

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25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23770236

研究課題名（和文） 形が制御するYapを介した細胞増殖制御の分子機構の解明

研究課題名（英文） Study for molecular mechanism of cell proliferation regulation by cell morphology via Hippo signaling pathway

研究代表者

和田 健一 (WADA KEN-ICHI)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・協力研究員

研究者番号：20525919

研究成果の概要（和文）：

本研究では、細胞の形の変化が Hippo シグナル経路の起点となつて細胞増殖を制御するという仮説を提案し、これを検討した。マイクロドメイン培養システムを含む一連の実験により、細胞の形がストレスファイバー量を規定していること、およびストレスファイバーが Hippo シグナル経路を負に制御することを見出した。これらの結果を基に、細胞増殖の接触阻止に関して、細胞密度に依存して変化する細胞の形がストレスファイバーを介して Hippo シグナル経路を制御することで接触阻止が成立する、という細胞間接触に依存しない新しいモデルを提唱した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, using microdomain cell culture system we investigated molecular mechanism of regulation for cell proliferation by cell morphology via Hippo signaling pathway. We found that cell morphology regulates stress fiber formation and it works as a negative regulator for Hippo signaling pathway. Based on these findings, we proposed a novel model for “contact inhibition of cell proliferation”, in which cell morphology acts as an initial trigger for the regulation for cell proliferation via Hippo signaling pathway by modulation of stress fiber formation.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Hippo シグナル経路、細胞増殖の接触阻止、微細加工技術、細胞の形、F-actin

1. 研究開始当初の背景

主にショウジョウバエを用いた研究から抗腫瘍活性をもった新しいシグナル経路として Hippo シグナル経路が同定されていた。この経路が細胞増殖を制御する機構として広く受け入れられているモデルの概要は以下の通りである。このシグナル経路の下流は Mst1/2(Hippo)、Lats1/2(Warts)、Yap(Yorkie) の順にキナーゼカスケードを構成している。脱リン酸化状態の Yap は核内に局在して転写因子 Tead と結合することで細胞増殖にかかわる標的遺伝子の発現を誘導し細胞増殖を惹起する。一方、Lats によってリン酸化された Yap は核外へ移行して細胞質への局在、あるいは分解されることで Tead の転写活性を減じ、細胞は増殖を停止する。

これまでに、所属研究室他によって、この Hippo シグナル経路が細胞増殖の接触阻止（以下、接触阻止）の成立に関与することが明らかにされていたが、細胞がどのような刺激を受容して密度を感知するのか、そしてどのようにして Hippo シグナル経路に入力するのか、その具体的な分子機構は不明であった。また、Hippo シグナル経路の研究とは別に、細胞の形が細胞増殖活性に影響を与えることが示されていた。しかし、形に依存した細胞増殖制御に関与する具体的なシグナル経路は不明であった。

これらの先行研究における知見に加えて細胞密度の増殖に伴って細胞の伸展の程度が少なくなる（細胞の形が変わる）という観察事実から、接触阻止の成立に関して、密度の増加に伴って生じる細胞の形の変化を細胞が受容することで Hippo シグナル活性を制御して接触阻止が成立する—という独自の仮説を着想した。

2. 研究の目的

接触阻止は正常な組織を構築するために必要な細胞の重要な性質の一つであるが、その分子機構には不明な点が多い。従来、細胞間接触がシグナルの起点となって接触阻止が生じるという仮説に基づいて分子機構の理解が試みられてきた。これに対し、本研究では、細胞の形の変化がシグナルの起点となって Hippo シグナル経路に入力することで接触阻止が成立するという独自の仮説を提案した。本研究はこの仮説を検討することによって、Hippo シグナル経路が仲介する接触阻止の分子機構の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

フォトリソグラフィによる微細加工技術を用いてシリコンウェハ上にフォトレジストのマイクロパターンを構築してマスターモールドとした。このマスターモールドから複製した PDMS スタンプを培養皿上に張り付け、アガロース溶液を導入することで培養皿上に微小な細胞接着領域（マイクロドメイン）を構築した。マイクロドメイン上に細胞（NIH3T3 fibroblast）を1細胞ずつ播種することで、細胞間接触を排除した状態で細胞の形を制御した。細胞の形と Hippo シグナル経路の関連を調べるために、細胞の形の変化に関連した種々の条件下において、Hippo シグナル活性の指標となる Yap の細胞内局在とそのリン酸化レベル、および Tead の転写活性を評価した。さらに、Lats の gain/loss of function によって、細胞の形の変化が Hippo シグナル経路に入力する可能性を検討した。

4. 研究成果

NIH3T3 fibroblast を低密度条件から接触阻止が生じるコンフルエントに達するまで培養を継続したところ、細胞密度が高くなるに従い細胞の伸展面積が減少した。BrdU のパルス-チェイスによって増殖活性を調べたところ、低密度状態で Yap が核に局在している状態の細胞の多くは BrdU 陽性であった。一方、高密度な状態では Yap は細胞質局在を示し、BrdU 陽性の細胞はほとんど認められなかった。これらの結果は、細胞間接触の影響を排除できないものの、形の変化を細胞が感知して Hippo シグナルが関連した機構によって増殖が制御されて接触阻止が成立する—という仮説を支持した。

次に、細胞間接触の影響を排除して細胞の形による細胞増殖制御機構を検討するために、マイクロドメインを用いた培養実験を行った。種々の大きさのマイクロドメイン上にマイトマイシン C 処理を行い増殖を止めた NIH3T3 細胞を播種した。この培養システムを用いることで単一の NIH3T3 細胞を細胞間接触のない状態で維持しつつ形を制御した。30 x 30 μm 以下の大きさのマイクロドメイン上で細胞を培養した場合、細胞は丸い形を呈し、Yap の細胞質への局在が観察された。40 x 40 μm 以上サイズでは細胞は伸展した形態をとり、Yap は核に局在していた。これらの結果から、細胞間接触とは独立して機能する細胞の形が関与した何らかの機構によって Yap の局在が制御されることが示唆された。さらに、マイクロドメイン上で培養された細胞におけるストレスファイバーを観察したところ、20 x 20 μm のドメイン上の丸い形を呈した

細胞では、ストレスファイバーがほとんど観察されなかったが、50 x 50 μm のドメイン上で伸展した形態をとった細胞では明瞭なストレスファイバーが認められたため、ストレスファイバーと Yap の局在パターンとの間に関連が予想された。両者の関連は密度依存的な Yap 局在制御においても確認された。すなわち、Yap が細胞質局在をしめす高密度条件においてストレスファイバーは不明瞭であり、核局在をしめす低密度条件では明瞭なストレスファイバーが観察された。これらの結果より、ストレスファイバーが Yap の細胞内局在制御に関与していることが予想された。

次に、ストレスファイバーの Yap 局在制御への関与を調べるために、サイトカラシン D、ラトランキュリン A、プレビスタチン、ML-7、Y27632 の各種阻害剤を用いてストレスファイバーを異なる作用点にて薬理的に破壊した。その結果、いずれの場合も Yap の核局在が消失した。また、50 x 50 μm サイズのマイクロドメインに播種した状態でサイトカラシン D に暴露してストレスファイバーを破壊したところ、細胞は伸展状態を維持したままであったが Yap の核局在が消失した。これらの結果から、細胞の形はストレスファイバー量の変化を介して Yap の局在を制御していることが明らかとなった。

さらに、ストレスファイバーによる Yap 局在制御が Hippo シグナル経路を介して行われるのかを調べるために、Lats2 の dominant negative form (Lats2-KD) の高発現による Hippo シグナル経路の阻害実験を行った。その結果、Lats2-KD によって Hippo シグナル経路を阻害した状態でサイトカラシン D に暴露してストレスファイバーを破壊した状態でも Yap の核局在が維持された。このことはストレスファイバー (F-actin) が Hippo 経路を抑制的に制御する働きを持つことを示唆する。

さらに Hippo シグナル経路による Yap の細胞内局在制御の詳細を調べるために、Yap の細胞内局在そのリン酸化状態との関連を調べた。従来、Lats が標的としている Yap の Ser 残基のうち (マウスの場合) S112 がリン酸化されることで Yap が細胞質局在を呈すると考えられてきたが、細胞の形、およびストレスファイバーの有無にかかわらず、S112 のリン酸化レベルはほとんど変化しなかった。一方で、ストレスファイバーが減少する状況において Yap 全体のリン酸化レベルが上昇していた。さらに、S112 以外の Lats が標的とする 4 つの Ser 残基を Ala に置換した Yap 変異体が核に局在することも確認された。これらの結果は、S112 以外の Ser 残基のリン酸化が Yap の細胞質局在を誘発することを示唆する。

これら一連の実験結果より、接触阻止の成立には細胞間接触に依存しない形の変化による Hippo シグナル経路を介した増殖制御機構が存在すると結論した。具体的には、以下の分子機構を提唱した。細胞密度の増加に伴い細胞がよく伸展した形から伸展が阻害された形へと変化し、それに伴いストレスファイバー量が減少する。ストレスファイバーには Hippo シグナル経路を負に制御する働きがあるため、密度増加に伴うストレスファイバーの減少によって Hippo シグナル活性が増加し、Yap のリン酸化レベルが増加する。これにより Yap が核から排出、細胞質に局在し細胞の増殖が停止することで接触阻止が成立する。

本研究の主要な成果は、細胞の形が細胞増殖を制御することによって接触阻止を引き起こすという新しい仮説を、細胞がストレスファイバー、Hippo シグナル経路を介して形を感知、伝達するという具体的な分子機構として提示したことである。また、Hippo シグナル経路を制御する新しい分子として F-actin を見出し、さらに Yap の細胞内局在パターンは Yap の S112 のリン酸化だけでは規定されない、という新規知見も得られた。これら二つの発見も Hippo シグナル経路の理解に寄与する本研究の重要な成果である。

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 2 件)

① K.-I. Wada, K. Itoga, T. Okano, S. Yonemura, H. Sasaki. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* 138: 3907-3914, 2011 (査読有)

② L. Sansores-Garcia, W. Bossuyt, K.-I. Wada, S. Yonemura, C. Tao, H. Sasaki, G. Halder. Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO Journal* 30: 2325-2335, 2011 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

① Ken-Ichi Wada, Kazuyoshi Itoga, Teruo Okano, Hiroshi Sasaki, ANALYSIS FOR EFFECT OF CELL SHAPE ON HIPPO SIGNALING PATHWAY USING MICRO-FABRICATED CELL CULTURE PLATFORM, 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012), October. 28-November. 1. 2012, Okinawa, Japan

②和田健一、糸賀和義、岡野光夫、米村重信、佐々木洋、第 63 回日本細胞生物学会大会、Cell Shape and F-actin regulate Yap in parallel to canonical Hippo Pathway、2011 年 6 月 27-29 日、北海道大学（北海道）

〔その他〕

ホームページ等

(http://www.cdb.riken.go.jp/jp/04_news/articles/pdf/11/110915_hipposignaling.pdf)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 健一 (WADA KEN-ICHI)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・協力研究員

研究者番号：20525919

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし