

Hippo-YAP シグナル伝達経路による異常細胞の排除

宮村 憲央, 仁科 博史

1. はじめに

肝臓は代謝や解毒を担う生命維持に必須の器官である。肝臓の細胞は生理機能上、常にさまざまなストレスにさらされる。ストレスは細胞の老化や傷害などを起こした異常細胞を誘導する。これら異常細胞は組織の機能不全や腫瘍形成の原因になるため、排除される必要がある。しかしながら、肝臓に生じる異常細胞の排除機構については不明な点が多く残されている。近年、老化肝細胞が獲得免疫に依存して肝臓から排除される機構が報告された。一方我々は、傷害肝細胞が獲得免疫に依存せずに排除される機構を発見した。この障害肝細胞排除には、器官サイズ調節シグナルのHippo-YAPシグナル伝達経路が関与していた。本シグナルは、ショウジョウバエの上皮組織や培養細胞においても異常細胞の排除に関与することが明らかにされている。本稿ではHippo-YAPシグナル伝達経路の観点から異常肝細胞の排除機構を中心に概説する。

2. 肝臓形成不全メダカ変異体の単離と解析

我々は、肝形成や肝機能の不全の原因探索を目的として、1990年代の終わりに行われた小型魚類メダカを用いた大規模スクリーニングに参加した¹⁾。スクリーニングの結果、我々は約20種の肝形成および肝機能不全変異体を単離することに成功し、得られた変異体を表現型から五つのグループ（第1群：肝芽形成不全、第2群：肝臓低形成、第3群：肝臓位置異常、第4群：胆嚢色異常、第5群：脂質代謝異常）に分類し、2004年に報告した²⁾。

第1群に分類された *hirame* (*hir*) 変異体は、からだ全体

が扁平であり、腸管がつぶれることで、肝芽形成が不全となるユニークな表現型を示した。ポジショナルクローニングの結果、転写共役因子YAPをコードする遺伝子に変異が見つかった³⁾。興味深いことに、*hir* 変異体では細胞張力が低下しており、細胞の重力への抵抗性が減弱していることが見いだされた。細胞標識実験から、*hir* 変異体では細胞張力の異常により、背腹軸方向へと細胞が積み上がり、神経管などの上皮組織が扁平化することが明らかになった（図1A）。分子機構の解析から、活性化YAPがアクチンの重合/脱重合を制御して、重力に抵抗する細胞張力を生じさせること、また細胞外のフィブロネクチンの線維化を調節することが示された（図1B）。これまでに細胞外からの刺激はアクチン重合を介してYAPを活性化することが知られている。すなわち、アクチン重合を介したYAPによる細胞外基質環境のフィードバック制御機構の存在が明らかになった。

3. 肝臓サイズと肝がん発症を制御するHippo-YAPシグナル伝達経路

がん抑制シグナルとして知られるHippoシグナル伝達経路は、YAPをリン酸化する（図2A）⁴⁾。リン酸化されたYAPは、細胞質に局在化し、分解される。一方、リン酸化を受けていないYAPは核内に移行し、転写因子と結合し、細胞増殖や細胞死に関する遺伝子の発現を誘導する。興味深いことに、ショウジョウバエのHippoのオーソログであるMST1とMST2の肝臓特異的ダブルノックアウトマウスは、生後2か月で正常な肝臓と比較してサイズが5倍まで増大し、生後3~6か月で肝がんを発症した⁵⁾。Sav1やMerなど他のHippo経路構成分子のノックアウトマウスでも、肝臓サイズの増大と肝がんの発症が報告された⁴⁾。さらに、ドキシサイクリン（Dox）依存的に肝臓でYAPを過剰発現するように作出されたトランスジェニックマウスでは、Doxを投与することで、肝臓のサイズが約5倍まで増大した（図2B）⁶⁾。Dox投与を中止すると元のサイズまで減少した。一方、2か月以上の長期間にわたってDoxを持続投与するとサイズ制御は破綻し、肝がんを発症した。このように、Hippo-YAP経路は肝臓サイズおよび肝がん発症を制御することが示された。

東京医科歯科大学難治疾患研究所発生再生生物学分野（〒113-8510 東京都文京区湯島1-5-45）

Abnormal cell elimination induced by Hippo-YAP signaling pathway

Norio Miyamura and Hiroshi Nishina (Department of Developmental and Regenerative Biology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900804

© 2018 公益社団法人日本生化学会

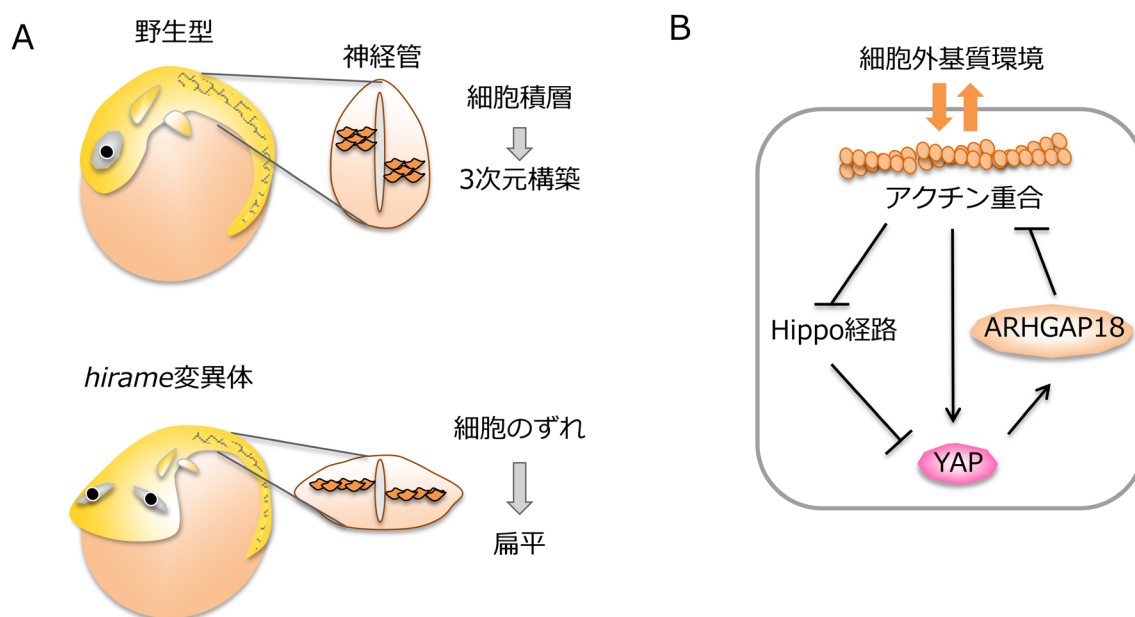


図1 YAPによる3次元器官形成の制御

(A)野生型メダカの場合は、背腹軸方向に細胞を積層できる。一方、*hir*変異体は細胞を積層できず、扁平になる。(B)YAPは、細胞外基質など細胞外環境からのシグナルを介したアクチンの重合の促進によって活性化する。活性化したYAPは、ARHGAP18を介してアクチンの重合を抑制する。アクチンの重合は細胞外基質であるフィブロネクチンを制御する。

4. 適応度の低い細胞を組織から排除する細胞競合現象

1975年にショウジョウバエを用いたモザイク解析により、組織を構成する同種の細胞間で適応度の高い細胞が適応度の低い細胞を排除し恒常性を維持する現象が報告された⁷⁾。ショウジョウバエ成虫翅原基の上皮細胞において、野生型細胞に囲まれた*Minute*ヘテロ変異細胞は、細胞死により排除され、生き残った野生型細胞は代償的に増殖する現象が観察された(図3)。*Minute*変異とは、リボソームタンパク質をコードする一連の遺伝子変異の総称である。一方、*Minute*ヘテロ変異細胞のみからなる成虫翅原基では本排除現象は観察されなかった。本排除現象は細胞競合と名づけられ、排除された細胞は敗者、生き残った細胞は勝者と呼ばれている。2000年代になって、細胞競合に関与する分子やシグナルとしてMyc, JNKシグナルおよび、Hippo-YAP経路の構成因子であるHippo, Warts, Mats, Yki(YAPのオーソログ)などが次々に同定された⁸⁾。

哺乳動物において、細胞競合を観察する実験系として「哺乳動物培養細胞を用いた細胞競合実験系」が報告された⁹⁾。本実験系では、まずイヌ腎尿細管上皮由来MDCK細胞を用いて、Dox依存的に特定の遺伝子を発現する細胞株が樹立された。樹立された細胞は赤色色素による標識後に、親株であるMDCK細胞と混合培養され、Dox添加後の赤色細胞の動態が評価された。本実験系により、がん遺伝子であるRas (G12V)を発現する細胞が親株MDCK細胞に

囲まれた場合に、頂端面へ突出(細胞突出)し排除されることが示された。

我々はこの実験系を用いてYAP活性化細胞の動態を調べることににより、哺乳動物の細胞競合へのYAPの関与を検討した¹⁰⁾。YAPにはLATSによりリン酸化を受けるセリン残基が5か所存在していることが知られている。まず我々はこの5か所のLATSリン酸化部位のセリンをアラニンに置換し、Hippo経路による制御を受けず遺伝子の転写活性が上昇する活性型模倣体YAP (5SA)を作出した。Dox依存的にYAP (5SA)を発現するMDCK細胞を樹立し、親株MDCK細胞とYAP (5SA)発現細胞を混合培養し、Dox添加後のYAP (5SA)発現細胞の動態を観察した。比較として野生型であるYAP (WT)発現細胞を用いた。その結果、YAP (WT)発現細胞を混合培養した場合には細胞突出は観察されず、すべての細胞をYAP (5SA)発現細胞にした単独培養の場合においても、細胞突出は観察されなかった。一方で、YAP (5SA)発現細胞を混合培養した場合には細胞突出が観察された。これらの結果はYAP (5SA)発現細胞が敗者様の表現型になることを示している。加えて、核移行に関与するPDZ binding motifまたは転写因子TEADと結合するTEAD binding domainをそれぞれ欠損または変異誘導したYAP (5SA/ Δ PDZ), YAP (5SA/TEAD*)を作出し、同様に混合培養における動態を観察した。その結果、YAP (5SA/ Δ PDZ)発現細胞において細胞突出は顕著に抑制され、YAP (5SA/TEAD*)発現

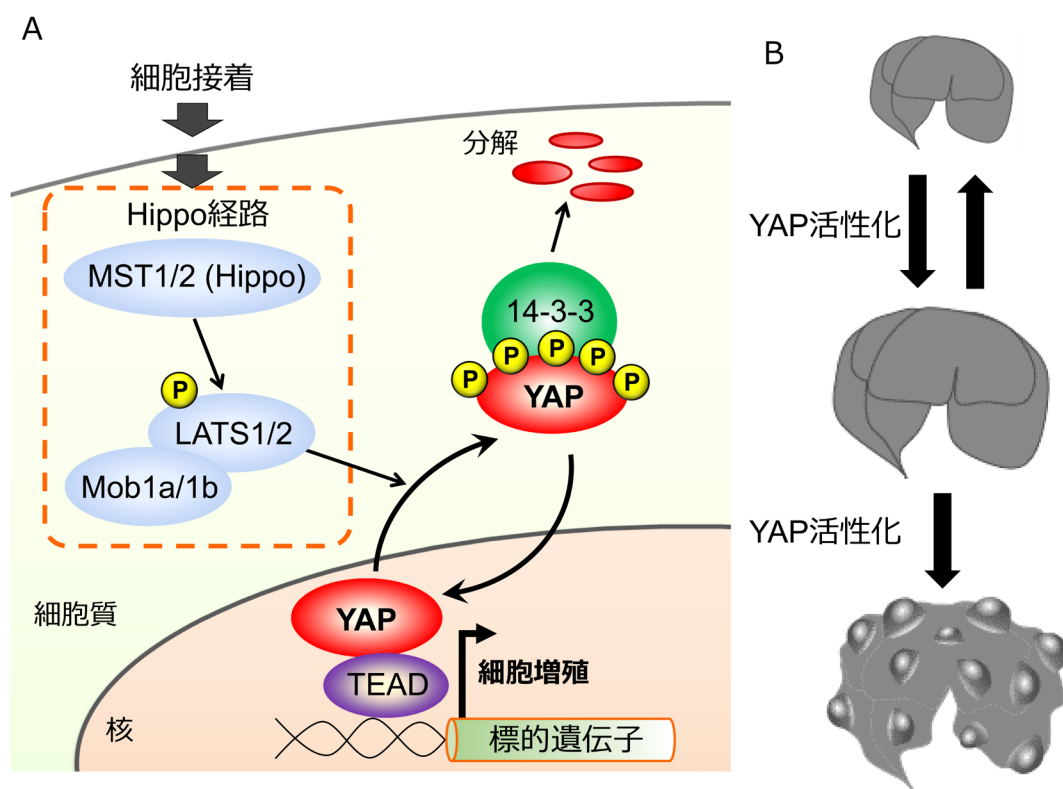


図2 Hippo-YAPシグナル伝達経路

(A) MST1/2 (ショウジョウバエのHippoのオーソログ), LATS1/2, Mob1a/1bなどから構成されるHippo経路は, 細胞接着などで活性化し, YAPをリン酸化する. リン酸化されたYAPは14-3-3と結合し細胞質へ局在化し, 分解される. リン酸化されていないYAPは核内へ移行し, 転写因子TEADと結合し, 遺伝子発現を誘導する. (B) YAPの活性化は肝臓の肥大を誘導し, YAPを再び不活性すると肝臓のサイズは元に戻る. しかし, 2か月以上の持続的なYAPの活性化は, サイズ制御の可逆性を失わせ, 肝がんを誘導する.

細胞においては完全に細胞突出が抑制された. また, 周辺細胞の状態を変えることで, YAP (SSA) 発現細胞は, 敗者から勝者へと表現型を変化させた. 以上の結果から, 活性型YAP発現細胞の細胞突出にTEADを介した転写活性が必須であること, この表現型は周辺環境に依存することが示された.

5. 老化および傷害肝細胞をマウス肝臓から排除する機構

マウス肝臓を用いて, がん遺伝子Rasによって誘導される老化肝細胞の動態が解析された¹¹⁾. 水圧によって外来遺伝子を細胞へ導入するHydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法と, 外来遺伝子をゲノムへ挿入するSleeping Beauty法を組み合わせることで, 野生型マウスの肝臓へモザイク状に活性型Ras遺伝子を導入する実験が行われた. その結果, 導入から6日目までに活性型Ras発現肝細胞の細胞老化が誘導され, 60日目までに肝臓からはほぼ消失した (図4). 次に, 老化肝細胞消失の原因探索が行われた. ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色の結果, 活

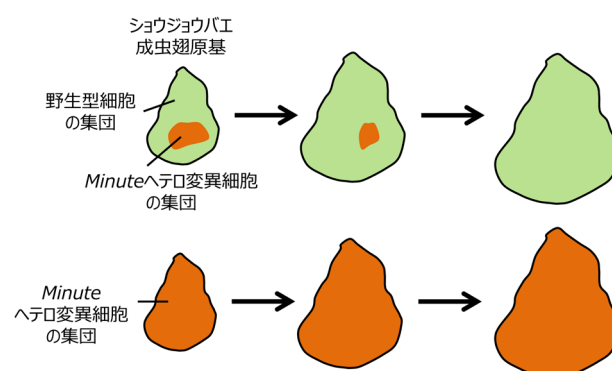


図3 ショウジョウバエの細胞競合

ショウジョウバエの成虫翅原基において, Minuteヘテロ変異細胞と野生型細胞がモザイク状に存在する場合は, 発生が進むにつれて, Minuteヘテロ変異細胞が細胞死によって排除され, 野生型細胞に置き換わる. 一方, Minuteヘテロ変異細胞のみで存在する場合は, 本排除は起こらない.

性型Ras発現老化肝細胞の周囲には免疫系細胞の集積が観察された. FACS解析の結果, CD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞の増加が明らかになった. T細胞を欠失するSCID/beige免疫不全マウスを用いた結果, 活性型Ras発現

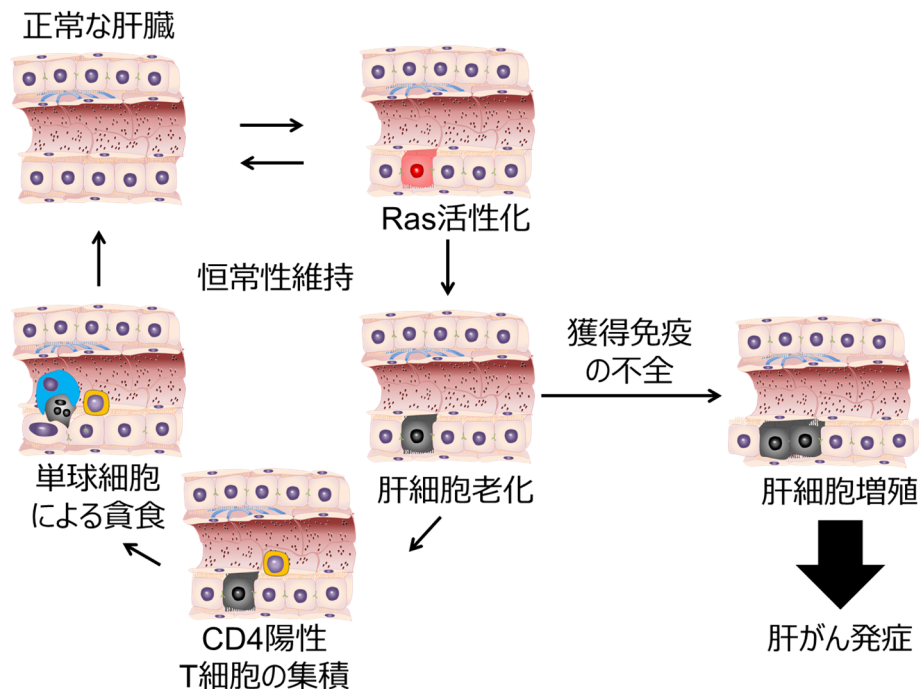


図4 Ras誘導性老化肝細胞の排除

活性化型Rasの発現によって肝細胞は細胞老化する。Ras誘導性老化肝細胞の周囲に、CD4陽性T細胞が集積する。Ras誘導性老化肝細胞は、単球細胞によって貪食され肝臓から排除される。一方、獲得免疫が不全になると、Ras誘導性老化肝細胞は排除されず、細胞増殖し、肝がんを発症する。

老化肝細胞の排除は抑制された。CD4またはCD8のノックアウトマウスを用いた結果、CD8の欠損では老化肝細胞は排除されたが、CD4の欠損では老化肝細胞の排除は抑制された。興味深いことに、活性化型Ras発現老化肝細胞の排除が起こらないマウスでは、4か月後には肝細胞がんを発症した。以上の結果から、活性化型Ras発現老化肝細胞の残存はがん発症の原因になることが示された。

肝臓のサイズを制御するHippo経路のノックアウトマウスやYAPのトランスジェニックマウスの解析によって、YAPの活性化は肝肥大と肝がん発症を誘導することが示された^{5, 6, 12)}。しかしながら、YAP活性化肝細胞の詳細な動態は不明な点が多い。我々は肝臓におけるYAP活性化肝細胞の動態を明らかにするため、マウス肝臓でモザイク解析を行った¹³⁾。その結果、アデノウイルスベクターを用いて肝臓内の約30%の肝細胞に活性化型YAPを発現させた場合は、体重に対する肝重量の割合（肝サイズ）が通常の6%から7日間で10%まで肥大した。細胞レベルの動態を解析すると、活性化型YAP発現肝細胞の増殖が観察された（図5A左）。一方、HTVi法を用いて約30%の肝細胞に活性化型YAPを発現させた場合は、肝サイズは6%のまま変化しなかった。興味深いことに、1日目に約30%存在した活性化型YAP発現肝細胞は、7日間で約3%まで減少した。YAP

活性化肝細胞が増殖せずに逆に減少するという現象はこれまでに報告されておらず、本現象は新規の細胞応答であると考えられた。そこで、細胞数減少の原因探索を行った。T細胞を欠失するNOG免疫不全マウスを用いた結果、YAP活性化肝細胞は減少し、本現象は獲得免疫非依存的であることが示された。組織染色を行った結果、YAP活性化肝細胞は、類洞へ細胞移動し、細胞死を起こした後、クッパー細胞によって貪食され、排除されることが判明した（図5A右）。

アデノウイルスベクターとHTVi法で異なる細胞応答が誘導された原因は何か？我々は、遺伝子導入の際に肝傷害が生じるか否かの違いが、YAP活性化肝細胞の応答の違いを生む原因ではないかと考えた。そこで、アデノウイルスベクターを用いて活性化型YAPを発現誘導した後に、肝臓へ各種傷害を加え、細胞増殖から細胞排除へと表現型が変化するか否かを検討した。その結果、CCl₄投与の付加で肝細胞に、モノクローリン投与の付加で類洞内皮細胞にそれぞれ特異的に傷害を与えた場合には、細胞排除は誘導されなかった。一方、HTVi法の手技やエタノール投与の付加によって、肝細胞と類洞内皮細胞の両者に傷害を与えた場合には細胞排除が誘導された¹⁴⁻¹⁶⁾。これらの結果から、肝細胞と類洞内皮細胞の両者へ傷害が加わった場合には、YAP活性化傷害肝細胞が排除されることが示唆された。

分子機構の解析から、転写因子TEADを介したYAPの

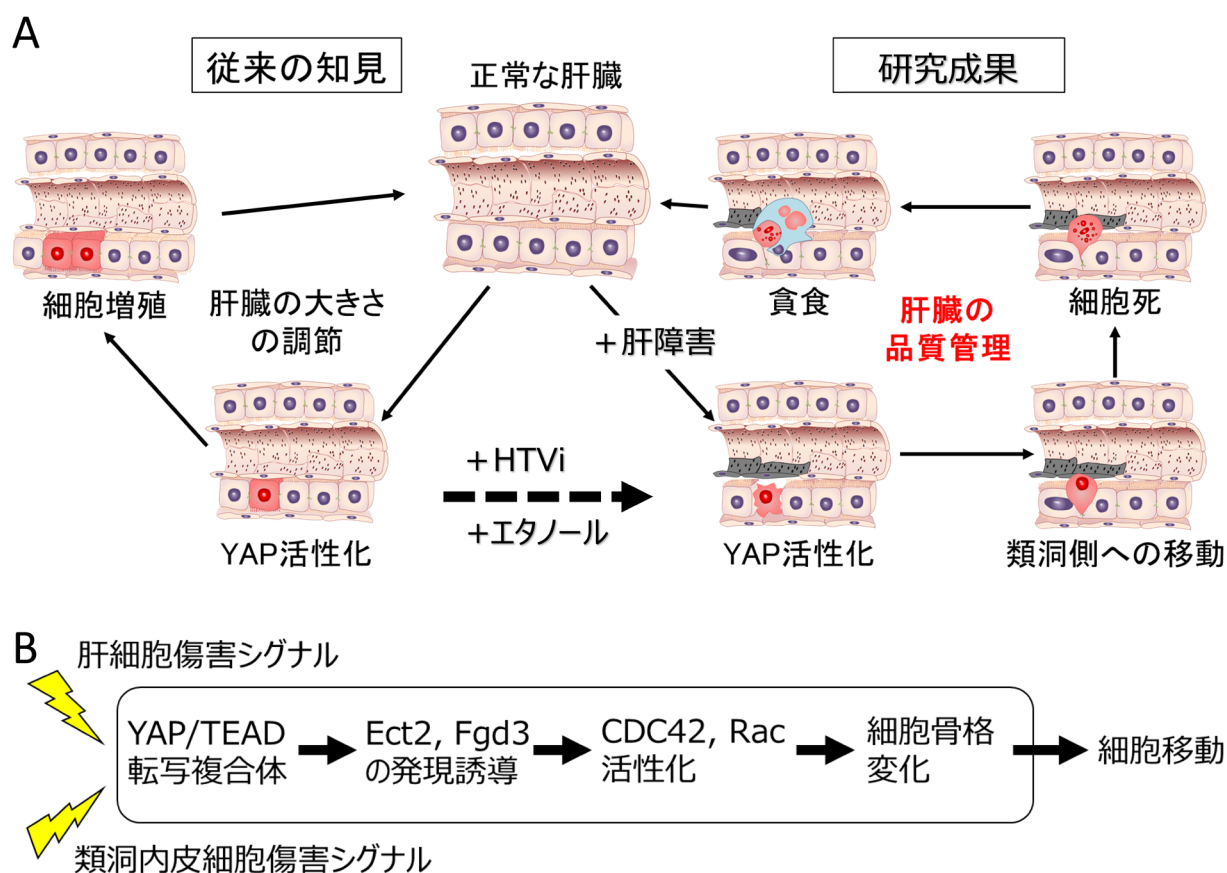


図5 YAP誘導性の肝細胞増殖と傷害肝細胞排除

(A) 傷害のない肝細胞では、YAPの活性化は細胞増殖を誘導する(左)。一方、傷害を受けた肝細胞では、YAPの活性化は細胞排除を誘導する(右)。(B) YAPとTEAD依存的に、Ect2とFgd3が発現誘導され、CDC42やRacが活性化され、細胞骨格の変化が生じる。その結果、傷害肝細胞は排除される。

転写活性が細胞排除に必須であることが判明した。マイクロアレイ解析およびGene Ontology解析の結果、細胞移動を制御する低分子量Gタンパク質CDC42およびRacの関与が示唆された。そこで、CDC42およびRacのドミナントネガティブ体を共発現させた結果、細胞排除が抑制されることが見いだされた。マイクロアレイデータから、CDC42およびRacの活性化因子(guanine nucleotide exchange factor: GEF)であるEct2とFgd3が同定された。遺伝子発現解析から、傷害肝細胞排除が誘導される条件で、Ect2およびFgd3遺伝子の発現が特異的に亢進していることが明らかとなった。以上の結果から、肝細胞と類洞内皮細胞の両者へ傷害が加わった場合に、YAP-TEAD依存的にEct2およびFgd3遺伝子の発現が亢進し、細胞移動と細胞死が誘導され、クッパー細胞によって貪食されることで傷害肝細胞が排除されることが示された(図5B)。

6. おわりに

小型魚類の変異体を用いることで、YAPの3次元器官形

成における役割が明らかになった。また、ショウジョウバエ、培養細胞、マウスを用いることで、細胞の品質管理の機構が明らかになった。このように、異なるモデル生物を用いることで、「高次の細胞社会である組織や器官がどのような仕組みで形成され、維持されるのか？」という疑問が解明されつつある。

哺乳動物培養細胞を用いて見いだされたYAP誘導性の上皮細胞排除は、細胞競合と類似の現象と考えられる。一方、マウス肝臓を用いて見いだされたYAP誘導性の傷害肝細胞排除は傷害刺激を必要とし、細胞競合現象であるのかは検討を要する。

Ras誘導性の老化肝細胞は、獲得免疫に依存して1週間以上かけて排除される。一方、YAP誘導性の傷害肝細胞は、獲得免疫に依存せず数日以内に迅速に排除される。老化肝細胞と比較して、傷害肝細胞の場合は、炎症誘導分子などを放出する危険があるため、肝臓内から迅速に排除される必要があると考えられる。Hippo-YAP経路は傷害肝細胞を迅速に除去する品質管理のセンサーとしての役割を担っていることが示唆される。

YAP誘導性の傷害肝細胞排除は、YAPのがん抑制遺伝子としての機能を示唆している。一方、YAPは肝線維症や肝がんの悪性化に寄与することが報告されている^{17, 18)}。この事実、YAPのがん原遺伝子としての機能を示している。YAPはがん抑制遺伝子とがん原遺伝子の二面性を外環境の状況に応じて使い分け、細胞品質管理や病態発症に寄与していると考えられる。

文 献

- 1) Furutani-Seiki, M. & Wittbrodt, J. (2004) Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech. Dev.*, **121**, 629–637.
- 2) Watanabe, T., Asaka, S., Kitagawa, D., Saito, K., Kurashige, R., Sasado, T., Morinaga, C., Suwa, H., Niwa, K., Henrich, T., et al. (2004) Mutations affecting liver development and function in Medaka, *Oryzias latipes*, screened by multiple criteria. *Mech. Dev.*, **121**, 791–802.
- 3) Porazinski, S., Wang, H., Asaoka, Y., Behrndt, M., Miyamoto, T., Morita, H., Hata, S., Sasaki, T., Krens, S.F.G., Osada, Y., et al. (2015) YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature*, **521**, 217–221.
- 4) Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K.L. (2016) Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.*, **30**, 1–17.
- 5) Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J.S., Payer, B., Yin, Y., Lauwers, G.Y., Thasler, W., Lee, J.T., Avruch, J., et al. (2009) Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell*, **16**, 425–438.
- 6) Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., & Pan, D. (2007) Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell*, **130**, 1120–1133.
- 7) Morata, G. & Ripoll, P. (1975) Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.*, **42**, 211–221.
- 8) Merino, M.M., Levayer, R., & Moreno, E. (2016) Survival of the Fittest: Essential Roles of Cell Competition in Development, Aging, and Cancer. *Trends Cell Biol.*, **26**, 776–788.
- 9) Hogan, C., Dupre-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A.E., Piddini, E., Baena-Lopez, L.A., Vincent, J.P., Itoh, Y., et al. (2009) Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 460–467.
- 10) Chiba, T., Ishihara, E., Miyamura, N., Narumi, R., Kajita, M., Fujita, Y., Suzuki, A., Ogawa, Y., & Nishina, H. (2016) MDCK cells expressing constitutively active Yes-associated protein (YAP) undergo apical extrusion depending on neighboring cell status. *Sci. Rep.*, **6**, 28383.
- 11) Kang, T.W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011) Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, **479**, 547–551.
- 12) Song, H., Mak, K.K., Topol, L., Yun, K., Hu, J., Garrett, L., Chen, Y., Park, O., Chang, J., Simpson, R.M., et al. (2010) Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1431–1436.
- 13) Miyamura, N., Hata, S., Itoh, T., Tanaka, M., Nishio, M., Itoh, M., Ogawa, Y., Terai, S., Sakaida, I., Suzuki, A., et al. (2017) YAP determines the cell fate of injured mouse hepatocytes in vivo. *Nat. Commun.*, **8**, 16017.
- 14) Zhou, T., Kamimura, K., Zhang, G., & Liu, D. (2010) Intracellular Gene Transfer in Rats by Tail Vein Injection of Plasmid DNA. *AAPS J.*, **12**, 692–698.
- 15) Seth, D., D'Souza El-Guindy, N.B., Apte, M., Mari, M., Dooley, S., Neuman, M., Haber, P.S., Kundu, G.C., Darwanto, A., de Villiers, W.J., et al. (2010) Alcohol, signaling, and ECM turnover. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, **34**, 4–18.
- 16) Cohen, J.I. & Nagy, L.E. (2011) Pathogenesis of alcoholic liver disease: interactions between parenchymal and non-parenchymal cells. *J. Dig. Dis.*, **12**, 3–9.
- 17) Johnson, R. & Halder, G. (2014) The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**, 63–79.
- 18) Yimlamai, D., Fowl, B.H., & Camargo, F.D. (2015) Emerging evidence on the role of the Hippo/YAP pathway in liver physiology and cancer. *J. Hepatol.*, **63**, 1491–1501.

著者寸描

●宮村 憲央 (みやむら のりお)



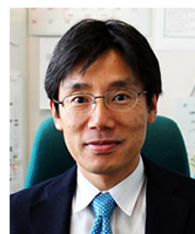
米国コロンビア大学Associated Research Scientist. 理学博士。

■略歴 1984年大阪府で生まれる。2008年神戸薬科大学薬学部卒業。13年東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部博士課程修了。日本学術振興会特別研究員、東京医科歯科大学難治疾患研究所助教などを経て、18年より米国コロンビア大学Associated Research Scientist。

■研究テーマと抱負 組織の恒常性維持をテーマに抗がん剤開発の研究に従事している。薬剤師免許を持つ理科学研究者として、広い視野を持って研究に臨みたいと思っています。

■趣味 体を動かしたりスポーツ観戦をして、頭と体をリフレッシュすること。

●仁科 博史 (にしな ひろし)



東京医科歯科大学難治疾患研究所教授。理学博士。

■略歴 1961年埼玉県で生まれる。90年東京大学大学院理学研究科生物化学専攻博士課程修了。同年東京工業大学生命理工学部生命理学科助手。95年カナダ国トロント大学／オンタリオ癌研究所博士研究員。98年東京大学薬学部助教授を経て、2005年より現職。

■研究テーマと抱負 組織・器官の発生と再生の不思議さをシグナル伝達の観点から解明したい。

■ウェブサイト <http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/index.html>

■趣味 食べ歩きとハーフマラソン。体の変化に興味を持っています。