

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03381

研究課題名(和文)細胞張力を制御するHippo-YAPシグナル経路の肝発生・再生における役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the roles of the Hippo-YAP signaling pathway in regulating cell tension in liver development and regeneration

研究代表者

仁科 博史(Nishina, Hiroshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：60212122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓は、細胞増殖や細胞分化を経て、一定サイズの三次元(3D)構造を形成する。我々は上皮を含む組織が扁平になるメダカ変異体が単離し、本変異体の解析から、転写共役因子YAPが細胞張力を介して3D器官形成に必須の役割を果たしていることが明らかになった。また、イヌ腎上皮細胞MDCKにYAPを過剰発現させると、隣接細胞に圧力が誘導され、YAP発現細胞が頂端面に押し出されることを見出した。そこで、我々はFRETプローブを利用することで、物理力の可視化を試みた。その結果、時間依存的にMDCK細胞2細胞間にFRETが誘導されることを見出した。すなわち、排除される2細胞間に生じる圧力の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写共役因子YAPは様々ながんの発症や悪性化に関与することが指摘されているが、その分子機構については不明な点が多い。実際、ヒト癌においてYAP遺伝子変異の報告は多くなく、どのように病態に関与しているかは国内外を通じて課題となっている。本研究結果から、この理由の一つとして、これまでの細胞生物学では検出が困難であった細胞間張力の制御が考えられる。すなわち、YAP依存性の細胞間張力制御機構の解明は発がん機構の解明の一端を解明に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The liver forms three-dimensional (3D) structures of a certain size through cell proliferation and cell differentiation. We have isolated a medaka mutant in which tissues including epithelium become flattened, and analysis of this mutant revealed that the transcriptional co-activator YAP plays an essential role in 3D organogenesis via cell tension. We also found that overexpression of YAP in canine renal epithelial cells MDCK induced pressure in neighboring cells and pushed YAP-expressing cells to the apical surface. Therefore, we attempted to visualize the physical forces by utilizing a FRET probe (mCherry-spider silk protein-EGFP containing the basic structure). We found that FRET was induced between two MDCK cells in a time-dependent manner. Thus these results indicate the existence of the pressure generated between two cells to be eliminated.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：肝臓 細胞排除 細胞間張力 YAP

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、内胚葉由来の前腸の特定領域に幹細胞である肝芽細胞が発生し、細胞増殖と分化を経て、一定サイズの三次元(3D)器官に成長する。国内外を通じて、肝サイズや3D構造を制御する分子機構の解明が重要課題となっている。我々は、これら問題を解決する目的で、小型魚類メダカを用いた大規模な肝形成不全変異体のスクリーニングを行った。その結果、“肝臓が小さな緋扇(*hiohgi*)”変異体や、“上皮を含む組織が扁平になるヒラメ(*hirame*)”変異体が単離された(*Mech Dev* 2004)。これら変異体の解析から、肝サイズの制御にレチノイン酸シグナルが重要であること(*Hepatology* 2010)、転写共役因子 YAP が細胞張力を介して 3D 器官形成に必須の役割を果たしていること(*Nature* 2015)が明らかになった。また、国外の研究グループは、マウス肝臓で YAP を過剰発現させたり、上流の Hippo シグナルを破綻させると、肝細胞は増殖し、肝臓は肥大し、肝臓がんが発症することを報告した(Dong et al. *Cell* 2007; Lu et al. *PNAS* 2010)。さらに、我々は、イヌ腎上皮細胞 MDCK に YAP を過剰発現させると、隣接細胞に圧力が誘導され、YAP 発現細胞が頂端面に押し出されることを見出した(*Scientific Reports* 2016)。すなわち、Hippo-YAP シグナルは細胞増殖や細胞張力を介して、肝臓のサイズや 3D 構造を制御することが示唆された。しかしながら、Hippo-YAP シグナルが、如何にして肝細胞の増殖と張力を制御して、器官サイズや 3D 構造の形成を実現しているかという問題は未解明のままである。こうした背景を踏まえ、申請者は、肝発生および再生時における YAP とそのパラログである TAZ の役割解明と、3D 肝臓内の細胞張力の測定と可視化が喫緊の課題であるとの認識に至った。

2. 研究の目的

本研究では、肝臓の三次元(3D)器官形成のメカニズムを、Hippo-YAP シグナル伝達経路や細胞張力の観点から解明することを目的とする。申請者はこれまでに、組織が扁平になるメダカ変異体(*hirame*)を単離し、転写共役因子 YAP が細胞張力の制御を介して、3D 器官形成に必須の役割を果たすことを報告してきた。また興味深いことに、Hippo-YAP シグナルはマウスの肝臓サイズや肝臓がん発症を制御することが示されている。課題 1: 肝臓特異的に YAP とそのパラログ TAZ を欠損するマウスを作出し、細胞張力制御の観点から、肝発生および肝再生における YAP/TAZ の役割を解析する。課題 2: 実績のある張力バイオセンサーをメダカの全身および肝臓特異的に発現し、細胞張力を可視化し、細胞張力マップを作成する。また、*hirame* 変異体の細胞張力も本張力バイオセンサーで解析する。

3. 研究の方法

課題 1: 肝臓特異的 YAP および TAZ 欠損マウスの作出と解析

(1-1) YAP および TAZ の全身性欠損マウスは胎生致死となることから、肝臓のみでこれらの遺伝子を破壊する実験を行う。既に入手済みの *yap(flox/flox)*, *taz(flox/flox)*, *yap(flox/flox) taz(flox/flox)* マウスを、肝臓特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Albumin-Cre トランスジェニックマウスと交配し、肝臓特異的に YAP あるいは TAZ、さらに YAP と TAZ を二重に欠損するマウスを作出する。発生期の肝

臓形成に影響があるか否かを、肝臓サイズ、肝臓の形態、および肝臓の張力（ピペット吸引法）の観点から解析する。

（1-2）YAP または TAZ の機能障害が再生時の肝臓形成に影響を与えるか否かを、*yap(flox/flox)*, *taz(flox/flox)*, *yap(flox/flox) taz(flox/flox)* マウスに、Cre 発現アデノウイルスを感染後、70%部分肝切除を行い、検討する。（1）と同様に、肝臓サイズ、肝臓の形態、および肝臓の張力を解析する。（1）と（2）の結果を検討し、発生および再生時の3D肝形成におけるYAP/TAZの役割を明らかにする。課題2：張力バイオセンサー発現トランスジェニックメダカを用いた細胞張力の可視化系の確立と細胞張力マップの作成

（2-1）既に入手済みである実績のある張力バイオセンサーを用いる（Grashoff et al. Nature 2010）。クモ糸タンパク質の両端に2種類の蛍光タンパク質を付加した構造になっており、張力負荷に伴い両端の蛍光タンパク質の距離が離れるために、蛍光の減少という形で張力変化を検出できる。メダカの全身あるいは肝臓特異的に発現するプロモーター支配下に張力バイオセンサーを発現するトランスジェニックメダカを作出する。

（2-2）（1）で作出したトランスジェニックメダカを用いて、細胞張力の可視化系を確立する。運動が激しく、細胞張力が激しく変化すると考えられる原腸期のメダカ胚を用いて、条件検討を行う。透明なメダカ胚をゲル内に固定し、FRETを定量化し、可視化系を確立する。

II. 研究計画・方法（令和3年度以降）

令和2年度に未了の項目を継続して解析するとともに、以下の項目へと研究を進展させる。

課題2（2-3）（1）で作出した全身性および肝臓特異的に張力バイオセンサーを発現する透明度の高いトランスジェニックメダカを用いて、（2）で確立した条件で、器官形成期の肝臓および各器官の細胞張力マップを作成する。

（2-4）YAPを欠失し細胞張力が低下している *hirame* 変異体も本張力バイオセンサーを用いて解析し、野生型と比較検討する。*hirame* はピペット吸引法で、神経管の細胞張力が低下していることが明らかとなっているが、他の領域については未解析である。張力バイオセンサーを用いることで、個体内の他の領域の細胞張力についても明らかにする。

以上の結果を総合して、細胞張力と肝臓を含む器官形成との関係、また、細胞張力制御におけるYAPが果たす役割についても考察し、原著論文に報告する。

4. 研究成果

肝臓特異的にYAPと活性化するマウスを作出すると、肝臓は5倍程度の肥大化が誘導された。1ヶ月以上のYAP活性化状態にすると、肝細胞がんと胆管がんの混合のがん発症が誘導された。また、モザイク状のYAPの活性化状態でも肝臓のサイズの亢進が観察された。既存の蛍光を利用した張力プローブでは肝臓に誘導される張力の測定は困難であった。

イヌ腎上皮細胞MDCKにYAPを過剰発現させると、隣接細胞に圧力が誘導され、YAP発現細胞が頂端面に押し出されることを見出した。そこで、我々はアクチン結合タンパク質であるActininの特性を有するFRETプローブ（mCherry クモ糸タンパク質 EGFP

を基本構造を含む)を利用することで、物理力の可視化を試みた。その結果、時間依存的にMDCK細胞2細胞間にFRETが誘導されることを見出した。排除される2細胞間に生じる圧力の可能性が示唆された。本年度には、上記の物理的力を生じるために必要なシグナル経路の探索を行い、YAPがホスファチジルコリン代謝の酵素の発現量調節を介してプロスタグランジンE2放出を制御している可能性を見出した。この研究成果を英文原著論文にまとめた。

マウス肝臓においても、YAP依存的に障害肝細胞が排除されることを見出した。すなわち、Hippo-YAPシグナルは、細胞増殖や細胞張力などの細胞応答を介して、肝臓のサイズや肝臓の品質を制御することが示唆された。

これら研究成果を基盤として、細胞張力を生じるシグナル伝達経路の解明と、蛍光の変化という形でマウスの肝臓でも張力変化を検出できるプローブの開発を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Sunaga Sachi, Kofuji Satoshi, Nishina Hiroshi	4. 巻 572
2. 論文標題 YAP drives cell competition by activating choline metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 178 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.07.101	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 Nagashima Shunta, Maruyama Junichi, Honda Kaori, Kondoh Yasumitsu, Osada Hiroyuki, Nawa Makiko, Nakahama Ken-ichi, Ishigami-Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Sugimura Haruhiko, Iwasa Hiroaki, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Nishina Hiroshi, Hata Yutaka	4. 巻 297
2. 論文標題 CSE1L promotes nuclear accumulation of transcriptional coactivator TAZ and enhances invasiveness of human cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100803 ~ 100803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100803	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 Jiang Xinliang, Maruyama Junichi, Iwasa Hiroaki, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Nishina Hiroshi, Hata Yutaka	4. 巻 399
2. 論文標題 Heat shock induces the nuclear accumulation of YAP1 via SRC	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112439 ~ 112439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112439	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 Nakatani Keisuke, Maehama Tomohiko, Nishio Miki, Otani Junji, Yamaguchi Keiko, Fukumoto Miki, Hikasa Hiroki, Hagiwara Shinji, Nishina Hiroshi, Mak Tak Wah, Honma Teruki, Kondoh Yasumitsu, Osada Hiroyuki, Yoshida Minoru, Suzuki Akira	4. 巻 112
2. 論文標題 Alantolactone is a natural product that potently inhibits YAP1/TAZ through promotion of reactive oxygen species accumulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4303 ~ 4316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15079	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 該当する

1. 著者名 Ishihara Erika, Nagaoka Yuya, Okuno Toshiaki, Kofuji Satoshi, Ishigami Yuasa Mari, Kagechika Hiroyuki, Kamimura Kenya, Terai Shuji, Yokomizo Takehiko, Sugimoto Yukihiko, Fujita Yasuyuki, Suzuki Akira, Nishina Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Prostaglandin E ₂ and its receptor EP2 trigger signaling that contributes to YAP mediated cell competition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 197 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12750	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 Omori Hirofumi, Nishio Miki, Masuda Muneyuki, Miyachi Yosuke, Ueda Fumihito, Nakano Takafumi, Sato Kuniaki, Mimori Koshi, Taguchi Kenichi, Hikasa Hiroki, Nishina Hiroshi, Tashiro Hironori, Kiyono Tohru, Mak Tak Wah, Nakao Kazuwa, Nakagawa Takashi, Maehama Tomohiko, Suzuki Akira	4. 巻 6
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 Science Advances	6. 最初と最後の頁 3324
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 該当する

1. 著者名 Kamimura Kenya, Yokoo Takeshi, Abe Hiroyuki, Sakai Norihiro, Nagoya Takuro, Kobayashi Yuji, Ohtsuka Masato, Miura Hiromi, Sakamaki Akira, Kamimura Hiroteru, Miyamura Norio, Nishina Hiroshi, Terai Shuji	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of Diphtheria Toxin-Based Gene Therapy for Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 472 ~ 472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12020472	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 Miki, To Yoko, Maehama Tomohiko, Aono Yukari, Otani Junji, Hikasa Hiroki, Kitagawa Akihiro, Mimori Koshi, Sasaki Takehiko, Nishina Hiroshi, Toyokuni Shinya, Lydon John P., Nakao Kazuwa, Wah Mak Tak, Kiyono Tohru, Katabuchi Hidetaka, Tashiro Hironori, Suzuki Akira	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 Science	6. 最初と最後の頁 3576 ~ 3587
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 -

1. 著者名 Shimizu Takanobu, Nakamura Takeshi, Inaba Hironori, Iwasa Hiroaki, Maruyama Junichi, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Nakata Takao, Nishina Hiroshi, Hata Yutaka	4. 巻 295
2. 論文標題 The RAS-interacting chaperone UNC119 drives the RASSF6?MDM2?p53 axis and antagonizes RAS-mediated malignant transformation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11214 ~ 11230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012649	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 Hanzawa Nozomi, Hashimoto Koshi, Yuan Xunmei, Kawahori Kenichi, Tsujimoto Kazutaka, Hamaguchi Miho, Tanaka Toshiya, Nagaoka Yuya, Nishina Hiroshi, Morita Sumiyo, Hatada Izuho, Yamada Tetsuya, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeted DNA demethylation of the Fgf21 promoter by CRISPR/dCas9-mediated epigenome editing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62035-6	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 Kodaka Manami, Mao Fengju, Arimoto-Matsuzaki Kyoko, Kitamura Masami, Xu Xiaoyin, Yang Zeyu, Nakagawa Kentaro, Maruyama Junichi, Ishii Kana, Akazawa Chihiro, Oyaizu Takuya, Yamamoto Naoki, Ishigami-Yuasa Mari, Tsuemoto Nozomi, Ito Shigeru, Kagechika Hiroyuki, Nishina Hiroshi, Hata Yutaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of a novel compound that promotes myogenesis via Akt and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) in mouse C2C12 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 231265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231265	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 仁科 博史	4. 巻 274
2. 論文標題 Hippo-YAPシグナル経路を介した異常細胞の排除	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 451-455
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 無
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 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 仁科 博史
2. 発表標題 異常細胞排除機構を利用した 先制医療法の開発
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会 創薬科学・臨床薬学のニューノーマル（新常态）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Nishina
2. 発表標題 Scaling mechanism of animal body and organ sizes
3. 学会等名 The 94th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科 博史
2. 発表標題 肝臓の形成と恒常性維持
3. 学会等名 第35回肝臓洞壁細胞研究会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁科博史
2. 発表標題 JNKシグナル経路が制御する多様な生理機能
3. 学会等名 日本Cell Death学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁科博史
2. 発表標題 脊椎動物の3D器官形成と維持
3. 学会等名 新潟大学消化器内科学サイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁科博史
2. 発表標題 細胞競合と肝臓癌
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Nishina
2. 発表標題 The Hippo-YAP pathway regulates 3D liver formation and liver homeostasis
3. 学会等名 HIGO program seminar, Kumamoto University（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究 分担者	小藤 智史 (Kofuji Satoshi) (00508153)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・講師 (12602)	

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