

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07590

研究課題名（和文）配列特異的翻訳抑制蛋白質によるHippo-YAP経路の制御

研究課題名（英文）Posttranscriptional mechanism of Hippo pathway regulation

研究代表者

大谷 淳二 (Otani, Junji)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：10770878

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）：本研究は、がん細胞の増殖を促進する転写共役因子YAPと転写因子TEADの活性化を阻害するための新しい薬剤標的を同定することを目的としている。YAP-TEADによる遺伝子転写の活性を高感度に測定する細胞株を用いて、全ゲノムのsiRNAライブラリースクリーニングを行った。その結果、mRNAの転写後調節因子であるRNABPがYAP-TEADの転写活性を強力に活性化し、がん細胞の増殖、浸潤、遊走に寄与することが明らかになった。RNABPはYAP阻害因子であるVGLL4の発現を抑制することでYAP-TEADを活性化する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

Hippo-YAP経路は、がんの重要なドライバー経路であることが明らかになりつつある。本研究では1分子の発現抑制により最も強くYAP-TEADによる転写活性を阻害する遺伝子を同定し、そのYAP-TEADへの作用機序の解明、阻害剤開発によって癌撲滅に貢献することを目指したものである。本研究から、mRNAの転写後調節機構が細胞の運命決定に重要な役割を持っていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：This study aims to identify novel drug targets to inhibit the activation of the transcription coactivators YAP and transcription factor TEAD, which promote cancer cell growth. Whole genome siRNA library screening was performed using cell lines with high sensitivity for the activity of oncogenic gene transcription by YAP-TEAD. The results revealed that RNABP, a post-transcriptional regulator of mRNA, potently activates the transcriptional activity of YAP-TEAD and contributes to cancer cell proliferation, invasion, and migration. RNABP activates YAP-TEAD by suppressing the expression of VGLL4, a YAP inhibitor.

研究分野：生物学

キーワード：Hippo経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くのがんで転写共役因子 YAP とそのパラログ TAZ の異常な活性化が見られ、その活性を抑制する Hippo 経路の構成因子欠損マウスで腫瘍が形成されることから、Hippo-YAP 経路は、がんの重要なドライバー経路であることが明らかになっている (Nishio M., et. al., Genes Cells, 2017)。最近、Ras 経路の活性化型変異を持つがん細胞株における Ras 経路阻害耐性の獲得に、YAP の活性化が重要であることが相次いで報告され、Hippo-YAP 経路は、Ras 経路に対する分子標的薬との併用治療の標的としても期待されている。Hippo 経路はリン酸化酵素である MST1/2, LATS1/2 を中心としたリン酸化カスケード経路であり、細胞の足場環境、増殖因子、栄養状態などを感知し、YAP/TAZ の蛋白質安定性、細胞内局在を制御することで、YAP/TAZ と DNA 結合蛋白質 TEAD の複合体による遺伝子転写活性を調節している。TEAD には4種類のパラログ分子があり、YAP/TAZ に加え10種類以上の分子が TEAD の転写活性を調節する。さらに YAP/TAZ は、Hippo 経路に加えて、EGFR-MAPK 経路、各種 GPCR 刺激、ROS、インテグリンなど数多くの経路によって調節される。これらのことから、1分子を抑制しても他の分子や経路の代償をうけるために概して強力な抑制効果を得られない。そのため、1分子抑制で TEAD による転写活性を最も強く抑制する分子を探索することが、YAP-TEAD 標的薬開発の重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究は YAP 依存的な遺伝子転写活性の新規制御因子、新規薬剤標的を同定し、その分子機構解明、低分子阻害剤の取得により、YAP 活性を標的とした抗腫瘍薬の開発に貢献することを目的としている。

3. 研究の方法

YAP-TEAD による転写活性を高感度にモニターするレポーター遺伝子を導入した細胞株を構築し、全ゲノム siRNA ライブラリースクリーニングにより、各々分子の発現抑制による YAP-TEAD の転写活性を定量した。

4. 研究成果

(1) 翻訳抑制因子 RNABP は強力な YAP-TEAD 活性化因子である

YAP-TEAD の転写活性レポーター細胞を用いて全ゲノム siRNA スクリーニングを行った (図1)。顕著に YAP-TEAD による転写活性を抑制した siRNA の標的遺伝子セットには、既知の Hippo 経路制御分子が有意に濃縮されており、本研究のスクリーニングが十分な精度で行われたことを示していた。このスクリーニングにおいて、最も強く YAP-TEAD の転写活性を阻害したのは RNA 結合蛋白質で、mRNA の翻訳の抑制、分解に関わる転写後調節因子である RNABP に対する siRNA であった。RNABP の YAP-TEAD 活性制御における役割を確認するため、CRISPR/Cas9 を用いて RNABP 欠損細胞を作成したところ、顕著に YAP-TEAD の下流の遺伝子転写の抑制が見られ、RNABP の過剰発現を行うと YAP-TEAD の活性化がみられた。

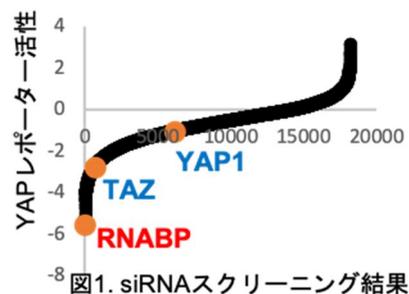


図1. siRNAスクリーニング結果

(2) RNABP はがん細胞の増殖、遊走、浸潤能に寄与する

がん細胞株における RNABP の欠損により、がん細胞の足場非依存的な増殖活性の低下が、過剰発現によりコロニー形成の亢進が観察された (図

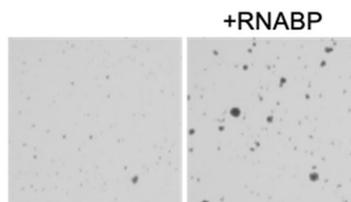


図2. RNABP過剰発現によるコロニー形成の亢進

2) また、ライブセルイメージングおよび Boyden チャンバーを用いた細胞浸潤アッセイを行い、RNABP が細胞の遊走、浸潤を活性化することを明らかにした。

(3) RNABP は標的 RNA の発現抑制を介して YAP-TEAD を活性化する

RNABP は基質 RNA に結合し、翻訳を抑制する機能が知られていた。そこで RNABP による YAP-TEAD 活性制御の分子メカニズムを明らかにするため、RNA 結合に重要なアミノ酸の点変異体を作成し、YAP-TEAD 活性化能を検討した。野生型の RNABP の過剰発現で YAP-TEAD による転写の活性化が見られたのに対して、RNA 結合表面の変異体では活性化が見られず、RNABP は RNA との相互作用を介して YAP-TEAD の活性を制御することが明らかになった。

(4) RNABP は YAP 抑制因子である VGLL4 の発現抑制を介して YAP-TEAD を活性化する

RNABP の基質を探索するため、RNABP の発現抑制による mRNA 量の変化を、マイクロアレイを用いて解析した。RNABP の発現抑制により、YAP-TEAD の抑制因子として知られている VGLL4 の mRNA 量が増加しており、RNA 免疫沈降実験から RNABP と VGLL4 の mRNA の結合が確認された。VGLL4 の蛋白質量は RNABP の欠失により増加し、過剰発現により抑制された。これらの結果から、RNABP の基質として YAP-TEAD 抑制因子である VGLL4 があることがわかった。そこで RNABP と VGLL4 を同時に欠失した細胞を作成したところ、RNABP 欠失による YAP-TEAD の阻害がみられなくなったことから、RNABP の YAP-TEAD 活性への効果は VGLL4 の翻訳阻害を介していることがわかった (図 3)。

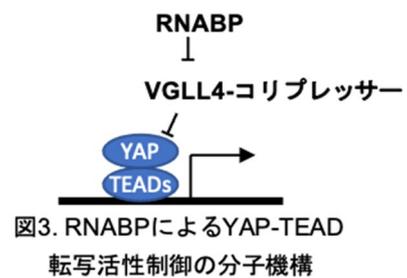


図3. RNABPによるYAP-TEAD 転写活性制御の分子機構

(5) VGLL4 は転写コリプレッサー複合体をリクルートする

VGLL4 は、YAP および TAZ と相同なペプチド領域により TEAD と結合することがわかっており、YAP-TEAD 間相互作用を競合的に阻害すると考えられていた。しかし、VGLL4 過剰発現による YAP-TEAD 間の相互作用の変化を、抗 TEAD4 抗体を用いた免疫沈降により検討したところ、変化が見られなかった。VGLL4 は転写コリプレッサーとの相互作用が知られており、TEAD と転写コリプレッサーの相互作用を仲介する可能性を検討した。VGLL4 は過剰に発現させると YAP-TEAD の転写活性を阻害するが、TEAD と結合できない変異体、転写コリプレッサーと結合できない変異体はともに転写阻害の活性を失った。また、クロマチン免疫沈降実験から、転写コリプレッサー複合体の YAP-TEAD の標的遺伝子プロモーターへの結合量が VGLL4 の過剰発現により増加することが明らかになった。以上の結果から VGLL4 は転写コリプレッサーを TEAD 結合部位にリクルートすることにより YAP-TEAD の転写活性を抑制することが示唆された (図 3)。

(6) 低分子阻害剤スクリーニングの実施に向けた RNABP-基質 RNA 間の相互作用可視化

RNABP は一分子の発現抑制で顕著な YAP-TEAD の転写活性の抑制効果がみられることから、薬剤標的として有望であると考えられる。そこで低分子阻害剤スクリーニングの実施に向け、RNABP と標的 RNA の結合を可視化する TR-FRET の実験系を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Miyachi Yosuke, Nishio Miki, Otani Junji, Matsumoto Shinji, Kikuchi Akira, Mak Tak Wah, Maehama Tomohiko, Suzuki Akira	4. 巻 26
2. 論文標題 TAZ inhibits acinar cell differentiation but promotes immature ductal cell proliferation in adult mouse salivary glands	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 714 ~ 726
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12879	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 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 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 Maehama Tomohiko, Nishio Miki, Otani Junji, Mak Tak Wah, Suzuki Akira	4. 巻 112
2. 論文標題 The role of Hippo YAP signaling in squamous cell carcinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 51 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14725	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前濱朝彦、大谷淳二、鈴木 聡
2. 発表標題 核小体オルガネラゾーンにおけるストレス制御と癌の発症進展機構
3. 学会等名 オルガネラゾーン領域会議
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回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Junji Otani, Keisuke Nakatani, Tomohiko Maehama, Miki Nishio, Akira Suzuki
2. 発表標題 A natural product Alantolactone is a potent YAP1/TAZ inhibitor via ROS production
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatase (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口慶子、西尾美希、大谷淳二、前濱朝彦、鈴木聡
2. 発表標題 Hippo-YAP/TAZ経路による肥満の制御
3. 学会等名 オルガネラゾーン若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前濱朝彦、大谷淳二、鈴木 聡
2. 発表標題 核小体オルガネラゾーンにおけるストレス制御と癌の発症進展機構
3. 学会等名 オルガネラゾーン領域会議
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
---------------------------	-----------------------	----

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