

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659034

研究課題名（和文） 癌遺伝子YAP依存性の肝癌誘発系の開発と関連マイクロRNAの網羅的発現解析

研究課題名（英文） Establishment of YAP-dependent hepatic tumor formation and global expression analysis of related microRNAs

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

研究成果の概要（和文）：Hippoシグナル伝達系は、近年、発生・分化・器官サイズ・癌の発症進展を制御することが明らかにされ、国内外から急速に注目されている。本研究では、hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法という簡便に肝臓特異的に遺伝子を導入する方法を用いて、Hippo系主要標的転写共役因子YAPの活性のgain of functionによる肝癌誘発状態を作り出し、マイクロアレイ解析によって、マウス肝臓での転写情報を解析することを目的とした。その結果、1) 効率の良い肝癌誘発系の確立に成功した。また、2) cDNAマイクロアレイによる発現解析を行い、YAPによって発現が亢進する遺伝子を約20種類同定することに成功した。ヒト肝癌発症のメカニズム解明に貢献する研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently, YAP was shown to play an important role in organ size control and to be inhibited by the Hippo signaling pathway. Either transgenic overexpression of YAP or knockout of Hippo pathway genes in mouse liver results in enlargement of this organ and the eventual development of hepatic tumors. In this study, we used the method of hydrodynamic tail vein injection (HTVi) that is specific for gene transfer into liver. As a results, we succeeded in establishing an efficient system of liver cancer induction due to gain of function of the active YAP. Secondly, we analyzed the gene expression by cDNA microarray and identified more than 20 genes whose expression is increased by active YAP. Thus, our results could contribute to elucidate the mechanism of human liver cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：YAP、肝癌、細胞競合、アポトーシス、cDNA、マイクロRNA、HTVi法、網羅的遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

Hippo シグナル伝達系は、ショウジョウバエの器官サイズを制御することが明らかにされていたが、哺乳動物における器官サイズ制御や肝癌発症における役割に関しては未解明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法というモザイク状に肝臓特異的に遺伝子を導入する方法を用いて、1) Hippo 系主要標的転写共役因子 YAP の活性の gain of function による肝癌誘発状態を作り出すこと、2) マイクロアレイや Chip-seq 解析によって、マウス肝臓での転写情報を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

肝臓での安定な発現を期待して、アルブミンプロモーターの下流に、メダカと保存性の高いヒトの野生型および 5SA 変異 YAP をコードする cDNA を挿入したベクターを利用した。hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法によって、4~8 週令のマウスに、上記発現ベクターを導入した。導入後 3~6 ヶ月の肝臓に肝癌が形成されているか否かを検討した。癌が発症した場合は、タンパク質解析用、microRNA マイクロアレイ用、cDNA マイクロアレイ用、Chip-seq 解析用、組織染色用に肝臓を分けて処理した。

## 4. 研究成果

本研究で用いた HTVi 法による肝細胞への導入効率は約 30% であり、活性型 YAP 変異体 (5SA) はモザイク状に導入された。野生型 YAP の導入によっては肝癌の誘導は観察されなかったが、活性型の YAP (5SA) を導入した場合は、6 ヶ月後にはほぼ 100% の頻度で肝細胞癌の誘導に成功した。また、各種変異体の解析から、肝癌の誘発には遺伝子の転写が必須であることが示された。次に cDNA マイクロアレイによる発現解析を行い、YAP によって発現が亢進する遺伝子を約 20 種類同定することに成功した。現在、これらが発現誘導に及ぼす効果を検討している。マイクロ RNA の解析も同様に進行している。

## 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 11 件)

1. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki,

Satoko Arakawa, Kimiko Shimizu, Shigeomi Shimizu, Orly Reiner, Hideyuki Okano, Sachiko Nishina, Noriyuki Azuma, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2011) Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 31, 16872-16883.

2. Norio Miyamura<sup>1</sup>, Takashi Nakamura<sup>1</sup>, Naoko Goto-Inoue, Nobuhiro Zaima, Takahiro Hayasaka, Tokiwa Yamasaki, Shuji Terai, Isao Sakaida, Mitsutoshi Setou and Hiroshi Nishina (2011) Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 120-125. (<sup>1</sup>Contributed equally)

3. Tomomi Osaki, Yoshimi Uchida, Jun Hirayama, and Hiroshi Nishina (2011) Diphenyleneiodonium chloride, an inhibitor of NADPH oxidase, suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in zebrafish. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1343-1347.

4. Shinya Takahashi, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajiho, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell Death Differ.* 18, 645-655.

5. Shinya Takahashi, Kyoko Sakurai, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajiho, Kota Saito, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 39, 3446-3457.

6. Hiroshi Yukiura, Kotaro Hama, Keita Nakanaga, Masayuki Tanaka, Yoichi Asaoka, Shinichi Okudaira, Naoaki Arima, Asuka Inoue, Takafumi Hashimoto, Hiroyuki Arai, Atsuo Kawahara, Hiroshi Nishina, and Junken Aoki (2011) Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 286, 43972-43983.

7. Takuro Hisanaga, Shuji Terai, Takuya Iwamoto, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Tomoaki Murata, Toshifumi Matsuyama, Hiroshi Nishina, Isao Sakaida (2011) TNFR1 mediated signaling is important to induce the improvement of liver fibrosis by bone marrow cell infusion. *Cell Tissue Res.* 346, 79-88.
  8. Shinya Kuwashiro, Shuji Terai, Toshiyuki Oishi, Fujisawa Koichi, Toshihiko Matsumoto, Hiroshi Nishina, Isao Sakaida (2011) Telmisartan improved nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation. *Cell Tissue Res.* 344, 125-134.
  9. Yijun Bao, Kentaro Nakagawa, Zeyu Yang, Mitsunobu Ikeda, Kanchanamala Withanage, Mari Ishigami-Yuasa, Yukiko Okuno, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, and Yutaka Hata (2011) 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.
  10. 浅岡洋一、仁科博史：メダカとゼブラフィッシュを用いた肝研究；実験医学2011年8月号 Vol. 29 (No. 13), 2090-2095 (2011)
  11. 仁科博史：モデル生物-マウスと小型魚類：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；京都廣川書店（執筆分担），434-439 (2011)
- [学会発表] (計20件)
1. Hirayama Jun et al.; Light-dependent regulation of zebrafish circadian transcription [Spin Chemistry Meeting 2011, Noordwijk, Netherlands, May 2011]
  2. Hiroshi Nishina; RASSF7 functions as an anti-apoptotic regulator of JNK signaling by inhibiting phosphorylated MKK7 activity [2nd RASSF Symposium, Oxford, UK, July 2011]
  3. Hirayama Jun et al.; Identification of novel kinase phosphorylating CRYPTOCHROME 1 to regulate its protein stability [5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, Nara, Japan, August 2011]
  4. Hiroshi Nishina; Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver [Liver Down Under 2011, Perth, Australia, Nov-Dec 2011]
  5. Yoshimi Uchida et al.; Involvement of the Stress Kinase MKK7 in the regulation of the mammalian circadian clock [GCOE International Symposium "Designing the circadian clock", Nagoya, Japan, November 2011]
  6. 宮村憲央他；肝再生時の脂質代謝の解析 [第14回日本肝臓医生物学研究会；2011年2月/東京]
  7. 宮村憲央他；質量顕微鏡を用いた再生肝における脂質量変化の解析 [日本薬学会第131年会；2011年3月/静岡]
  8. 尾崎友美他；ストレス応答性 JNK シグナル経路による分子時計制御機構の解析 [日本薬学会第131年会；2011年3月/静岡]
  9. 平山順；細胞死制御因子 DAXX による分子時計制御 [日本分子生物学会第11回春季シンポジウム；2011年5月/金沢]
  10. 畠星治他；がん原遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [日本分子生物学会第11回春季シンポジウム；2011年5月/金沢]
  11. 尾崎友美他；ストレス応答性キナーゼ JNK による分子時計制御因子 BMAL1 のリン酸化 [日本分子生物学会第11回春季シンポジウム；2011年5月/金沢]
  12. 畠星治他；がん原遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第10回生命科学研究会；2011年6月/高崎]
  13. 宮村憲央他；質量顕微鏡を用いたマウス再生肝の脂質の解析 [第18回肝細胞研究会；2011年6月/東京]
  14. 仁科博史；小型魚類を用いた肝臓研究 [第1回医学・創薬に向けた小型魚類モデル利用推進ネットワーク；2010年6月/名古屋]
  15. 仁科博史；細胞の生死を制御するストレス応答性 MAP キナーゼシグナル伝達系 [第20回日本 Cell Death 学会学術集会；2011年7月/東京]
  16. 山崎世和他；ストレス応答性キナーゼ MKK7 による軸索伸長制御 [第34回日本神経科学大会；2011年9月/横浜]
  17. 仁科博史；RASSF family によるストレス応答性 JNK シグナルの制御 [第84回日本生化学大会シンポジウム；2011年9月/

京都]

18. 宮村憲央他；癌遺伝子 YAP による肝癌誘発系の確立 [第 15 回日本肝臓医生物学研究会；2011 年 10 月／秋田]
19. 内田好海他；ストレス応答性キナーゼ MKK7 による分子時計制御機構の解明 [第 18 回日本時間生物学会学術大会；2011 年 11 月／名古屋]
20. 仁科博史／佐々木洋世話人ワークショップ；Recent Advances of Hippo and RASSF Signaling Pathways that Regulates Cell Fate [第 34 回日本分子生物学会年会；2011 年 12 月／横浜]

〔図書〕（計 1 件）

畑裕／仁科博史監修

Hippo pathway 癌・細胞死・再生の新たな鍵を握る器官サイズ制御シグナル、秀潤社 2011 年

〔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.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.htm>

1

## 6. 研究組織

### (1) 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