

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590267

研究課題名（和文）ヒッポ・パスウェイのオン・オフ機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of the tumor suppressive Hippo pathway

研究代表者

畑 裕 (HATA YUTAKA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80313237

研究成果の概要（和文）：腫瘍抑制ヒッポ・パスウェイはショウジョウバエからヒトまで保存されているが、ヒトではより複雑化し、とくに上流の制御機構は、ショウジョウバエとの違いが目立つ。研究当初は、既知の分子をもとに相互作用する分子を探索して、ヒトのヒッポ・パスウェイのオン・オフ機構を解明しようとした。その後、ヒッポ・パスウェイの活性をモニターするアッセイ系を構築し、ヒッポ・パスウェイの活性を亢進、抑制する化合物を探索し、得られた化合物の標的を決定することにより、オン・オフ機構を解明するアプローチを行った。その結果、 β アドレナリン受容体がヒッポ・パスウェイを活性化することを見出した。同時に、筋萎縮治療やがん転移抑制に有用な薬剤の候補化合物の入手に成功している。線虫を対象とする研究もおこなったが、線虫ではヒッポ・パスウェイの構成分子は保存されているが、全体としてヒッポ・パスウェイとしてのシグナルを形成していないことが明らかとなった。しかし、ヒトのヒッポ・パスウェイの制御分子として知られる RASSF のホモログがアクチン細胞骨格制御に関わり Ras シグナルの下流で働くことが明らかとなり、今後のヒトでの解析の新しい手掛かりを見出した。

研究成果の概要（英文）：To clarify the molecular mechanism that regulates the mammalian Hippo pathway, we first searched for molecules that functionally and physically interact with the known components such as FAT4, Merlin, RASSFs, Salvador, and MOB1. However, this attempt was not successful. We subsequently established several cell-based assay systems to monitor the activity of the Hippo pathway and searched for chemical compounds that up-regulate or down-regulate the Hippo pathway. We found that β -adrenergic stimulants up-regulate the Hippo pathway. This is the first study to report the implication of G protein-coupled receptors in the regulation of the Hippo pathway. We have additionally obtained several candidate compounds that modulate the Hippo pathway. These compounds include candidates that promote myogenesis and that inhibit cancer invasiveness and metastasis. We are currently analyzing how these compounds exhibit the effects and trying to find out new regulatory mechanisms of the Hippo pathway as well as to develop useful reagents for the treatment of muscle atrophy and cancer. We also analyzed *Caenorhabditis elegans* homologs of RASSF and YAP, both of which are the components of the Hippo pathway, and found that the Hippo pathway is not conserved in *Caenorhabditis elegans*. However the findings about *Caenorhabditis elegans* RASSF homolog has shed light on the putative function of RASSF, which may be useful for the future study in the mammalian Hippo pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：癌、シグナル伝達、キナーゼ、tumor suppressor

1. 研究開始当初の背景

ヒippo・パスウエイは、器官の大きさを制御するシグナル伝達系としてショウジョウバエで見いだされた。ヒトでも保存され、腫瘍抑制機構として機能している。ショウジョウバエのヒippo・パスウエイは、①細胞極性に関わる接着分子などの膜蛋白とその裏打ち蛋白からなる上流制御分子、②二つの蛋白リン酸化酵素とアダプター・活性制御分子からなる中核キナーゼカスケード、③転写コアクチベーターの三つのパーツから構成される。ヒippo・パスウエイが活性化すると転写コアクチベーターはリン酸化され、細胞核から細胞質に移行して、遺伝子転写が抑制される。転写コアクチベーターは細胞周期を進め、細胞死を抑制する遺伝子の転写を起こす。正常の上皮細胞では、細胞密度があがりコンフルエントな状態になるとヒippo・パスウエイが活性化して、細胞周期がとまる。DNA 損傷を起こすような傷害が加わるときも、ヒippo・パスウエイが活性化して、細胞周期がとまる。ヒippo・パスウエイが破綻すると、接触抑制、チェックポイントが働かなくなり、発がん、がんの悪化が起こる。ヒippo・パスウエイの破綻は、ヒトがん症例で高頻度に認められ、臨床的予後と相関するため、ヒippo・パスウエイの機能を補填する治療方法の開発は、がん治療に大きな意味をもち、研究開始の時点で、すでに、研究者・製薬企業の関心を集めていた。

ヒトではヒippo・パスウエイによって二つの転写コアクチベーターYAP と TAZ が制御されている。YAP は腸管、肝臓、神経の組織幹細胞の自己複製、分化制御に関わり、臓器の再生修復に重要である。TAZ は肺、腎臓の器官形成に関わり、間葉組織幹細胞の骨細胞、筋細胞への分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制する。このため、ヒippo・パスウエイは、がん研究の観点のみならず、再生医学の観点でも注目されつつあった。

ヒippo・パスウエイはショウジョウバエとヒトでよく保存されているとはいえ、ショウジョウバエで一つの分子がヒトでは複数になっている例が多い。例えば、ヒippo・パスウエイの標的となる転写コアクチベーターは、ショウジョウバエではYorkie一つだが、ヒトでは前述のようにYAP と TAZ 二つある。さらに、研究の進展により、ヒippo・パスウエイを構成する分子が、多様な分子と相互作用し、他のシグナル伝達系ともクロス・トークすることが示され、ヒトのヒippo・パスウエイはショウジョウバエで確立された枠組みを越える広がりを見せ始めていた。とくに上流制御分子については、ショウジョウバエとヒトでは差異が大きいと予測されていたが、その詳細は不明にとどまっていた。

本研究がスタートした時点では、構成分子のノックダウン、ノックアウトによる抑制実験、ヒippo・パスウエイにより負に制御される転写コアクチベーターの恒常的活性変異体の発現によって、ヒippo・パスウエイの機能不全がもたらす病態を模倣する実験が、ヒippo・パスウエイ研究の常套的手段となっていた。このような極端な条件はヒトの病態のモデルとしては必ずしも適切でない。また、ヒippo・パスウエイの過剰な機能がもたらす病態を解析する方法も確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエと異なる点が多いと予測されるヒトのヒippo・パスウエイのオン・オフのメカニズムを解明し、内在的発現レベルのヒippo・パスウエイを前提として、ヒippo・パスウエイを活性化、抑制する手法を確立し、ヒippo・パスウエイの生理的機能とその破綻によるヒト疾病の病態を解明に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

研究スタートの時点では、大きく四つの方法を計画した。

1) ヒッポ・パスウェイを構成因子のうち、上流に位置する接着分子 FAT4、裏打ち蛋白 Merlin、中核キナーゼに対してアダプターの様に機能する RASSF、Salvador、MOB1 に相互作用する分子を、免疫沈降、質量分析、酵母ツーハイブリッド法により同定する。

2) ヒッポ・パスウェイが保存されている細胞系において、中核キナーゼ MST1/2 が活性化される条件を見出し、活性化された MST1/2 に起こる変化を質量分析によって同定する。

3) RASSF6 が MST1/2 と複合体を形成して互いに抑制的に機能し、ヒッポ・パスウェイが活性化すると、複合体が乖離して、RASSF6 はヒッポ・パスウェイと独立に細胞死を誘導することを明らかにしていたが、このメカニズムが RASSF6 以外の RASSF にも当てはまるかを解析し、ヒッポ・パスウェイのオン・オフにおける RASSF の位置づけを明らかにする。

4) RASSF には Ras 結合ドメインがあり、ショウジョウバエではヒッポ・パスウェイが Ras シグナルと関係することが遺伝学的研究で示されている。Ras の活性化が上述の RASSF6 と MST1/2 の相互作用に与える影響を解析する。

三年間の研究過程において、当初計画にない、以下の方法も用いた。

5) ヒッポ・パスウェイの活性をモニターするアッセイ系を樹立し、化合物ライブラリーの中から、ヒッポ・パスウェイを活性化、抑制する候補化合物を選定し、その標的を解析することにより、ヒッポ・パスウェイのオン・オフに重要な分子を同定する。

6) 線虫にヒッポ・パスウェイが保存されているかを確認し、保存されている場合は、線虫のヒッポ・パスウェイのオン・オフに関わる分子を同定する。

4. 研究成果

当初計画した分子間相互作用と MST1/2 の修飾の解析からはヒッポ・パスウェイのオン・オフに関わる新しい分子機構は見出されなかったが、他の方法により、以下の成果があげられた。

1) β アドレナリン受容体による転写コアクチベーター YAP の制御の解明：

U2OS 細胞は、ヒト肉腫由来であるがヒッポ・パスウェイが保たれている。この細胞に GFP 融合 YAP を発現させると細胞核と細胞質に分布する。細胞密度があがると GFP-YAP は細胞質に集積し、LATS1/2 の発現を抑制すると細胞核に集積する。細胞密度が低く細胞核に GFP-YAP が分布する条件において、GFP-YAP を細胞質に集積する化合物を探索する系を

作り、その系の有効性を機能既知の 1,600 化合物を用いて行った。この過程で、dobutamine が β アドレナリン受容体を介して、LATS1/2 の活性を高めて YAP を負に制御することを見出した。その後、哺乳動物のヒッポ・パスウェイでは、ショウジョウバエと異なり、G 蛋白共役受容体が上流に位置していることが他のグループからも報告されているが、私たちの dobutamine の報告がその第一例目である。この成果を発表した論文は JB 論文賞の対象となった。

2) 転写コアクチベーター YAP を抑制する候補化合物の獲得：

上述の GFP-YAP を発現する U2OS 細胞のアッセイ系を用いて 18,000 化合物を対象とするスクリーニングを行い、GFP-YAP を細胞質に集積させる化合物を獲得した。その中から、がん抑制的に働く化合物を選択した。現在、製薬企業との共同研究として、個体レベルでの評価を含む解析の段階に進んでいる。

3) 転写コアクチベーター TAZ を活性化する候補化合物の獲得とその応用：

ヒトにおいて YAP と並んでヒッポ・パスウェイの標的となっている TAZ が強い腫瘍源性を持つことに私たちは気が付いた。不死化ヒト乳腺上皮細胞に TAZ を増幅発現させ、LATS1/2 をノックダウンすると、浮遊状態でも生育可能となり sphere を形成する。この性質を利用して、TAZ を活性化させる候補化合物を獲得した。得られた化合物は、マウス間葉組織幹細胞の骨細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制し、マウス筋芽 C2C12 細胞の筋分化を促進するなど、多彩な作用を示した。現在、これらの化合物を研究試薬として用いて、がんの悪性化、臓器の線維化、筋組織の再生修復、マクロファージの機能におけるヒッポ・パスウェイと TAZ の役割を解明しようとしている。

4) ヒッポ・パスウェイを活性化、抑制する薬剤を探索する新しいアッセイ系の樹立：

ヒッポ・パスウェイを活性化、抑制する化合物をまず同定し、続いて、その分子標的を追求する研究手法は、ヒッポ・パスウェイのオン・オフ機構の解明に有効であるのみならず、ただちに、ヒッポ・パスウェイの生理機能を解明する手段を提供してくれることが明らかとなった。そこで、上述した二つのアッセイ系以外にもヒッポ・パスウェイの機能に影響する化合物を探索するアッセイ系を作ることにした。これまでに、U2OS 細胞に GFP-TAZ を発現させた系、ヒト網膜色素上皮 ARPE19 細胞に YAP と TEAD に応答するレポーターを組み込んだ系の樹立を終え、現在、その有効性を検証している。

5) 腎臓尿管上皮細胞におけるヒippo・パスウエイと RASSF6 の機能の解明 :

本研究がスタートした時点で、RASSF6 が各種のがん細胞、ラット初代培養肝細胞の細胞死を担っていることを明らかにしていた。RASSF6 は腎臓での発現が高く、元々、腎臓で同定された分子であるので、腎臓での機能に興味を持たれた。腎臓では RASSF6 は糸球体と近位尿管上皮細胞に発現し、特に後者のアピカル膜に集積し、実験的ネフローゼを起こして高蛋白に曝露すると小胞状の局在を示すことが観察された。この観察を踏まえて不死化ヒト尿管上皮 HK-2 細胞を用いて実験を行い、HK-2 細胞が高浸透圧にさらされるとヒippo・パスウエイが活性化し RASSF6 を介する細胞死がおこること、RASSF6 は Rab11 と局在が一致し、primary cilia にも分布することを明らかにした。RASSF6 は primary cilia の形成に関わると予測されるが、詳細の解明は、今後の課題となっている。

6) RASSF3 の腫瘍抑制分子としての機能の解明 :

RASSF3 はヒトがんで発現抑制が認められ他の RASSF と同様に腫瘍抑制分子として機能すると予測されていたが、その詳細は不明に止まっていた。そこで、RASSF3 が、RASSF6 と同じようにヒippo・パスウエイの活性制御に関わるかを明らかにしたいと考え、RASSF3 の解析を行った。その結果、RASSF3 が MDM2 と結合し、細胞に DNA 損傷をおこす傷害が働くと、RASSF3 が MDM2 の自己分解を促進して、p53 を安定化させ、G1/S アレストをおこすことを明らかにした。RASSF3 はヒippo・パスウエイの中核キナーゼ MST1/2 に結合するが、MST1/2 のキナーゼ活性を抑制せず RASSF6 と異なることも明らかにした。

7) RASSF と YAP の線虫ホモログの同定とその機能の解明 :

ヒippo・パスウエイを構成する分子のホモログは線虫ゲノムにも保存されているが、それらが一つのシグナル伝達系を構成しているかは不明であった。もし線虫にもヒippo・パスウエイが保存されているならば、線虫を対象とするゲノムワイドのノックダウン実験、化合物ライブラリーによる探索が、ヒippo・パスウエイのオン・オフ機構の解明に有効と期待された。そこで、RASSF のホモログと YAP のホモログをそれぞれ RSF-1、YAP-1 として解析した。RSF-1 は MST1/2 ホモログと結合してキナーゼ活性を上げ、ヒト RASSF の中では RASSF1A に近い性質をもち、Ras との直接結合は確認されなかったが、遺伝学的には Ras の下流で機能していることが明らかとなった。また、アクチン細胞骨格の制御に関わる

可能性が示唆された。YAP-1 は、LATS1/2 ホモログ WTS-1、TEAD ホモログ Egl-44 と相互作用し、WTS-1 依存的に細胞核から細胞質に局在を変え、Egl-44 の転写を高める点で、ヒトの YAP と類似していることが確認された。ところが、MST1/2 や RASSF のホモログ、他のヒippo・パスウエイの上流制御分子のホモログをノックダウンしても YAP-1 の細胞内局在には変化が起こらなかった。すなわち、線虫ではヒippo・パスウエイの構成分子のうち、MST1/2 より上流の部分と、LATS1/2 より下流の部分はつながっていないと解釈される。線虫をヒippo・パスウエイのオン・オフ機構の解明に利用するに至らなかったが、この一連の研究は線虫における RASSF、YAP についての初めての報告である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Hata Y, Timalsina S, Maimaiti S, Okadaic acid: a tool to study the Hippo pathway. *Marine Drugs* 11, 896-902. 2013
- ② Iwasa H, Maimaiti S, Kuroyanagi H, Kawano S, Inami K, Timalsina S, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. Yes-associated protein homolog, YAP-1, is involved in the thermotolerance and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Cell Res.* 319, 931-945. 2013
- ③ Iwasa H, Kuroyanagi H, Maimaiti S, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. Characterization of RSF-1, the *Caenorhabditis elegans* homolog of the Ras-association domain family protein 1. *Exp. Cell Res.* 319, 1-11. 2013
- ④ Kudo T, Ikeda M, Nishikawa M, Yang Z, Ohno K, Nakagawa K, Hata Y. The RASSF3 candidate tumor suppressor induces apoptosis and G1/S cell cycle arrest via p53. *Cancer Res.* 72, 2901-2911. 2012
- ⑤ Nishio M, Hamada K, Kawahara K, Sasaki M, Noguchi F, Chiba S, Mizuno K, Suzuki S, Dong Y, Tokuda M, Morikawa T, Hikasa H, Eggenschwiler J, Yabuta N, Nojima H, Nakagawa K, Hata Y, Nishina H, Mimori K, Mori M, Sasaki T, Mak TW, Nakano T, Itami S, Suzuki A. Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice. *J. Clin. Invest.* 122, 4505-4518. 2012
- ⑥ Hata S, Hirayama J, Kajiho H, Nakagawa

- K, Hata Y, Katada T, Furutani-Seiki M, Nishina H. A novel acetylation cycle of transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 287, 22089-98, 2012
- ⑦ Withanage K, Nakagawa K, Ikeda M, Kurihara H, Kudo T, Yang Z, Sakanai A, Sasaki T, Hata Y. Expression of RASSF6 in kidney and the implication of RASSF6 and the Hippo pathway in the sorbitol-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells. *J. Biochem.* 152, 111-119. 2012
- ⑧ Hirai S, Miwa A, Ohtaka-Maruyama C, Kasai M, Okabe S, Hata Y, Okado H. RP58 controls neuron and astrocyte differentiation by downregulating the expression of Id1-4 genes in the developing cortex. *EMBO J.* 31, 1190-1202. 2012
- ⑨ Bao Y, Nakagawa K, Yang Z, Ikeda M, Withanage K, Ishigami-Yuasa M, Okuno Y, Hata S, Nishina H, Hata Y. A cell-based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. *J. Biochem.* 150, 199-208. 2011
- ⑩ Bao Y, Hata Y, Ikeda M, Withanage K. Mammalian Hippo pathway: from development to cancer and beyond. *J. Biochem.* 149, 361-379. 2011
- ⑪ Fukaya M, Kamata A, Hara Y, Tamaki H, Katsumata O, Ito N, Takeda S, Hata Y, Suzuki T, Watanabe M, Harvey RJ, Sakagami H. SynArfGEF is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 and localizes preferentially at post-synaptic specializations of inhibitory synapse. *J. Neurochem.* 116, 1122-1137. 2011
- ⑫ Kaufman L, Potla U, Coleman S, Dikiy S, Hata Y, Kurihara H, He JC, D' Agati VD, Klotman PE. Upregulation of the homophilic adhesion molecule Sidekick-1 in podocytes contributes to glomerulosclerosis. *J. Biol. Chem.* 285, 25677-25685. 2010
- ⑬ Nakagawa K, Sugahara M, Yamasaki T, Kajiho H, Takahashi S, Hirayama J, Minami Y, Ohta Y, Watanabe T, Hata Y, Katada T, Nishina H. Filamin associates with stress signaling kinases MKK7 and MKK4 and regulates JNK

activation. *Biochem. J.* 427, 237-245. 2010

〔学会発表〕(計4件)

- オーガナイズしたシンポジウム・ワークショップ
- ①第84回日本生化学会大会：シンポジウム「Hippoシグナル伝達系研究の新展開」2011年9月21日神戸
- ②第35回日本分子生物学会年会：ワークショップ「腫瘍抑制シグナルの新局面」2012年12月13日福岡

国際発表

- ③Hata Y. Preparation of tumor-initiating cells using the mutants of TAZ and YAP. The Second Workshop on the Hippo Tumor Suppressor Pathway. 2010年11月4日 Rome, Italy
- ④Hata Y. The RASSF3 candidate tumor suppressor induces apoptosis and G1/S cell cycle arrest via p53. The Second RASSF Symposium. 2011年7月14日 Oxford, UK

〔図書〕(計1件)

畑 裕、池田光伸、足場タンパク「トランスポートソームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ向けて」京都廣川書店 2011年 総ページ数471

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmdt.ac.jp/mbc/index.html>

(1)研究代表者

畑 裕 (HATA YUTAKA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：80313237

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

中川 健太郎 (NAKAGAWA KENTARO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号：70451929

池田 光伸 (IKEDA MITSUNOBU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号：00451930