

Hippo 経路の全貌解明とがん・再生医療への応用

熊本大学 大学院生命科学研究部 シグナル・代謝医学講座
諸石 寿朗

[I] 研究の目的

Hippo経路は2003年にショウジョウバエで器官サイズを制御するシグナルとして発見された細胞内シグナル伝達経路であり、近年、臓器の発生や大きさの制御、幹細胞や組織再生、また、がんの生物学に重要な役割を担うシグナル伝達系として注目を集めている^{1,2}。実験動物におけるHippo経路の改変は、臓器の巨大化や組織再生の障害など劇的な表現型を呈するため、Hippo経路を標的としたがんや再生医療の革新的治療法の開発が期待されている。しかしながら、この経路の研究の歴史はまだ浅いために、その経路の全体像や上流の制御機構、およびHippo経路が制御する生理機能や病態への関与は未だ謎の部分が多く、そのためHippo経路を標的とした薬剤や治療法の開発はほとんど進んでいない。本研究では、Hippo経路の分子機能の全貌を明らかにし、この経路を標的とした薬剤を開発することで、がんや組織再生などの革新的治療法の開発に向けた論理基盤を創出することを目的とした。

[II] 研究方法

上記の目的の遂行のため、本研究課題では主に以下の二つの項目に取り組んだ。

(1) Hippo経路の制御因子を網羅的に同定し、経路の全貌を解明する

Hippo経路の分子機能はLATS1/2キナーゼを中心としたリン酸化シグナルで、経路が活性化されるとLATS1/2キナーゼがリン酸化され活性化し、下流の転写共役因子であるYAP/TAZをリン酸化し分解へ導く³。これまでの研究においてHippo経路の活性を制御する多くの生理的シグナル(例：GPCRシグナルなどの細胞外リガンドや細胞の形態などの力学的シグナル、栄養シグナルやストレスシグナル) が明らかにされたが、これらのシグナルは細胞骨格のリモデリングを介してHippo経路にシグナルを伝達していると考えられている。しかしながら、アクチンなどの細胞骨格の変化がどのようにHippo経路の活性を制御するかの分子メカニズムは全く明らかになっていない。そこで、細胞骨格の変化に応じてHippo経路の活性に影響を与える分子の同定を試みる。

Hippo経路 (LATS1/2キナーゼの活性化) はYAP/TAZのリン酸化を介してYAP/TAZのユビキチン依存分解を引き起こすことが知られているため、Latrunculin Bなどのアクチン重合阻害剤で細胞を刺激しHippo経路を活性化させるとYAP/TAZの量が減少する。そこで、YAP/TAZにGFP蛍光タンパク質を融合したコンストラクトを培養細胞に導入することで、Hippo経路の活性を評価するレポーター細胞を作出する (すなわち、Hippo経路が活性化した細胞ではGFP蛍光強度が減弱し、逆にHippo経路が不活性化した細胞ではGFP蛍光強度が増強することが予想される)。レポーター細胞が機能するかを検討したのち、この細胞を使用してCRISPRライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニングを行い、細胞骨格の情報をHippo経路に伝える責任分子の網羅的同定を試みる。

(2) Hippo経路を標的とした薬剤を開発する

われわれは過去の研究において、がん細胞においてHippo経路を阻害すると宿主のがんに対する免疫応答が誘導され、がん細胞が破壊されることを発見した⁴。また、組織再生におけるHippo経路の阻害は一般に幹細胞の増殖を促進し、損傷治癒にポジティブに働くことが知られている⁵。そこで、培養細胞を用いた薬剤スクリーニング系を確立し、Hippo経路を標的とした薬剤の開発を試みる。

前述のように、Hippo経路の不活性化（LATS1/2キナーゼの阻害）はYAP/TAZを介した転写の活性化につながる。そこで、YAP/TAZの転写活性化によってluciferaseを発現するレポーター細胞を作出し、この細胞を用いて化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、Hippo経路の活性に影響を与える薬剤の同定を試みる。ヒットした化合物の確認実験としては、Hippo経路の上流キナーゼを用いたin vitro kinase assayや細胞でのYAP/TAZ活性化の評価などの細胞生化学実験を行う。

[Ⅲ] 結果と考察

(1) Hippo経路の制御因子の解明

Hippo経路の下流で、経路の活性化によって分解を受けることが知られている分子には、YAPおよびTAZがある。そこで、これらの転写共役因子のうち、どちらがよりHippo経路の活性化に応じてそのタンパク量を変化させるかをはじめに検証した。培養細胞を様々な方法で刺激し、Hippo経路の活性を変化させてcycloheximide chase法によりタンパク質の安定性を評価したところ、YAPの半減期は6時間以上であったのに対し、TAZの半減期は1時間程度で、Hippo経路の活性化により速やかに分解されることがわかった。そこで、TAZとGFP蛍光タンパク質を融合したコンストラクトを作出し、内在性のTAZと同様にTAZ-GFP融合タンパク質が分解されるかを調べた。その結果、Hippo経路の活性化によりTAZ-GFP融合タンパク質の分解が認められ、その半減期は数時間程度であったものの、Hippo経路の変化に伴うタンパク質量およびGFP蛍光強度の変化は、内在性TAZのように顕著な差を示さなかった。この原因として、1) レポーターにしたTAZ-GFP融合タンパク質の発現量が過剰であること、2) GFPと融合させたことでGFP同士のdimer化などの問題により高次構造を形成し、内在性のTAZのような速やかな分解制御を受けなくなってしまったこと、などが考えられる。これらの点を踏まえて、本研究項目はレポーターコンストラクトを再考・検討中である。今後は、Hippo経路の活性を鋭敏かつ迅速に反映するレポーター細胞の作出を中心に進め、そのような細胞を用いてCRISPRライブラリーを用いた遺伝学的スクリーニングを行う計画である。

(2) Hippo経路を標的とした薬剤の開発

まず、YAP/TAZの転写活性化によってluciferaseを発現するレポーター細胞を作出した。この細胞では、一度YAP/TAZの活性化が起こるとluciferaseが転写・翻訳され、自然に分解されるまでしばらくその活性を保有するため、前述のGFP融合レポーター細胞のように迅速なHippo経路の変化はモニタリングできないが、任意の刺激によるYAP/TAZ活性化の有無を評価する場合には適している。そこで、作出したレポーター細胞を用いて血清飢餓シグナルを与え（これによりHippo経路が活性化し、YAP/TAZを介した転写は抑制される）、その後血清で刺激することでYAP/TAZを介した転写を活性化したところ、刺激に応じてluciferase活性の上昇が認められた。これらの変化はYAP/TAZをノックダウンした細胞では起こらなかったことから、YAP/TAZの転写活性化によってluciferaseを発現するレポーター細胞が作出されたと判断した。

次にこのレポーター細胞を用いて、化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、Hippo経路を阻害してYAP/TAZの転写活性を増強する薬剤の同定を試みた。その結果、いくつかの化合物がYAP/TAZの転写活性化を引き起こすことがわかり、その後の生化学的な解析から、これらの化合物のうちいくつかは、LATS1/2キナーゼを阻害することにより、その効果を発揮することがわかった。これらの化合物を用いて、LATS1キナーゼのin vitro kinase assayを行ったところ、これらの化合物はLATS1のキナーゼ活性を直接抑制することがわかった。

そこで、これらの化合物のうち、最も効果の強かった化合物を用いて、マウス担がんモデルでの治療実験をおこなった。B16メラノーマモデルで化合物による治療を行ったところ、治療群では無治療群に比べてがん部に浸潤している活性化CD8陽性T細胞が増加しており、その結果、腫瘍の増殖が有意に抑制された。今後はより特異性・効果の高い化合物の同定を試みるとともに、他のがんモデルでの薬効の確認、およびDSS誘導性腸炎など組織再生モデルでの効果の検討などを行なっていく計画である。

[VI] 謝辞

これらの研究を通して得られた知見は、下記の論文発表に貢献した^{6,7,8,9}。また、本研究は公益財団法人アステラス病態代謝研究会からの研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

[V] 参考文献

1. Moroishi, T., Hansen, C.G., and Guan, K.L. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 73-79 (2015).
2. Hansen, C.G., Moroishi, T., and Guan, K.L. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol.* 25, 499-513 (2015).
3. Meng, Z., Moroishi, T., and Guan, K.L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 30, 1-17 (2016).
4. Moroishi, T., Hayashi, T., Pan, W.W., Fujita, Y., Holt, M.V., Qin, J., Carson, D.A., and Guan, K.L. The Hippo Pathway Kinases LATS1/2 Suppress Cancer Immunity. *Cell* 167, 1525-1539 (2016).
5. Moya, I.M., and Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 211-226 (2019).
6. Pan, W.W., Moroishi, T., Koo, J.H., and Guan, K.L. Cell type-dependent function of LATS1/2 in cancer cell growth. *Oncogene* 38, 2595-2610 (2019).
7. Verma, S., Yeddula, N., Soda, Y., Zhu, Q., Pao, G.M., Moresco, J., Diedrich, J.K., Hong, A., Plouffe, S., Moroishi, T., Guan, K.L., and Verma, I.M. BRCA1/BARD1 dependent ubiquitination of NF2 regulates Hippo-YAP1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 7363-7370 (2019).
8. Yamauchi, T., and Moroishi, T. Hippo Pathway in Mammalian Adaptive Immune System. *Cells* 8, 398 (2019).
9. Horiguchi, H., Kadomatsu, T., Kurahashi, R., Hara, C., Miyata, K., Baba, M., Osumi, H., Terada, K., Araki, K., Takai, T., Kamba, T., Linehan, W.M., Moroishi, T., and Oike, Y. Dual functions of angiopoietin-like protein 2 signaling in tumor progression and anti-tumor immunity. *Genes Dev.* 33, 1641-1656 (2019).