

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247036

研究課題名(和文) Hippoシグナル経路による細胞間コミュニケーションの分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of intercellular communication by Hippo pathway

研究代表者

佐々木 洋 (SASAKI, Hiroshi)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10211939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,200,000円

研究成果の概要(和文)：胚発生においては、個々の細胞の挙動は調和がとれている。本研究では、隣接細胞間のコミュニケーションに関わるHippoシグナル経路に注目し、その制御機構として、細胞骨格F-アクチンと接着結合に存在するAngiomotinの関与を見出した。さらに、隣接細胞間のTead活性の差を認識した細胞競合が起こること、さらに、それはマウス胚内でも起こる普遍的な物であることも見出した。その様な仕組みにより細胞の挙動が調和していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：During embryogenesis, behaviors of individual cells are coordinated. In this research, we focused on Hippo signaling pathway, which is involved in intercellular communication, and found involvement of F-actin cytoskeleton and Angiomotin present at adherens junctions. We also found that cells recognize differences in Tead activities with neighboring cells and undergo cell competition, and that such communication is an universal mechanism, which also takes place in mouse embryos. These communication mechanisms likely contribute to coordinate cellular behaviors in mouse embryos.

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞間コミュニケーション Hippoシグナル 細胞競合

1. 研究開始当初の背景

多細胞体の発生においては、体を構成する個々の細胞の挙動は、胚全体として調和がとれていることが必要である。細胞の挙動は細胞間のコミュニケーションにより制御され、胚全体としての調和を保っている。隣接した細胞間の直接の接触や接着を介したコミュニケーションがどのようにして細胞の挙動を制御するのかについては、その発生学上の重要性にもかかわらず、いまだ不明な点が多い。

我々を含む、複数の研究グループが、Hippo シグナル経路は、細胞間の接触あるいは接着によって制御されるシグナル経路であることを明らかにした。Hippo シグナル経路は、ショウジョウバエで同定されたがん抑制シグナルであり急速に脚光を浴びつつあるが、その研究の歴史は短く、ハエにおいても、そのシグナルの制御・伝達機構については、いまだ多くの点が不明のままである。

我々は一連の研究結果から、Hippo シグナル経路は、単にがん抑制(細胞増殖制御)シグナルとして機能するだけではなく、細胞の種類、発生段階に応じて、細胞間接触の情報に基づき、細胞の分化・増殖・移動など、様々な細胞の挙動を制御しうるシグナル経路であることが示唆された。さらに、我々は、このシグナル経路が、隣接する細胞同士の細胞間接触・接着によるコミュニケーションをも担っていることを示唆する知見を得ている。

2. 研究の目的

本研究では、我々のこれまでの研究成果等を活用し、細胞間の接触・接着等の情報による細胞間コミュニケーションの分子基盤を明らかにすることを目的とする。具体的には、次の3点を目的とする。

(1) 細胞間の接触・接着等の情報が Hippo シグナル経路を制御する仕組みを解明する。マイクロドメイン培養系を用いて、単一細胞の形態変化による Hippo シグナルの制御機構を解明する。また、細胞間接着と既知の Hippo 経路因子とをつなぐことが期待される、新規 Hippo 経路構成因子 Angiomotin に注目し、その機能・作用機構を明らかにする。

(2) Hippo シグナル経路が隣接した細胞の挙動を制御する仕組みを解明する。共培養系で隣接細胞の挙動制御にかかわる遺伝子を同定し、その機能・作用機構を解明する。

(3) Hippo 経路による細胞間コミュニケーションが胚発生に果たす役割を解明する。培養細胞で同定された Hippo 経路による細胞間コミュニケーション機構が、胚内で見られるか、またどのように利用されているのかを解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞密度の変化による Hippo 経路の活

性化におけるマイクロドメイン培養系を用いて、単一細胞の広がり方を変化させて培養することで、その際の Hippo 経路の活性に変わりの形態変化による Hippo シグナルの制御機構を解明する。また、細胞間接着と既知の Hippo 経路因子とをつなぐことが期待される、新規 Hippo 経路構成因子 Angiomotin に注目し、その機能・作用機構を明らかにする。

(2) Hippo シグナル経路が隣接した細胞の挙動を制御する仕組みを解明する。遺伝子进行操作した NIH3T3 細胞の共培養系で隣接細胞の挙動制御にかかわる遺伝子を同定し、その機能・作用機構を解明する。

(3) Hippo 経路による細胞間コミュニケーションが胚発生に果たす役割を解明する。培養細胞で同定された Hippo 経路による細胞間コミュニケーション機構が、胚内で見られるか、またどのように利用されているのかを解明する。

4. 研究成果

(1) 細胞形態と細胞骨格による Hippo シグナルの制御

培養細胞においては細胞密度が高くなると Hippo シグナルが活性化され、転写のコアクチペーターである Yap が核から排除されることで転写因子 Tead が不活性化して細胞増殖が停止する。細胞間の接着が Hippo 経路の活性化に関与していることが知られていたが、本研究では、細胞形態の変化の関与を解析した。マイクロドメインの培養系で、単一細胞の形態を変化させると、低密度に対応する大きく広がった形態では Yap が核局在するのに対し、高密度に対応するあまり広がっていない形態では Yap が核から排除された。さらに、大きく広がる形態の変化は、細胞骨格の F-アクチンの形成量を増加させることで、Yap の核移行を抑制した(図 1)。

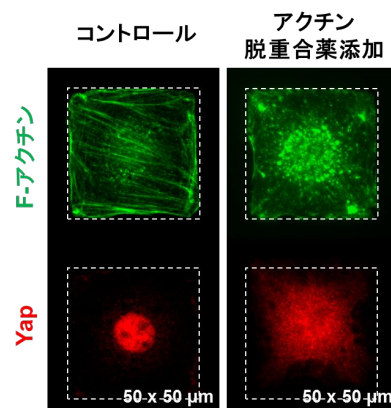


図1. 細胞形態とアクチンによるYapの制御

さらに、細胞形態、F-アクチン量の変化による Yap の制御はプロテインキナーゼの Lats による Yap のリン酸化を介していることを示した。これらの結果は、細胞は密度の変化を細胞間の接着の変化と、細胞形態の変化とし

て感知して、Hippo シグナルを制御していること、さらに細胞形態の変化を感じるしくみとして細胞骨格の F-アクチンの変化を介していることを示している(Wada et al. 2011)。

(2) Angiotenin による細胞間の接着結合における Hippo シグナル活性化機構

着床前のマウス胚では胚の内側の細胞で Hippo シグナルが活性化され、外側の細胞では活性化されない。我々は、このような細胞の位置の違いによる Hippo シグナルの活性化の制御には Hippo 経路因子 Angiotenin (Amot) が重要な働きをしていることを見出した。着床前胚における Hippo シグナルの活性化には、Amot および関連遺伝子 Amotl2 が必須であり、内側の細胞では Amot が細胞間の接着結合に存在するのに対し、外側の細胞では接着結合に存在しないことから、Amot が接着結合に存在することが細胞間接着による Hippo シグナルの活性化に必要と考えられた。Amot は Hippo 経路因子 Merlin/Nf2 と協調的に細胞間接着因子 E-cadherin の細胞内ドメインに結合し、その結合には Amot の N 末ドメインが必要である。Amot の N 末には、Hippo 経路のプロテインキナーゼ Lats のリン酸化部位(S176)があり、このリン酸化ができない Amot 変異体は Hippo シグナルを活性化できず、リン酸化を模倣した変異を導入した Amot は Hippo シグナルを恒常的に活性化した。生化学的には、非リン酸化型の Amot は F-アクチンに結合しており、リン酸化されると F-アクチンへの結合能を失い、Lats との結合が安定化された。これらの結果から、接着結合における Amot のリン酸化が細胞間接着による Hippo シグナルの活性化の鍵となっていると考えられた(図 2) (Hirate et al, 2013)。

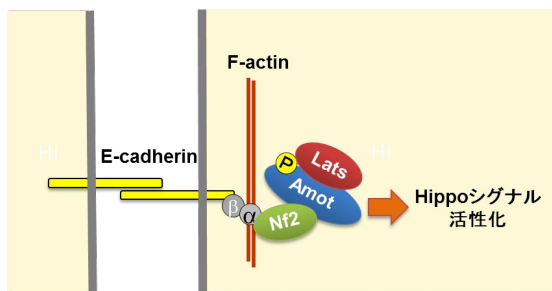


図2. Amotのリン酸化によるHippoシグナル活性化

(3) NIH3T3 細胞における Tead 活性と Myc による細胞競合

我々は、以前の研究において、マウス胚由来の線維芽細胞株 NIH3T3 において、Hippo 経路の転写因子 Tead の活性を増減させると細胞の増殖が増減することを見出していた。本研究では、これらの Tead 活性を操作した細胞を正常な NIH3T3 細胞と共培養すること、その挙動は大きく変化した。Tead 活性を低下させた細胞は、単独培養に比べて増殖が極端に抑制され、コンフルエントに達した以

降に細胞死によって細胞数が減少した。逆に Tead 活性を増価させた細胞は細胞増殖が低下せず、コンフルエントに達した以降で、共培養している正常細胞が細胞死によって排除された。すなわち、Tead 活性の異なる細胞を共培養すると、相対的に Tead 活性の高い細胞が勝者に、低い細胞が敗者になるような細胞競合が起こることが明らかになった。さらに、そのしくみとして、Tead は転写因子 Myc の発現を制御しており、Tead 活性の異なる細胞が隣接すると勝者になる細胞で Myc タンパク質の量が増加することが見られた。さらに、Myc の発現細胞は正常細胞と共培養すると勝者になることから、Myc の発現量が細胞競合の勝者・敗者の決定に関わっていることが分った。しかし、Tead 活性の低い細胞に Myc を発現させても正常細胞に対して敗者になるため、細胞増殖の制御と細胞競合活性の決定には Tead 活性と Myc の発現量とが協調的に関わっていることが示唆された(図 3) (Mamada et al 2015)。

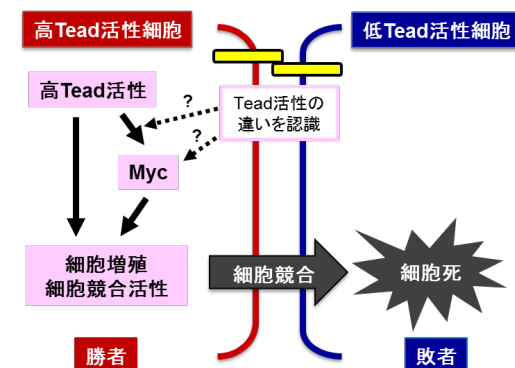


図3. Tead活性とMycによる細胞競合

これまで、細胞競合の研究は主にショウジョウバエの上皮組織で行われており、脊椎動物における知見は少ない。本研究の成果は、哺乳類の線維芽細胞においてもショウジョウバエの上皮組織と同様の細胞競合が起こることを示すものであり、このような培養細胞を用いた単純なモデル系を樹立できたことは、細胞競合の分子機構の研究に役立つことが期待される。

(4) Tead 活性による細胞競合の普遍性

NIH3T3 細胞で見られた Tead 活性による細胞競合が、他の細胞種にもみられる普遍的なものであるかどうかを明らかにするために、上皮細胞株 MTD-1A を用いて解析を行った。Tead 活性を上昇させた細胞は、単独培養では正常細胞と同等の細胞増殖・細胞死を示したが、正常細胞と共培養すると、増殖が昂進して細胞死が低下した。さらに、マウスにおいて全身で働いている Rosa26 遺伝子座から Yap あるいは核移行型の Yap (YapS112A) を発現して Tead 活性を上昇させるトランスジェニックマウスを作製したところ、全身で Yap/YapS112A を発現するマウス胚は正常であり、生後も顕著な異常は見られないが、正

常なマウス胚に Yap/YapS112A を発現する細胞をモザイク状に誘導すると、同様に誘導した蛍光タンパク質を発現するコントロール(正常)細胞よりも優位に増殖の増加が見られた(図 4)(加村、未発表)。

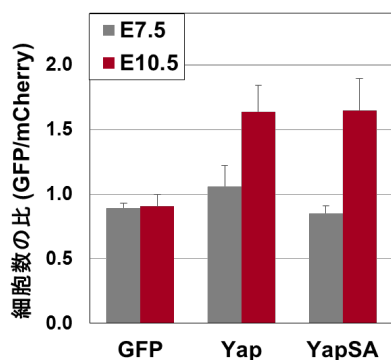


図4. 着床前胚に見られた Yap発現細胞の増殖促進

このように上皮細胞、マウス胚、いずれの場合も Tead 活性の高い細胞は、同種の細胞の中では正常細胞と同様に振舞うが、正常細胞の中では、活発に増殖するなど正常細胞よりも優位なふるまいをするようになった。すなわち、隣接細胞間の Tead 活性の違いを認識した細胞の挙動の制御は、細胞種を問わない普遍的な機構であることが明らかになった。このような隣接細胞の状態を認識した細胞間コミュニケーションが、胚という細胞集団における個々の細胞の挙動の調和に重要な役割を果たしていると考えられる。

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 19 件)

Sasaki H, Position- and polarity-dependent Hippo signaling regulates cell fates in preimplantation mouse embryos. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 査読有, 2015, 47-48:80-7.

doi: 10.1016/j.semcdb.2015.05.003.

Hirate Y, Hirahara S, Inoue K-i, Kiyonari H, Niwa H, Sasaki H, Par-aPKC-Dependent and -Independent Mechanisms Cooperatively Control Cell Polarity, Hippo Signaling, and Cell Positioning in 16-Cell Stage Mouse Embryos. *Develop. Growth Differ.*, 査読有, 2015, 57, 544-556.

doi: 10.1111/dgd.12235.

佐藤卓史, 佐々木洋, Hippo シグナルによる細胞競合の制御, *実験医学*, 査読無, 2015, 33, 2920-2925.

Mamada H, Sato T, Ota M, Sasaki H. Cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts is controlled by the activity of Tead family proteins and Myc. *J Cell Sci.*, 査読

有, 2015, 128, 790-803.

doi: 10.1242/jcs.163675.

Hirate Y, Sasaki H, The role of angiotensin phosphorylation in the Hippo pathway during preimplantation mouse development. *Tissue Barriers*, 査読有, 2014, 2, e28127.

Wicklow E, Blij S, Frum R, Hirate Y, Lang RA, Sasaki H, Ralston A. HIPPO pathway members restrict SOX2 to the inner cell mass where it promotes ICM fates in the mouse blastocyst. *PLoS Genet.*, 査読有, 2014, 10, e1004618.

doi: 10.1371/journal.pgen.1004618.

Rayon T, Menchero S, Nieto A, Xenopoulos P, Crespo M, Cockburn K, Cañon S, Sasaki H, Hadjantonakis AK, de la Pompa JL, Rossant J, Manzanares M. Notch and hippo converge on cdx2 to specify the trophectoderm lineage in the mouse blastocyst. *Mechanical control of notochord morphogenesis by extra-embryonic tissues in mouse embryos*. *Dev Cell.*, 査読有, 2014, 30, 410-422.

doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.019.

Imuta Y, Koyama H, Shi D, Eiraku M, Fujimori T, Sasaki H, Mechanical control of notochord morphogenesis by extra-embryonic tissues in mouse embryos. *Mech. Dev.*, 査読有, 2014, 132, 44-58.

doi: 10.1016/j.mod.2014.01.004.

Hirate Y, Hirahara S, Inoue K-i, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, Nakao K, Shimono A, Sasaki H, Polarity-dependent distribution of angiotensin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol.*, 査読有, 2013, 23, 1181-1194.

doi: 10.1016/j.cub.2013.05.014.

Imuta Y, Kiyonari H, Jang CW, Behringer RR, Sasaki H, Generation of knock-in mice that express nuclear EGFP and tamoxifen-inducible Cre recombinase in the notochord from Foxa2 and T loci. *Genesis*, 査読有, 2013, 51, 210-218.

doi: 10.1002/dvg.22376.

Hirate Y, Cockburn K, Rossant J, Sasaki H, Tead4 is constitutively nuclear, while nuclear vs. cytoplasmic Yap distribution is regulated in preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 査読有, 2012, 109:E3389-90.

doi: 10.1073/pnas.1211810109

Wada K-I, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H, Hippo pathway regulation

by cell morphology and stress fibers. *Development*, 査読有, 2011, 138, 3907-3914. doi: 10.1242/dev.070987.

[学会発表](計 23 件)

佐々木洋, マウス胚由来線維芽細胞 NIH3T3 における転写因子 Tead と Myc による細胞競合, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

Sasaki H., Tead and Myc cooperatively regulates cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts, 1st International Symposium on Cell Competition, "Cell Competition in Development and Cancer", Sep 10th, 2015, Shiran Kaikan, Kyoto Univ (Kyoto)

佐々木洋, マウス胚由来線維芽細胞 NIH3T3 における細胞競合, 第 67 回日本細胞生物学会, 2015 年 7 月 1 日, タワーホール船堀(東京)

Sasaki H., Roles of Tead family proteins in cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts, Keystone Symposium, "The Hippo Pathway: Signaling, Development and Disease", May 17 - 21, 2015, New Mexico (USA)

佐々木洋, 細胞極性依存的な angiomin の局在制御が着床前胚の Hippo シグナルを制御する, 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 17 日, 国立京都国際会館(京都)

Sasaki H. Mechanisms of cell fate specification in preimplantation mouse embryos, KEY Forum: From Stem Cells to Organs, Sep 4, 2014, Kumamoto City Medical Association Hall, (Kumamoto)

Sasaki H. Mechanical control of notochord morphogenesis by extra-embryonic tissues in mouse embryos, International Symposium on Mechanobiology 2014, May 20-23, 2014, Okayama University (Okayama)

佐々木洋, Tead と Myc による細胞競合, 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸ポートアイランド(神戸)

Sasaki H. Mechanism of position-dependent specification of cell fates in preimplantation mouse embryos, Keystone Symposium, "The Hippo Tumor Suppressor Network: From Organ Size Control to Stem Cells and Cancer", May 19-23, 2013, Monterey (USA)

Sasaki H. Mechanisms of position-dependent cell fate specification in preimplantation mouse embryos. In Stem workshop on mouse embryology: From

stem cells to organogenesis, March 10-12, 2013, Bangalore (India).

佐々木洋, Tead regulated contact-mediated cell competition by controlling Hippo signaling and Myc expression, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14-16 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

佐々木洋 Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

Sasaki H. Mechanisms of trophectoderm fate specification in preimplantation embryos. Hong Kong Society for Developmental Biology Symposium "From Embryology to Disease Mechanisms" November 26-27, 2012 Hong Kong Academy of Medicine, Hong Kong (China)

Sasaki H. Mechanisms of position-dependent specification of cell fates in preimplantation embryos. EMBO/EMBL Symposium: Germline Immortality through Totipotency. October 13-16, 2012, Heidelberg (Germany)

Sasaki H. Mechanisms of position-dependent specification of cell fates in preimplantation embryos. Mouse Molecular Genetics Meeting. October 2-6, 2012 CA (USA)

佐々木洋, Hippo シグナルによる細胞間コミュニケーションとその細胞の形・力による制御, プレインストーミング WS「多細胞動態の力学的制御とそのモデル化」~生化学場との統合的理解を目指して~ 2012 年 6 月 26 日, 27 日 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター(神戸)

Sasaki H. Hippo pathway controls cell fates in preimplantation mouse embryos. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13-16 日, パシフィコ横浜(横浜)

Sasaki H., Mamada H. Cell competition through Hippo signaling pathway in cultured mammalian cells. 第 63 回日本細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27-29 日, 北海道大学(札幌)

[図書](計 2 件)

Kondoh H, Kuroiwa A (eds.), *New Principles in Developmental Processes*, Springer (2014), Sasaki H "Position-dependent Hippo signaling controls cell fates in preimplantation mouse embryos" pp 249-264.

Oren M., Aylon Y. (eds.), *The Hippo Signaling Pathway and Cancer*, Springer (2013), Sasaki H. "Role of

Hippo signaling in early mouse development” pp 41-54.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/131/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 洋 (SASAKI, Hiroshi)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：10211939

(2) 連携研究者

平手 良和 (HIRATE, Yoshikazu)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：70342839
(平成25年度まで参画)

和田 健一 (WADA, Ken-ichi)
独立法人理化学研究所・胚誘導研究チーム・研究員
研究者番号：20525911
(平成23年度まで参画)

儘田 博志 (MAMADA, Hiroshi)
熊本大学・発生医学研究所・研究員
研究者番号：90568734
(平成23年度まで参画)

佐藤 卓史 (SATO, Takashi)
熊本大学・発生医学研究所・研究員
研究者番号：70555755
(平成24年度から参画)

加村 啓一郎 (KAMURA, Keiichiro)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任助教
研究者番号：30604483