

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16352

研究課題名(和文) 発癌促進因子YAPに着目した核内受容体CAR依存的な肝発がんの機序及び種差の解明

研究課題名(英文) Identification of the molecular mechanism of nuclear receptor CAR-mediated liver carcinogenesis and its species differences.

研究代表者

志津 怜太 (Shizu, Ryota)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：50803912

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)：本研究では、核内受容体CARの活性化に伴う肝発がんプロモーション作用の分子機序及び種差を明らかにするため、組換えタンパク質を用いたインビトロ相互作用解析および遺伝子改変マウスを用いたインビボ解析を行った。その結果、マウスCARは発がん関連タンパク質であるYAPのWWドメインと呼ばれる領域と相互作用し、YAPの活性化を介して肝細胞増殖を誘導するが、ヒトCARはこの相互作用部位が変異しており、YAPを活性化せず、肝細胞増殖も誘導しないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質の齧歯動物を用いた発がん性試験において、核内受容体CARの活性化に伴う肝発がんが認められる。これはヒトでは起こらないとされているが、その分子機序が明確ではないため、CARの活性化が実際にヒトにおいて肝がんを引き起こすか否かは明らかではない。化学物質による発がん性は、医薬品や農薬等、新規化学物質の開発中止の原因になりうる重要な情報であるにも関わらず、このようなヒト外挿性の曖昧さは安全性の観点から問題である。齧歯動物におけるCAR依存性肝発がんの分子機序、種差の原因を明らかにした本研究成果は、化学物質の安全性を考慮する上で非常に有益な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Hepatic nuclear receptor CAR promotes hepatocyte proliferation and hepatocarcinogenesis in rodents. In this study, we have investigated the molecular mechanism of CAR-dependent hepatocyte proliferation and its species difference between human and rodents. Recently, we found nuclear accumulation of YAP was important for the CAR-dependent hepatocyte proliferation. Pull-down assay suggested that mouse CAR interacted with YAP but human CAR did not. With this assay, we found the WW domain in YAP as an interaction interface. WW domains are reported to interact with a specific amino acid sequence PPTY (PY motif) and mouse CAR contain the motif (PPAY) but human CAR has the mutated motif (PPAH). In this study, we found that mouse CAR interacted with YAP via the PY motif-WW domain interaction and activated YAP to induce hepatocyte proliferation. The absence of the PY motif in human CAR may result in the lack of interaction with YAP and thus CAR-dependent hepatocyte proliferation.

研究分野：化学発がん

キーワード：核内受容体 CAR 化学発がん 種差 肝細胞増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核内受容体 CAR は肝に高発現し、多種多様な化学物質により活性化され、薬物代謝酵素等の転写誘導を介して肝における異物除去に働いている。一方で CAR の活性化は齧歯動物において肝細胞増殖及び肝がんプロモーション作用を示すことも知られている。そのため、医薬品や農薬などの開発候補品が CAR を活性化すると開発時に実施される発がん性試験において肝がんが生じる。これまでの知見から、CAR 依存的な酵素誘導作用に種差はないが、CAR 依存的な肝がんプロモーション作用には種差が存在し、齧歯動物を用いた発がん性試験の陽性物質でも、ヒトでは肝がんを引き起こさないとされている。しかし、その分子基盤は明らかになっておらず、本当に CAR 活性化がヒトにおいて肝がんを引き起こすか否かは明確ではない。齧歯動物を用いた発がん性試験は、創薬の最終段階で行われる非臨床試験であり、この試験で認められた肝がん、ヒト外挿性があるか否かの科学的判断は、医薬品開発において非常に重要な決定となる。以上のことから我々は、CAR 依存的な肝がん機序の解明を目指して研究を進め、肝がんプロモーション作用に重要な CAR 依存的な肝細胞増殖に、発がん関連タンパク質である YAP が重要な役割を果たすことを明らかにした (Abe et al, Toxicol Sci, 2018, 165(2), 408-419)。YAP は、肝がん発症において非常に重要な因子であり、siRNA によるマウス肝 YAP のノックダウンや YAP ヘテロ欠損型マウスでは、肝がん発生率が著しく低下することが知られている。

2. 研究の目的

我々は最近、マウス肝において、CAR が YAP と結合し、YAP の核移行を促進させ、その標的遺伝子の発現を亢進させることを見出した。さらに、組換えタンパク質を用いた相互作用解析において、マウスの CAR と YAP は相互作用するが、ヒトの CAR と YAP は相互作用しない結果を得た。以上のことから、ヒト及び齧歯動物間の CAR 依存的な肝細胞増殖の種差、すなわち CAR 依存的な肝がんの種差は、CAR と YAP の相互作用が重要な決定因子となっていると考えられた。そこで、この仮説の検証により、CAR 依存的な肝がんのヒト-齧歯動物間の種差を決定する分子機序を明確にすることを目的とした。本研究成果は、齧歯動物を用いた発がん性試験における CAR 依存的な肝がんのヒト外挿性の有無を決定する分子基盤を同定するものであり、化学物質の安全性を評価する上で非常に重要な情報を提供すると期待される。

3. 研究の方法

3.1. 組換えタンパク質を用いた YAP と CAR の相互作用解析

マウス及びヒト CAR (mCAR, hCAR) の組換えタンパク質は、His タグおよび SUMO の融合タンパク質として大腸菌から調製した。マウス及びヒト YAP (mYAP, hYAP) は、小麦胚芽由来のインビトロ転写翻訳システムにより調製し、Ni-NTA アガロースを用いたプルダウンアッセイにより CAR と YAP の相互作用を調べた。mCAR と mYAP の相互作用部位を明らかにするため、段階的にドメインを欠損させた mYAP タンパク質を調製し、プルダウンアッセイにより CAR との相互作用を調べた。mCAR PY モチーフ (PPAY のアミノ酸配列) を hCAR 型 (PPAH) に変異させたヒト化変異体 (mCAR Y150H)、hCAR に mCAR 型 PY モチーフを導入した変異体 (hCARH140Y) について YAP との相互作用を調べた。

3.2. YAP と CAR の相互作用を介した、YAP 活性化機序の解析

CAR による YAP の活性化機序を明らかにするために、YAP/TEAD 複合体の結合 DNA 配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド、YAP 及び CAR の発現プラスミドを用い、HepG2 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。上述の mCARY150H、hCARH140Y についても同様にレポーターアッセイで YAP に対する影響を評価した。

3.3. CARY150H 変異マウスを用いた肝細胞増殖の解析

CAR をコードする Nr1i3 遺伝子 (Nr1i3/XM_011238744.2/XP_011237046.1) の第 5 エキソン 5'-CCTCCGGCCTATCTG... (アミノ酸配列、PPAYL...) の Tyr150 に対応するコドン TAT の第一塩基を T C へと一塩基変異させることで、His に対応するコドン CAT に変異させた。これにより mCAR の PY モチーフを hCAR 型 (PPAH) に変異させた遺伝子改変マウス (CARY150H 変異マウス) を作製した。CARY150H 変異マウスおよび野生型マウスにフェノバルビタールを 100 mg/kg/day で三日間腹腔内投与し、最終投与 24 時間後の肝細胞増殖について、肝細胞増殖マーカーである抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織染色、定量的逆転写 PCR による細胞増殖関連遺伝子や YAP 標的遺伝子等の発現レベルにより解析した。

3.4. NZW rabbit を用いた肝細胞増殖の解析

Rabbit CAR は PY モチーフを有するが、CAR 活性化依存的な肝細胞増殖の報告はない。そこで雄性 NZW rabbit にフェノバルビタールを 1000 ppm で 5 日間給水投与し、肝について肝細胞増殖マーカーである抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織染色、定量的逆転写 PCR による細胞増殖関連遺伝子等の発現レベルにより解析した。

4. 研究成果

4.1. 組換えタンパク質を用いた YAP と CAR の相互作用解析

Ni-NTA アガロースを用いたプルダウンアッセイにより CAR と YAP の相互作用を調べたところ、mCAR は mYAP と相互作用するが、hCAR は hYAP と相互作用しない結果を得た。この CAR と YAP の相互作用の種差は、HepG2 細胞を用いた哺乳動物ツーハイブリッドアッセイによる相互作用解析においても同様であった。次いで、mCAR と mYAP の相互作用部位を明らかにするため、段階的にドメインを欠損させた mYAP タンパク質について、プルダウンアッセイにより CAR と YAP の相互作用を調べたところ、WW ドメインの欠損によって mYAP と mCAR の相互作用が消失する結果を得た。そこで、His タグ及び SUMO タグを付与した WW ドメインを調製し、HA タグを付与した mCAR 及び hCAR との相互作用を調べたところ、予想通り、mCAR は WW ドメインと相互作用し、hCAR はしなかった。WW ドメインは、YAP の他タンパク質との相互作用部位として知られ、PY モチーフと呼ばれる PPXY (X は任意のアミノ酸) とアミノ酸配列と特異的に相互作用することが知られている。アポトーシスや細胞増殖を調節する SMAD や AMOT 等のタンパク質をはじめ、YAP と相互作用することが報告されている多くのタンパク質が PY モチーフを有し、この領域を介して YAP と相互作用することが報告されている。そこで、mCAR のタンパク質構造について PY モチーフを探索したところ、mCAR はそのタンパク質 3 次元構造の表面側に PPAY のアミノ酸配列を有することが明らかになった。さらにこの領域はラット、ハムスター、ウサギ等の動物では保存されているが、hCAR は PPAH と異なっているため PY モチーフを有さないことが示された。したがって、この PY モチーフの違いが、上述の CAR と YAP の相互作用の種差、ひいてはヒト-齧歯動物間における肝発がん性の種差の原因となる可能性があると思われる。hCAR にアミノ酸変異によりマウス型の PY モチーフを導入した変異体 hCARH140Y を作製し、プルダウンアッセイにより YAP との相互作用を調べたところ、hCAR と YAP の相互作用あるいは、hCAR と WW ドメインとの相互作用を明らかに増加させた。さらに mCAR の PY モチーフをヒト型に変異させた変異体 mCARY150H を作製し、哺乳動物ツーハイブリッドアッセイにより YAP との相互作用を調べたところ、Y150H 変異は mCAR と YAP の相互作用を抑制させた。以上より、CAR は PY モチーフを介して YAP と相互作用し、PY モチーフに mCAR-hCAR 間で種差があること、CAR 依存的な肝細胞増殖および肝発がんの種差は、PY モチーフの一アミノ酸の差異による可能性が示された。

4.2. YAP と CAR の相互作用を介した、YAP 活性化機序の解析

CAR の YAP 活性化への影響を、YAP/TEAD 応答配列を用いたレポーターアッセイにより解析したところ、YAP 依存的なレポーター活性の増加は、mCAR の共発現および mCAR の活性化薬である TCPOBOP の投与で増加した。一方で hCAR の共発現および hCAR の活性化薬である CITCO の投与は YAP 依存的なレポーター活性の増加に影響しなかった。mCARY150H 変異体も同様に解析したところ、mCARY150H 変異体は hCAR と同様に YAP 依存的なレポーター活性に影響を与えなかった。以上より、mCAR は PY モチーフを介して YAP の活性化を誘導することが明らかになった。

4.3. CARY150H 変異マウスを用いた肝細胞増殖の解析

上述の解析より、mCAR は PY モチーフを介して YAP と相互作用し、YAP の核内移行と標的遺伝子の転写を誘導することが示唆された。そこで CRISPR/Cas9 により CARY150H 変異を導入した遺伝子改変マウスを作製し、同マウスに CAR 活性化薬であるフェノバルビタールを投与し、CAR PY モチーフを介した YAP との相互作用の肝細胞増殖へ影響を調べた。

肝における CAR の標的遺伝子である *Cyp2b10* mRNA レベルはフェノバルビタールの投与により、野生型及び CARY150H 変異マウスのいずれにおいても同程度の増加が確認され、CAR の活性化が確認された。一方で、相対肝重量は、野生型においてはフェノバルビタールの投与により増加し、CAR 活性化依存的な肝細胞増殖が確認されたが、CARY150H 変異マウスでは増加しなかった。さらに、肝切片の免疫組織染色における Ki-67 陽性細胞数、細胞増殖関連遺伝子 mRNA レベルもフェノバルビタールの投与により、野生型において増加したが、CARY150H 変異マウスでは増加しなかった。さらに核内 YAP レベル、YAP 標的遺伝子 mRNA レベルについても、野生型マウスではフェノバルビタール投与と依存的に増加が確認されたが、変異マウスでは増加が認められなかった。以上より、mCAR は PY モチーフを介した YAP との相互作用により YAP の核内移行、YAP 標的遺伝子の発現増加により、肝細胞増殖を誘導することが明らかになった。hCAR は PY モチーフを有していないため、YAP と相互作用せず、肝細胞増殖が誘導されないことが明らかになった。

4.4. NZW rabbit を用いた肝細胞増殖の解析

雄性 NZW rabbit にフェノバルビタールを 1000 ppm で 5 日間給水投与したところ、PB 投与に伴って相対肝重量が増加した。免疫組織染色の結果、細胞増殖マーカーである PCNA 陽性細胞数は PB 投与により明らかに増加した。さらに細胞周期関連遺伝子である *CCNB1* および *FOXM1* mRNA レベルも PB 投与に伴い増加が確認された。以上より、予想通り、PY モチーフを有する rabbit CAR の活性化は肝細胞増殖を誘導することが示唆された。

以上の解析により CAR 依存的な肝細胞増殖のヒト-齧歯動物間の種差の原因を見出した。本研究結果は、化学物質の安全性評価における発がん性試験において、非常に重要な知見となるだけでなく、「肝異物代謝を担う核内受容体の化学物質による活性化」及び「肝がんを誘発する細胞増殖等の肝細胞シグナルを制御する YAP の活性化」という以前は無関係と思われていた両シグナ

ルの関連を示すことで、肝細胞研究において新しい知見を提供した。

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 0件）

1. 著者名 Shizu Ryota, Ishimura Mai, Nobusawa Sumihito, Hosaka Takuomi, Sasaki Takamitsu, Kakizaki Satoru, Yoshinari Kouichi	4. 巻 95
2. 論文標題 The influence of the long-term chemical activation of the nuclear receptor pregnane X receptor (PXR) on liver carcinogenesis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 1089 ~ 1102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00204-020-02955-4	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 Shizu Ryota, Yoshinari Kouichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Nuclear receptor CAR-mediated liver cancer and its species differences	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology	6. 最初と最後の頁 343 ~ 351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17425255.2020.1746268	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7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryota Shizu, Taiki Abe, Keiichiro Sobe, Mai Ishimura, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari
2. 発表標題 Interaction with YAP is a possible underlying mechanism for CAR-dependent hepatocarcinogenesis.
3. 学会等名 ISSX2019: 12th international ISSX meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota Shizu
2. 発表標題 The role of YAP in CAR dependent hepatocyte proliferation.
3. 学会等名 フォーラム2019衛生薬学・環境トキシコロジー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石村麻衣、志津怜太、曾部圭一郎、江崎香奈子、保坂卓臣、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 フェノバルビタールによる肝発がんへの PXR 活性化の影響
3. 学会等名 フォーラム2019衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryota Shizu, Taiki Abe, Keichiro Sobe, Mai Ishimura, Yuto Amaike, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari
2. 発表標題 Interaction between CAR and YAP is a possible underlying mechanism of phenobarbital-dependent hepatocarcinogenesis and its species difference.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia meeting on Liver, Biology, Diseases & Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋真帆、志津怜太、保坂卓臣、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 肝細胞肥大を誘発する薬物の核内受容体活性化能の解析
3. 学会等名 第2回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志津怜太、石村麻衣、信澤純人、保坂卓臣、佐々木崇光、柿崎暁、吉成浩一
2. 発表標題 化学物質によるPXR活性化のマウス肝発がんへの影響解析
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志津怜太、吉成浩一
2. 発表標題 PXR活性化の肝化学発がんへの影響の理解と機序解析
3. 学会等名 第3回医薬品毒性機序研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野
<https://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/eisei/page4.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
研究協力者	吉成 浩一 (Yoshinari Kouichi) (60343399)	静岡県立大学・薬学部・教授 (23803)	

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