

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：23401
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2023
課題番号：19K09777
研究課題名（和文）卵胞の成熟と絨毛細胞分化を制御する新たな共通因子Hippo経路の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanisms by which a common regulator, the Hippo pathway, regulates ovarian and trophoblast differentiation.

研究代表者
水谷 哲也（Mizutani, Tetsuya）

福井県立大学・看護福祉学部・教授

研究者番号：90322734
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Hippo pathwayは、細胞の増殖や器官サイズを制御するシグナル伝達系で、この経路が転写共役因子YAP/TAZの活性を調節する。卵巣顆粒膜細胞および絨毛細胞におけるYAP/TAZの役割について解析したところ、転写因子TEADを介してこれらの細胞の分化を抑制的に調節していることが示された。さらにYAP/TAZ-TEADが卵巣と胎盤のステロイドホルモン産生を調節する共通因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

YAP/TAZ-TEADによる卵巣と胎盤の新たな分化制御メカニズムが示された。
YAP/TAZ-TEADが卵巣と胎盤のステロイドホルモン産生を調節する共通因子であることが明らかとなった。
卵巣と胎盤機能を調節する新たな因子が同定されたことから、不妊症や周産期疾患に対する新たな治療薬や診断に応用されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Hippo pathway is an evolutionarily conserved signaling pathway that controls organ size by phosphorylating and inhibiting the transcription co-activators YAP/TAZ in mammals. To elucidate the role of YAP/TAZ and a transcription factor TEAD, which directly bind with YAP/TAZ, in ovarian granulosa cells and placental trophoblast cells, the gain-of-function and the loss-of-function analyses were performed. We showed that YAP/TAZ-TEAD is involved in the regulation of both granulosa and trophoblast differentiation. Furthermore, YAP/TAZ-TEAD is a common regulator of steroidogenesis in both ovary and placenta.

研究分野：生殖科学

キーワード：絨毛細胞 顆粒膜細胞 YAP TAZ TEAD

1. 研究開始当初の背景

Hippo 経路は、細胞の増殖や器官サイズを制御するシグナル伝達系で YAP/TAZ を介して標的遺伝子の転写調節に関与する。卵巣では Hippo 経路が二次卵胞の発育に重要なことが明らかになっているが (Kawamura, K. et al., PNAS, 2013)、ゴナドトロピンとの関連や排卵前卵胞への成熟過程の関与は明らかになっていない。一方、胎盤では Hippo 経路の下流因子 TEAD4 が胎盤の由来となる栄養外胚葉の形成に必須であることが明らかになっているが (Nishioka, N. et al., Dev Cell, 2009)、絨毛細胞分化での役割は明らかになっていない。転写因子 TEAD は TEAD1 ~ TEAD4 のファミリーを形成し YAP/TAZ と相互作用することが知られている。我々は、YAP/TAZ が TEAD と相互作用し、卵巣顆粒膜細胞や胎盤絨毛細胞において標的遺伝子を負に制御していることを見いだしている。また、卵巣をはじめ精巣、副腎のステロイド関連因子の発現には転写因子 SF-1/LRH-1 が必須だが、胎盤におけるステロイドホルモン産生に対して SF-1/LRH-1 は重要ではなく、その調節メカニズムは不明である。本研究では、Hippo 経路に注目することで、はじめて卵巣と胎盤のステロイドホルモン産生を調節する共通因子の同定や卵巣・胎盤の分化調節メカニズムの解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 顆粒膜細胞における cAMP 誘導性遺伝子の発現に対する YAP/TAZ-TEAD の影響を明らかにする。
- (2) 絨毛細胞の細胞性栄養膜(Cytotrophoblast: CT)細胞から合胞体栄養膜(Syncytiotrophoblast: ST)細胞への分化に対する YAP/TAZ-TEAD の影響を明らかにする。
- (3) 卵巣顆粒膜細胞と絨毛 ST 細胞における共通したステロイドホルモン産生調節メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 顆粒膜細胞における FSH/cAMP 誘導性遺伝子の発現に対する YAP/TAZ-TEAD の役割
ヒト卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞を用いて、YAP 恒常性活性化型(YAP-5SA)のアデノウィルス過剰発現系を用いて、過剰発現による遺伝子発現への影響を明らかにする。さらに、YAP/TAZ または転写因子 TEAD をノックダウンし、遺伝子発現への影響を明らかにする。
- (2) 絨毛の CT 細胞から ST 細胞への分化誘導時の発現に対する YAP/TAZ-TEAD の役割
ヒト絨毛細胞由来 BeWo 細胞、ヒト絨毛幹細胞およびヒト初代培養 CT 細胞を用いて、上記と同様な方法により解析する。
- (3) YAP/TAZ-TEAD による遺伝子発現抑制に SF-1/LRH-1 を介しているか
HEK293 細胞を用いて mammalian one-hybrid および two-hybrid assay により検討する。

4. 研究成果

- (1) 顆粒膜細胞における FSH 誘導性遺伝子の発現に対する YAP/TAZ-TEAD の影響
顆粒膜細胞における YAP/TAZ 標的遺伝子を同定するため、KGN 細胞を用いて YAP/TAZ ノックダウンによる遺伝子発現への影響を DNA マイクロアレイにより検討した。その結果、cAMP で誘導される遺伝子および抑制される遺伝子では有意な重複が認められたことから、cAMP シグナル系の一部は YAP/TAZ を介して作用することが示された(表 1)。
この結果から、卵巣顆粒膜細胞では FSH によって誘導される増殖・分化は、YAP/TAZ-TEAD を介した作用が含まれると考えられた。

表 1 KGN 細胞における YAP/TAZ ノックダウンと 8Br-cAMP 刺激による遺伝子発現の比較 (発現量がコントロールに対して 2 倍以上変動する遺伝子)

A : YAP/TAZ ノックダウンによって誘導される遺伝子	400
B : 8Br-cAMP 刺激によって誘導される遺伝子	208
A と B の重複	56
C : YAP/TAZ ノックダウンによって抑制される遺伝子	451
D : 8Br-cAMP 刺激によって抑制される遺伝子	196
C と D の重複	93

- (2) 絨毛細胞の CT 細胞から ST 細胞への分化に対する YAP/TAZ-TEAD の影響

YAP-5SA を BeWo 細胞へ導入すると cAMP で誘導された ST 特異的遺伝子(*CYP19A1*, *CGB*, *ERVW-1*, *SDCI*, *OVOLI*, *GCMI*)の発現誘導は消失し、YAP/TAZ-TEAD をノックダウンすると cAMP の刺激なしに ST 特異的遺伝子の発現は誘導された。一方、ヒト絨毛幹細胞を用いて、YAP/TAZ-TEAD ノックダウンの影響を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析したところ、CT 特異的遺伝子の発現は抑制され ST 特異的遺伝子の多くが誘導された。また、絨毛幹細胞から ST 細胞への分化誘導時に YAP-5SA を導入すると ST 特異的遺伝子の発現は顕著に抑制され

た。さらに、ST 細胞へと自然分化する初代培養 CT 細胞を用いて、YAP-5SA 導入の影響を検討したところ、ST 特異的遺伝子の発現は有意に抑制された。

絨毛幹細胞を用いて、ST 細胞への分化誘導時における YAP/TAZ および TEAD ファミリーの発現を検討した。その結果、YAP/TAZ はタンパク質レベルで有意な発現の抑制が認められた。一方、TEAD ファミリーの発現は TEAD1, 2, 4 mRNA は抑制されるのに対し、TEAD3 mRNA の発現は 5 倍程度誘導された。ST 細胞への分化誘導によって、TEAD 活性が顕著に低下することをルシフェラーゼアッセイにより明らかにしていることから、YAP/TAZ-TEAD は発現量の低下に伴い活性が低下していると考えられた。

以上の結果から、ヒト絨毛において YAP/TAZ-TEAD は、活性状態で CT 細胞の分化を抑制し、活性低下により CT 細胞から ST 細胞への分化を誘導することが示された。

(3) 卵巣顆粒膜細胞と絨毛 ST 細胞における共通したステロイドホルモン産生調節メカニズム

ステロイドホルモン代謝酵素の発現に対する YAP/TAZ-TEAD の影響を KGN 細胞および BeWo 細胞を用いて検討した。その結果、cAMP 刺激で誘導された発現は YAP-5SA の導入により抑制される一方、TEAD ノックダウン細胞では YAP-5SA の有意な影響は認められなかった。このことから、顆粒膜細胞および絨毛細胞では共通して YAP/TAZ-TEAD 複合体がステロイドホルモン代謝酵素の発現を抑制していることが明らかとなった(図 1, 2)。生体内では、分化前は YAP/TAZ-TEAD により抑制され、分化の誘導に伴い YAP/TAZ のリン酸化により YAP/TAZ-TEAD 活性が低下することで抑制が解除されステロイドホルモン代謝酵素の発現が促進されると推察された。

YAP/TAZ-TEAD による遺伝子発現抑制に対して、卵巣のステロイドホルモン関連遺伝子の発現に必須である SF-1(LRH-1)を介しているのか、mammalian one-hybrid および two-hybrid assay により検討したところ、YAP および TEAD は SF-1 との間における相互作用は確認されなかった。このことから、YAP/TAZ-TEAD は SF-1 (LRH-1)と独立してステロイドホルモン代謝酵素の発現を制御していることが示された。今後、YAP/TAZ-TEAD による遺伝子発現抑制メカニズムを解明していきたいと考えている。

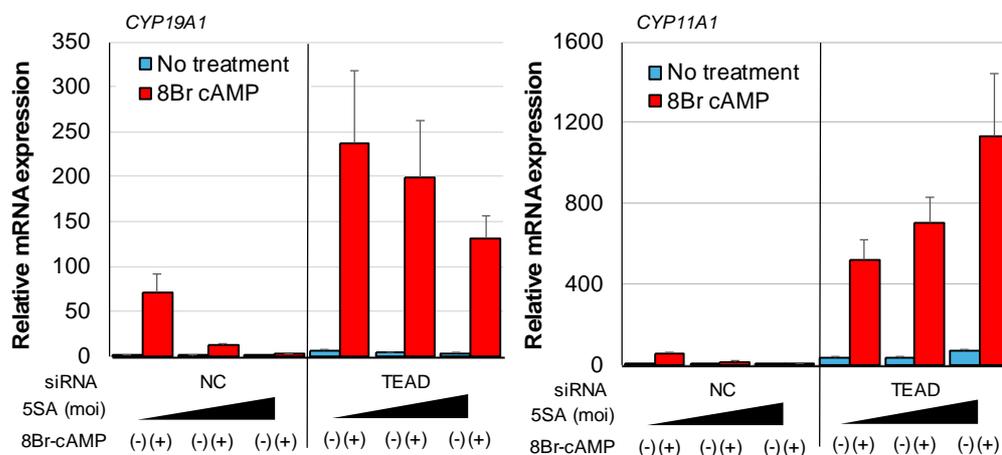


図 1 KGN 細胞における *CYP19A1* および *CYP11A1* 遺伝子の発現

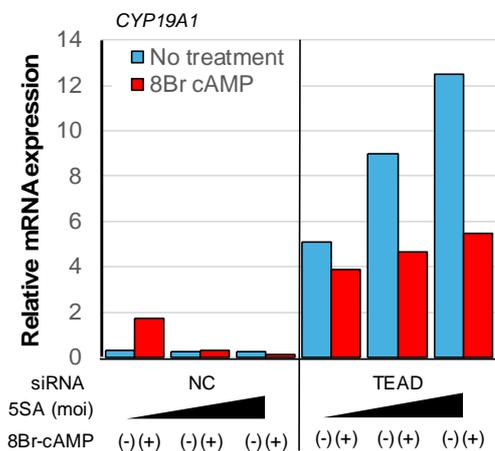


図 2 BeWo 細胞における *CYP19A1* および *CYP11A1* 遺伝子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Mizutani Tetsuya, Orisaka Makoto, Kawabe Shinya, Morichika Ririko, Uesaka Miki, Yoshida Yoshio	4. 巻 559
2. 論文標題 YAP/TAZ-TEAD is a novel transcriptional regulator of genes encoding steroidogenic enzymes in rat granulosa cells and KGN cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2022.111808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizutani Tetsuya, Orisaka Makoto, Miyazaki Yumiko, Morichika Ririko, Uesaka Miki, Miyamoto Kaoru, Yoshida Yoshio	4. 巻 28
2. 論文標題 Inhibition of YAP/TAZ-TEAD activity induces cytotrophoblast differentiation into syncytiotrophoblast in human trophoblast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 gaac032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molehr/gaac032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onuma Toshimichi, Mizutani Tetsuya, Fujita Yuko, Yamada Shizuka, Yoshida Yoshio	4. 巻 68
2. 論文標題 Copper content in ascitic fluid is associated with angiogenesis and progression in ovarian cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 126865 ~ 126865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtemb.2021.126865	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeno Mitsuo, Mizutani Tetsuya, Tsuyoshi Hideaki, Yamada Shizuka, Ishikane Shin, Kawabe Shinya, Nishimura Kengo, Yamada Masami, Miyamoto Kaoru, Yoshida Yoshio	4. 巻 67
2. 論文標題 Development of a novel and rapid measurement system for growth differentiation factor-15, progrenulin, and osteopontin in uterine sarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 91 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ18-0572	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 Orisaka Makoto, Mizutani Tetsuya, Miyazaki Yumiko, Shirafuji Aya, Tamamura Chiyo, Fujita Masayuki, Tsuyoshi Hideaki, Yoshida Yoshio	4. 巻 14
2. 論文標題 Chronic low-grade inflammation and ovarian dysfunction in women with polycystic ovarian syndrome, endometriosis, and aging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1324429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2023.1324429	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 Toshimichi Onuma, Tetsuya Mizutani, Yuko Fujita, Nobutaka Ohgami, Shoko Ohnuma, Masashi Kato, Yoshio Yoshida	4. 巻 13
2. 論文標題 Zinc deficiency is associated with the development of ovarian endometrial cysts.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Cancer Reseach	6. 最初と最後の頁 1049-1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水谷 哲也, 折坂 誠, 宮崎 有美子, 森近 梨里子, 上坂 美紀, 吉田 好雄
2. 発表標題 絨毛細胞の分化制御因子YAP/TAZ-TEADの発現とその役割
3. 学会等名 第27回日本生殖内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水谷 哲也, 折坂 誠, 宮崎 有美子, 森近 梨里子, 上坂 美紀, 吉田 好雄
2. 発表標題 絨毛細胞の分化プロセスにおけるHippoシグナル系の役割
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 靄加央梨, 大町晃, 櫻井玲依, 青木亮太, 佐藤澄恵, 中川詞雄, 内山陽介, 岡庭隼, 森田晶人, 日下田大輔, 井上真紀, 亀田高志, 岩瀬明, 水谷哲也, 安部由美子
2. 発表標題 羊膜細胞におけるActivin A産生への炎症性サイトカインの影響
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷 哲也, 前野 光生, 津吉 秀昭, 山田 しず佳, 西村 研吾, 吉田 好雄
2. 発表標題 血中GDF15, progranulin, osteopontinの測定による子宮肉腫と子宮筋腫の鑑別.
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷 哲也, 津吉 秀昭, 山田 しず佳, 吉田 好雄
2. 発表標題 子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別する新たなバイオマーカーの同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷 哲也, 河邊 真也, 折坂 誠, 森近 梨里子, 山田 雅己, 吉田 好雄, 宮本 薫
2. 発表標題 シグナル伝達系Hippo pathwayによるステロイド代謝酵素の発現調節
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷 哲也, 前野 光生, 津吉 秀昭, 山田 しず佳, 西村 研吾, 吉田 好雄
2. 発表標題 子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別するバイオマーカーの同定と新たな測定法の開発
3. 学会等名 第8回婦人科がんバイオマーカー研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷 哲也, 前野 光生, 津吉 秀昭, 山田 しず佳, 西村 研吾, 吉田 好雄
2. 発表標題 子宮肉腫と子宮筋腫を鑑別する新たな因子GDF15, progranulin, osteopontin
3. 学会等名 第3回日本サルコーマ治療研究学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 水谷 哲也, 森近梨里子
2. 発表標題 顆粒膜細胞におけるYAP/TAZ-TEADを介したステロイド代謝酵素遺伝子の発現調節メカニズム
3. 学会等名 第96回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安部由美子, 小川典子, 佐藤澄恵, 櫻井玲依, 青木亮太, 水谷 哲也
2. 発表標題 マウス羊水中のインヒピン、アクチピン
3. 学会等名 第47回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------