

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790319

研究課題名(和文) Mob1A/Mob1Bによる発生と発癌制御

研究課題名(英文) Functions of Mob1A/1B in development and oncogenesis

研究代表者

西尾 美希(Nishio, Miki)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：10467897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo経路は接触抑制などを制御し、器官サイズや腫瘍の発症・進展制御に関わる新たなキナーゼ経路として注目されつつある。本研究では、Hippo経路の主要構成因子のひとつであり、Latsキナーゼのアダプター蛋白質として働くMob1A/1Bに注目し、Mob1A/1B遺伝子改変マウスを作製・解析を行なった。本研究からMob1A/1Bがマウス個体の初期発生に必須であること、種々の組織で強力ながん抑制遺伝子として作用し、特にヒト外毛根鞘がんの原因遺伝子であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The Hippo pathway is evolutionarily conserved, and the vertebrate Hippo pathway has been implicated in regulating cell contact inhibition, organ size, and tumorigenesis. The Mob1A/1B are the binding partners and strong co-activators of Lats kinases family, and the members of the Hippo pathway. However, the normal functions of Mob1A/1B proteins in vivo had been unknown. To define the functions of mammalian Mob1A/1B, we generated Mob1A and 1B null mutant mice. We showed Mob1A/1B double homozygous mutant mice died at gastrulation. Thus, Mob1A/B is essential for murine embryogenesis. Partially mutants developed a variety of tumors. Moreover, half of human trichilemmal carcinoma samples showed Mob1A/1B inactivation and YAP activation. These observations suggest that the loss of Hippo signaling molecules can be an important driver of cancer progression.

研究分野：13

科研費の分科・細目：6906

キーワード：発癌 Mob1 シグナル伝達 発生

1. 研究開始当初の背景

細胞間接触により増殖抑制がおこる‘接触抑制(コンタクトインヒビション)’現象は、形態形成、創傷治癒、幹細胞静止等に重要である。このことは以前から知られていたものの、接触抑制に関わる分子機構は殆ど不明であった。近年ショウジョウバエにおいて接触抑制に關与する Hippo 経路が同定された。Hippo 経路分子は、細胞レベルでは接触抑制、細胞死、細胞分化、細胞極性、上皮間葉転換等を制御することが報告されつつあり、個体レベルでは Hippo 経路分子の変異したショウジョウバエには劇的な器官サイズ変化をもたらすことから注目されつつある。現在では Hippo 経路哺乳類相同分子も同定され、細胞接触によって、あるいは様々なストレス刺激によって Hippo 経路が活性化されることがわかってきている。また、Hippo 経路分子の発現異常は、早期から多くの癌で高頻度に認められ、これは悪性度や予後とも相関することが報告されている。さらにこれまでに作製されたいくつかの Hippo 経路遺伝子変異マウス(Yap, Nf2, Rassf1, Lats1)において癌の発症を認めることから、Hippo 経路が癌の発症・進展の主要なシグナルであると考えられている。しかしながら哺乳類では、相同分子(Fat 4 種類; Rassf 10 種類; Mst 4 種類; Mob 6 種類; NDR 4 種類; Yap 2 種類)が極めて多く存在することから、全ての Hippo 経路にある分子の生理機能の全貌解明が大きな課題であった。また、これまでに作製された Hippo 経路遺伝子欠損マウスの多くは胎生致死であったため、多くの Hippo 経路分子の成体における役割は未だ不明のままであった。

2. 研究の目的

Hippo 経路の主要構成因子のひとつであり、ヒト腫瘍で高頻度に異常を認め、個体レベルの機能が未だ全く不明である Mob1A と Mob1B 遺伝子に注目し、Mob1A/Mob1B を介した発生・発癌制御機構、及び癌以外の病態の制御機構等を解明する。また各組織における Mob1A/1B の作用の共通性を明示し、広く Hippo 経路の作用の共通性を類推する。

3. 研究の方法

遺伝子改変動物を多用して、Mob1A/1B を介した発生・発癌制御機構、及び癌や癌以外の病態の制御機構を解明する。

(1)Mob1A/1B ダブル全身変異マウスの解析：準備実験より Mob1A/1B ダブルホモ欠損胚は早期致死であることから、発生のどの段階で障害をうけているのかを探る。また、Mob1A/1B 部分変異マウスの長期観察を行い、腫瘍形成以外の病態への関与を検索する。

(2)組織特異的 Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスの作製・解析：Mob1A/1B ダブルホモ欠損は致死であることから、成体における Mob1A/1B の生理的役割や Mob1A/1B 変異による腫瘍化の原因を探ることが困難であるために、角化

細胞特異的、肺上皮特異的、肝・胆管細胞特異的 Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスを作製し、これらの検討を行う。

4. 研究成果

(1)Mob1A/1B 全身ダブルホモ欠損マウスにみられる致死性とその原因の同定：Mob1A/1B の機能を明らかにするために、それぞれ単独遺伝子欠損マウスを作製したが、単独遺伝子欠損マウスは正常に発育し、表現型を見出せなかった。そこで次に Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスを作製したところ、着床直後に胎生致死となった(図1左)。また、Mob1A/1B ダブルホモ欠損胚では GATA4/6 や PDGFR α の発現に顕著な低下を認め、プラストシスト胚を *in vitro* 培養すると内部細胞塊の形成が不良であったことから、Mob1A/1B は発生の過程において原始内胚葉形成に重要であることを見出した(図1右)。

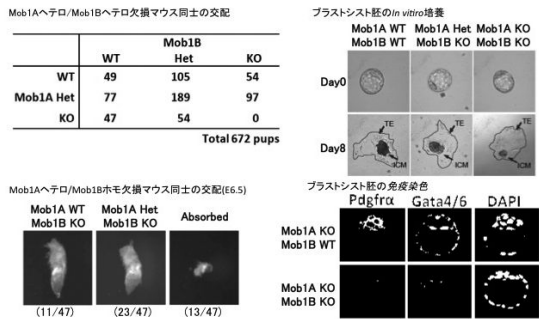


図1. 胎生致死と原始内胚葉形成障害

(2)Mob1A/1B 部分変異マウスにみられた腫瘍形成と腫瘍における LOH の有無：Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスであったが、Mob1A/1B 部分変異マウスを長期観察すると、皮膚癌、骨肉腫、筋線維肉腫、唾液腺腫瘍、乳癌、肝癌、肺癌などの様々な腫瘍形成を 80 週以内に全例で認め(図 2)、なかでも皮膚癌は全例発症していた。また、これらの Mob1A/1B 部分変異マウスでみられた腫瘍では残された野生型アリルに LOH が認められたことから、Mob1A/1B は古典的な癌抑制遺伝子として作用することが示唆された。その他に Mob1A/1B 部分変異マウスには、腫瘍形成の以外にも、歯芽の形成異常や骨梁数の増加、内耳有毛細胞の整列障害による平衡障害などの表現型もしばしば観察された。

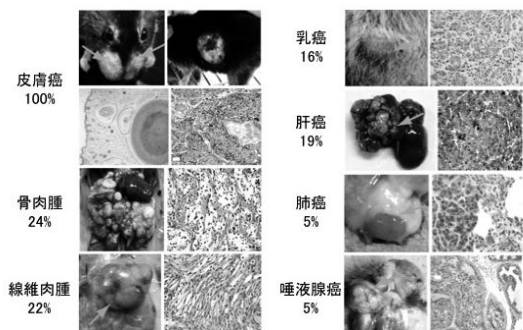


図2. Mob1A/1B部分変異マウスにみられる腫瘍形成

(3)角化細胞特異的 Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスの解析: Mob1A/1B 部分変異マウスの全例に皮膚腫瘍形成を認めたことから、角化細胞特異的な Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスを作製した。このマウスは口腔内上皮の肥厚による嚥下障害により、身体は小さく離乳期前後に致死となった。外観的には皮膚が肥厚し、毛髪は細く湾曲していた。組織学的には毛嚢間上皮および毛嚢の顕著な肥厚し、毛髪周期に伴う毛嚢の退縮が不明瞭であった。また不全角化が著しく、K14, K5, Sox9, Lgr5 などを発現するやや未分化ケラチノサイトが顕著に増加し、K10, Filaggrin などを発現する分化したケラチノサイトは減少していた。その他、細胞生物学的には、Mob1A/1B ダブルホモ欠損ケラチノサイトは、細胞増殖亢進、細胞死抵抗性、コンタクトインヒビション障害、未分化性や自己複製能亢進、中心体数異常や細胞分裂時間短縮などを認め、これらが癌の発症や進展に寄与したと思われる。生化学的には、Mob1A/1B 下流の Lats1/2 のリン酸化減少に加え、予期せぬことに Lats1/2 は総蛋白質量も著しく減少することから、Mob1A/1B は Lats1/2 蛋白質のリン酸化の増強のみならず安定化にも関与していることが示唆された。さらに、YAP1 のリン酸化は予想通り減少し、細胞密度が高いにも関わらず Yap1 が核に集積して活性化されていた。

(4)ヒト皮膚腫瘍における Hippo シグナル異常の頻度や特徴: Mob1A/1B 部分変異マウスにみられた皮膚癌は K17 陽性の外毛根鞘由来であることがわかった。そこでヒト外毛根鞘癌組織における Yap と Mob1 の発現を検討したところ、高頻度な Yap たんぱく質の発現増加と Mob1 たんぱく質の発現減弱をみとめたことから(図 3)、Mob1 を含む Hippo 経路分子の異常が外毛根鞘癌の原因遺伝子の一つであることを見出した。

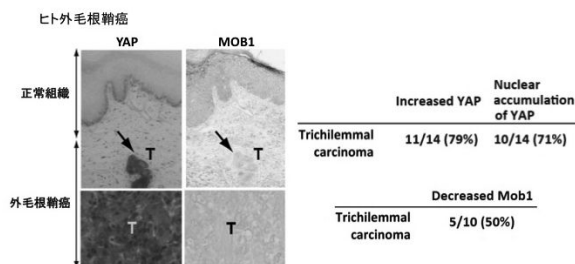


図3 ヒト外毛根鞘癌におけるHippo経路分子異常

(5)肺胞上皮特異的および肝・胆管細胞特異的 Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスの解析: 他の Hippo 経路分子変異マウスにおいて肝癌の報告があること、また Mob1A/1B 部分変異マウスにおいても肝癌を発症することから、肝・胆管細胞特異的 Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスを作製したところ、肝臓において著しい胆管様細胞の増生を認め、離乳期まで生存率は約 30%であった。また、離乳期をこえて生存したマウスでは高頻度に肝

癌・胆肝癌を発症することから、肝臓においても Mob1A/1B が正常な器官形成や腫瘍抑制に重要な役割を担っていることを見出しつつある。肺胞上皮特異的 Mob1A/1B ダブルホモ欠損マウスにおいても正常な肺胞腔形成への関与を見出しつつある。

以上のことから、本研究によって Mob1A/1B は初期発生に必須であること、また種々の癌の発症に関与し、特にヒト外毛根鞘癌の一因であること及びその発癌機構を示すことができた。今後は皮膚以外の各種組織における Mob1A/1B の機能解析や、Mob1A/1B 以外の Hippo 経路構成分子の機能を解析し、Hippo 経路が関与する生理機能の全貌と、その破綻疾患を明示したい。

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3件)

Dong Y, Sui L, Yamaguchi F, Kamitori K, Hirata Y, Hossain MA, Noguchi C, Katagi A, Nishio M, Suzuki A, Tokuda M.

The expression of PTEN in the development of mouse cochlear lateral wall.

Neuroscience. (査読有), 258(1), 263-9, 2014

doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.017. Epub 2013 Nov 16.

Nishio M, Otsubo K, Maehama T, Mimori K, Suzuki A Capturing the Mammalian Hippo: Elucidating Its Role in Cancer *CANCER SCIENCE* (査読有), 104(10), 1271-1277, 2013

doi: 10.1111/cas.12227. Epub 2013 Aug 7.

Nishio M, Hamada K, Kawahara K, Sasaki M, Noguchi F, Chiba S, Mizuno K, Suzuki SO, 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. (査読有) 122(12), 4505-18, 2012

doi: 10.1172/JCI63735. Epub 2012 Nov 12.

[学会発表](計14件)

西尾 美希、濱田浩一、河原康一、佐々木雅人、佐々木雄彦、三森 功士、森 正樹、鈴木 聡 遺伝子改変マウスを利用したがん抑制遺伝子の破綻病態研究

個体レベルでのがん研究支援活動ワークショップ特別招聘講演 2014年02月18日 大津

西尾美希、王 嘉、森川琢海、大坪孝平、藤 庸子、日笠弘基、板見 智、杉町圭史、三森功士、鈴木 聡

動物モデルによるHippo経路Mob1A/1Bの機能解析

**第72回日本癌学会学術集会 シンポジウム
「がん研究とモデル動物」**平成 25 年 10 月
5 日

西尾美希、濱田浩一、佐々木雄彦、板見
智、鈴木聡

Mob1A・Mob1Bによる発生・発がんの制御
**第35回日本分子生物学会年々会ワークシ
ョップ「腫瘍抑制シグナルの新局面」**平成
24 年 12 月 21 日

西尾美希、濱田浩一、佐々木雅人、王 嘉、
大坪孝平、佐々木雄彦、中西洋一、板見 智、
鈴木 聡

癌抑制遺伝子Mob1 の機能解析

**第84回日本生化学会学術集会シンポジウ
ム「Hippoシグナル伝達系研究の新展開」**
平成 23 年 9 月 21 日

板見 智 (ITAMI, satoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30136791

水野 健作 (MIZUNO, kensaku)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：70128396

千葉 秀平 (CHIBA, syuhei)

大阪大学・大学院生命科学研究科・特任助教

研究者番号：60572493

〔図書〕(計6件)

西尾美希、三森功士、森 正樹、板見 智、
鈴木 聡

Hippo経路分子MOB1 によるがん発症・進
展制御とがん治療戦略 □

**次世代がん戦略研究 update がん基盤生物
学 - 革新的シーズ育成に向けて -** □南山堂
p200-5, 2013

西尾美希、河原康一、佐々木雅人、前濱
朝彦、佐々木雄彦、三森功士、森 正樹、鈴
木 聡 □

核小体を起点としp53 を制御する新規分子
PICT1 による細胞増殖制御機構 □

実験医学増刊号 31 (2) 127-134, 2013

西尾美希、板見 智、鈴木 聡. □

Hippo経路分子MOB1 による発生と発がん
制御

実験医学 31 (8) 1280-1284, 2013

西尾美希、佐々木雄彦、鈴木 聡. □

PTEN変異による発がんモデル □

**疾患モデルの作製と利用 - がん エル・
アイ・シー社** 145-171, 2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/hassei/](http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/hassei/Home.html)
[/Home.html](http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/hassei/Home.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 美希 (NISHIO, miki)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：10467897

(2) 連携研究者

鈴木 聡 (SUZUKI, akira)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：10311565