剤(タブシガルギン)が YAP/TAZ の活性を抑制し、JAK 阻害剤や DNA 障害誘導剤(アクチノマイシン D)は活性化することを新規に見出した。また、ヒトキナーゼ、ヒトホスファターゼ siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより、フコシル化糖鎖修飾の基質を制御するフコキナーゼ、低栄養で活性化されるキナーゼ NIAK2、炎症反応により活性化される Toll 様受容体・IL-1 受容体シグナル経路の共通キナーゼ IRAK1、リン脂質代謝制御ホスファターゼ PLPP 等が YAP/TAZ の活性化に必須であり、機能が明らかでない TSK キナーゼは YAP/TAZ の抑制に必須であることを見出した(図2)。

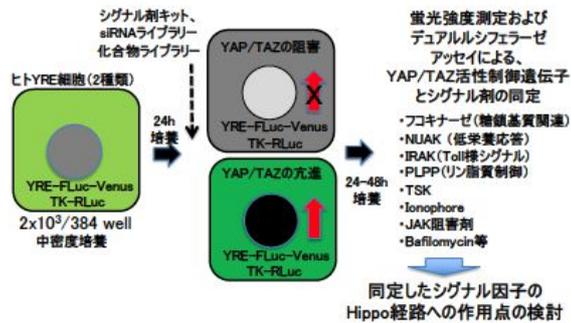


図2 YAP/TAZ活性制御因子・シグナルの検索と解析

(3) YAP/TAZ 活性を制御するシグナル因子の機能解析

レポータースクリーニングで同定されたシグナル阻害剤を MCF10A-YRE 及び H1299-YRE 細胞に添加して、YAP/TAZ の標的遺伝子である Birc5、CtGF、Cyr61 の発現を qPCR で解析したところ、レポーターアッセイと同様の挙動を内在性の標的遺伝子も示すことが確認できた(図3)。さらに YAP/TAZ タンパク質の変動をウエスタンブロットで調べると、カリウムイオノフォアはタンパク質レベルの減少、タブシガルギンは YAP/TAZ のタンパク質レベルの減少とリン酸化の増加、JAK 阻害剤はタンパク質レベルの増加とリン酸化の減少、アクチノマイシン D はリン酸化の減少が確認できた(図3)。現在、これらの新規薬剤の活性とレポーターシステムの利便性をまとめた論文をリバイス中である。siRNA スクリーニングで同定された遺伝子の機能阻害実験として同じ siRNA を用いて YAP/TAZ の標的遺伝子の変動を qPCR で解析したところ、レポーターアッセイと同様に発現の抑制が観察されたが、その一方で、これらの遺伝子の cDNA をレンチウイルスで過剰発現させたところ、YRE レポーター遺伝子、内在性標的遺伝子ともに顕著な変動は見られなかった。今後、機能阻害実験において、Hippo 伝達経路のどのレベルが変動して YAP/TAZ の抑制が起きているのかを検討する。

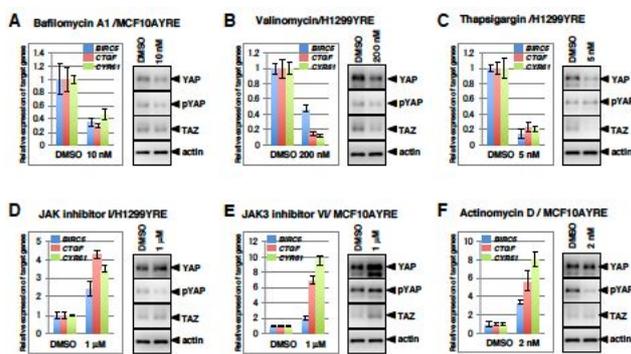


図3 同定された阻害剤によるYAP/TAZ及び標的遺伝子の変動

(4) 炎症性シグナル経路因子 IRAK1 による Wnt/ β -カテニン経路活性化の発見

研究(2)で同定した遺伝子の1つが炎症性シグナル因子 IRAK1 キナーゼであったが、ヒト IRAK1 の機能阻害・機能亢進実験を進めた結果、ヒト IRAK1 は YAP の活性化に必須だけでなく、その機能亢進は Wnt/ β -カテニン経路に強いインパクトを持つことが判明した(図4、5)。この結果は、IRAK1 が炎症、細胞増殖、上皮間葉転換、線維化、発がんに関わる NF κ B、 β -カテニン、YAP の活性化の起点となる可能性を示唆し、炎症内における IRAK1 の恒常的活性化が、慢性炎症組織での線維化・がん化・悪性化を起こす原因になるという仮説の端緒となり、さらに、IRAK1 の機能解析を押し進めるに至った。その結果、炎症性サイトカイン IL-1 は、ヒト IRAK1 を介して β -カテニンを活性化する。(図4) ヒト IRAK1 の機能亢進は β -カテニンと NF κ B の両経路を活性化し、ヒトの種々のがん組織で見つかった IRAK1 の点変異は両経路を増強すること(図4) IRAK ファミリーのうち、特有のモチーフを持つヒト IRAK1 のみが β -カテニンの活性化に必要十分であり、かつ肺腺がん、肝がんの予後増悪因子であること(図4、5)が示唆され、それに関連する発見を出願した。今後さらにヒト IRAK1 の機能亢進の生理的意義を生体内で明らかにするため、組織特異的ヒト IRAK1 機能亢進マウスを作成して、慢性炎症から線維化・発がんに至る新規病態モデルマウスの樹立を目指す(図6)。

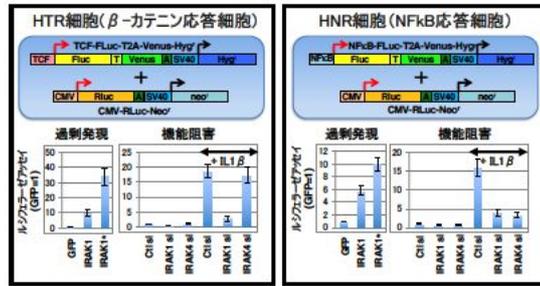


図4 ヒトIRAK1は β -カテニン及びNF κ Bの両方を活性化する。がん組織で見つかった変異体(*)はさらに強い活性を持つ。IRAK1はIL-1 β による β -カテニンの活性化に必要であるが、IRAK4は必要でない。

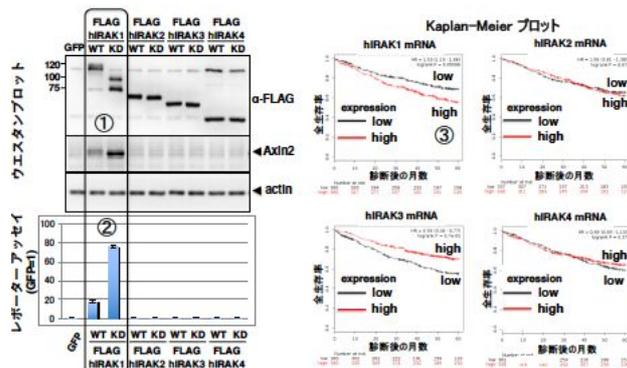


図5 ヒトIRAKファミリーの中で、IRAK1のみが β -カテニンを活性化し、肺腺がんの予後増悪因子である

IRAK1のみが、① β -カテニン標的遺伝子であるAxin2タンパク質の増加、② レポーター遺伝子を活性化、③ 肺腺がんの予後増悪化を引き起こす。IRAK1のキナーゼ活性欠損変異体(KD)はさらに強い効果をもつ。

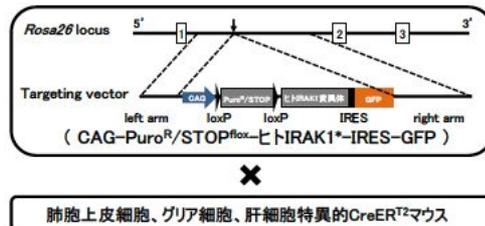


図6 組織特異的ヒトIRAK1変異体(*)発現TG-マウス作製

引用文献

1. Cancer Cell 29 783-803, 2016
2. Nat.Reviews Mol.Cell Biol.20 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Omori H, Nishio M, Masuda M, Miyachi Y, Ueda F, Nakano T, Sato K, Mimori K, Taguchi K5, Hikasa H6, Nishina H, Tashiro H, Kiyono T, Mak TW, Nakao K, Nakagawa T, Maehama T, Suzuki A.	4. 巻 18
2. 論文標題 YAP1 is a potent driver of the onset and progression of oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv.	6. 最初と最後の頁 eaay3324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aay3324.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishio M, To Y, Maehama T, Aono Y, Otani J, Hikasa H, Kitagawa A, Mimori K, Sasaki T, Nishina H, Toyokuni S, Lydon JP, Nakao K, Wah Mak T, Kiyono T, Katabuchi H, Tashiro H, *Suzuki A	4. 巻 111
2. 論文標題 Endogenous YAP1 activation drives immediate onset of cervical carcinoma in situ in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3576-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14581.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三村恭弘, 乾雅子, 山元 孝佳, 大坪 孝平, 平良 眞規, 日笠 弘基
2. 発表標題 Toll様受容体/IL-1受容体経路構成因子であるヒトIRAK1はWnt/ -カテニン経路を活性化する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日笠弘基, 平良眞規, 鈴木聡, 上野光
2. 発表標題 Hippo経路エフェクターYAP/TAZを制御する因子の同定
3. 学会等名 第41回分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三村 恭弘, 乾 雅子, 平良 眞規, 大坪 孝平, 日笠 弘基
2. 発表標題 Toll様受容体/IL-1受容体経路構成因子IRAK1はPPPSPモチーフによるAxin1との相互作用を介してWnt/beta-cateninシグナル経路を活性化する。
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西尾 美希, 中谷 圭佑, 大谷 淳二, 日笠 弘基, 前濱 朝彦, 鈴木 聡
2. 発表標題 YAP1/TAZ阻害による抗腫瘍作用を示す天然物の同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Wnt/ -カテニン経路の活性化亢進作用を有するタンパク質	発明者 日笠弘基 三村恭弘 乾雅子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-207336	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

産業医科大学医学部生化学講座 https://www.uoeh-u.ac.jp/University/dept/medicine/seika.html 産業医科大学 生化学講座 https://www.uoeh-u.ac.jp/University/dept/medicine/seika.html
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------