

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服実用化研究事業(肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構の発見とその解明」

研究分担者氏名 : 仁科 博史

所属機関 : 東京医科歯科大学 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構が存在すると考えられるが、その実体は不明な点が多い。我々は免疫系とは独立した異常細胞の排除機構が存在することを発見したので、この機構の解析を目的とした。

【方法】肝臓のサイズと肝がん抑制を制御する Hippo シグナル伝達経路とその標的分子 YAP に注目した。ROSA マウスや免疫不全 NOG マウス等の尾静脈から hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法でプラスミド DNA を導入し、活性型 YAP を発現誘導しモザイク状に異常肝細胞を誘導した。肝臓サイズの測定と共に誘導された異常肝細胞の運命を追跡した。さらに本細胞応答に関与する遺伝子発現を cDNA アレイによって解析した。

【成績】活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、遺伝子導入後 3～7 日で排除されることを見出した。免疫不全 NOG マウスでも同様の排除現象が観察されたことから、本現象は免疫非依存的な現象であることが判明した。cDNA アレイ解析の結果、細胞移動や細胞増殖に関与する遺伝子発現の誘導が観察された。

【考案】これまで老化した肝細胞が免疫系によって排除されることが報告されていたが、免疫非依存的な異常肝細胞の排除現象の報告はない。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がることが期待される。自己骨髄細胞を用いた療法による効果と関連しているかの検討が重要と考える。

A. 研究目的

自己骨髄細胞を用いた療法はその有効性が示されつつあるが、その作用点は複数あると考えられる。肝臓自身が持つ恒常性維持機構を高める作用もその一つであると考えられる。それ故、

肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構を明らかにすることは重要である。また、恒常性維持機構の増強ができれば、予防医学に貢献できる。それ故、本研究では、我々が新たに見出した免疫系とは独立した異常細胞の排除機構の解析を目的とした。

B. 研究方法

各種のヒトがん器官サイズを制御する Hippo シグナル伝達経路および標的分子 YAP が関与することが国内外の研究者から報告されている。そこで活性化型 YAP をモザイク状に正常肝臓に導入することで、異

常肝細胞を正常肝細胞集団の中に誘導した。モザイク発現を可能にする hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法を用いて、マウスの尾静脈からプラスミド DNA を導入した。野生型 B6 マウスや免疫不全マウス NOG マウス、細胞運命を追跡可能な ROSA マウスを用いて、異常肝細胞の運命を解析した。さらに本細胞応答に関与する遺伝子発現を cDNA アレイによって解析した。

C. 研究結果

活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、免疫系の有無に関わらず、遺伝子導入後 7 日以内に排除されることを見出した。細胞死による排除ではなく、管腔側への突き出しが原因であった。興味深いことに、抜けた空間を埋めるように代償性増殖も観察された。これら誘導された細胞応答は cDNA アレイの結果からも支持された。

D. 考察

本研究で、免疫依存性の異常細胞排除機構に加えて、免疫非依存性の異常細胞排除機構が存在することが明らかになった。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がることを期待される。自己骨髄細胞を用いた療法の有効性の一端はこの機構の能力向上であるかを検討することは今後の重要な課題であると考えられる。肝疾患に対する療法のみならず、予防医学への貢献も期待できる。

E. 結論

成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構を発見した。正常肝細胞集団の中に異常な肝細胞が生じると作動する恒常性維持機構と考えられる。本機構に関与する分子機構の解明が期待される。また、自己骨髄細胞を用いた療法による効果との関連が興味深い。

研究発表

1. 論文発表

1. Sean Porazinski, Huijia Wang, Yoichi Asaoka, Martin Behrndt, Tatsuo Miyamoto, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabby Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina*, Carl-Philipp Heisenberg* and Makoto Furutani-Seiki* (*Corresponding authors). YAP is essential for tissue tension to ensure

vertebrate 3D body shape. **Nature**, 2015; in press

2. Yuta Motimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima. Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebrafish. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2015; 457: 493-499.

3. Yoichi Asaoka, Shoji Hata, Misako Namee, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina. The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. **PLoS ONE** 2014; 9: e97365.

4. Tadanori Shimomura, Norio Miyamura, Shoji Hata, Ryota Miura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina. The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2014; 443: 917-923.

5. Zeyu Yang, Kentaro Nakagawa, Aradhan Sarkar, Junichi Maruyama, Hiroaki Iwasa, Yijun Bao, Mari Ishigami-Yuasa, Shigeru Ito, Hiroyuki Kagechika, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, Shinya Abe, Masanobu Kitagawa, Yutaka Hata. Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators

identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model.

Mol. Cell. Biol. 2014; 34: 1607-1621.

6. Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki. Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardiac fibrosis induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo. ***J. Biochem.*** 2014; 155: 235-241.

7. Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Koichi Fujisawa, Tsuyoshi Ishikawa, Yohei Urata, Haruko Tanimoto, Takuya Iwamoto, Yuko Mizunaga, Takashi Matsuda, Takashi Oono, Miho Marumoto, Guzel Burganova, Luiz Fernando Quintanilha, Isao Hidaka, Yoshio Marumoto, Issei Saeki, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Kenji Tani, Yasuho Taura, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita, and Isao Sakaida. Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. ***Tissue Engineering Part B: Reviews*** 2014; 20: 1-5.

2. 学会発表

1. 仁科博史；器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態[神戸大学医学部セミナー；2014年1月10日/神戸]

2. 仁科博史；Mouse Embryonic Stem Cell-Based Drug Screen for Novel Modulators of Cell Differentiation in Early Mammalian Embryogenesis[熊本大学 HIGO Program；2014年2月12日/熊本]

3. 内田好海、仁科博史；マウス胚性幹細胞を用いた薬剤スクリーニングによる三胚葉分化制御シグナルの同定とスタチン催奇性発症機構の解明 [第20回日本肝臓医生物学研究会；2014年2月15日/東京]

4. 有馬誉恵、仁科博史；マウス初期胚におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析 [第134回日本薬学会；2014年3月27-30日/熊本]

5. Ruoxing Yu and Hiroshi Nishina；Assessment of teratogenic mechanisms of FDA pregnancy category D and X drugs using murine ES cell-derived 3D culture system [第134回日本薬学会；2014年3月27-30日/熊本]

6. 仁科博史；器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態[東京女子医科大学セミナー；2014年5月29日/東京]

7. 内田好海、仁科博史；スタチンの初期胚発生に対する作用機構の解明 [第13回生命科学研究会；2014年6月20-21日/札幌]

8. 浅岡洋一、仁科博史；器官サイズ制御因子 Yap の網膜視細胞分化における機能解析 [第13回生命科学研究会；2014年6月20-21日/札幌]

9. 宮村憲央、仁科博史；成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達

- 系破綻は細胞排除を誘導する[第 21 回肝細胞研究会;2014年6月27-28日/東京]
10. 内田好海、仁科博史;スタチン催奇性の分子機構の解明[第 21 回肝細胞研究会; 2014年6月27-28日/東京]
 11. 仁科博史;器官サイズを制御する転写共役因子 YAP の役割 [第 23 回日本 Cell Death 学会; 2014年7月18-19日/東京]
 12. 浅岡洋一、仁科博史;器官サイズを制御する Hippo-Yap シグナル伝達系の網膜分化における機能解析 第 23 回日本 Cell Death 学会; 2014年7月18-19日/東京]
 13. 浅岡洋一他; Hippo signaling regulates a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. [日本比較生理生化学会第 36 回大会; 2014年7月28日~8月1日/札幌]
 14. 濱部凜他; ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *Per2* と *Cry1a* の解析 [第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム;2014年9月20-21日/富山]
 15. 浅岡洋一、仁科博史; Hippo-Yap signaling acts as a molecular switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation. [第 20 回小型魚類研究会; 2014年9月20-21日/東京]
 16. 平山順他; Study on a light signaling pathway for circadian entrainment in zebrafish. [第 20 回小型魚類研究会;2014年9月20-21日/東京]
 17. 濱部凜他; ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *zPer2* および *zCry1a* の解析 [第 3 回修飾シグナル病若手ワークショップ;2014年9月30-10月2日/湯河原]
 18. 宮村憲央、仁科博史; Hippo シグナル系破綻によって誘導されるマウス肝細胞の動態の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会; 2014年10月4-5日/静岡]
 19. 仁科博史;スタチン催奇性誘導機構の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会; 2014年10月4-5日/静岡]
 20. 仁科博史;成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する[第 87 回日本生化学会大会; 2014年10月15-18日/京都]
 21. 平山順他;ゼブラフィッシュ概日リズムの光同調を担うシグナル経路の解析 [第 21 回日本時間生物学会学術大会;2014年11月8-9日/福岡]
 22. 浅岡洋一、仁科博史; Hippo-Yap シグナル伝達系による網膜視細胞の分化制御機構 [第 7 回 RRM; 2014年11月22日/東京]
 23. 仁科博史;がん原遺伝子産物 YAP 依存的肝細胞消失を誘導する新規マウスモデルの確立[第 37 回日本分子生物学会; 2014年11月25-27日/横浜]
 24. 浅岡洋一、仁科博史;網膜光受容細胞の分化における Hippo-Yap シグナル伝達系の役割[第 37 回日本分子生物学会; 2014年11月25-27日/横浜]
 25. 仁科博史;細胞内シグナル伝達系[秋田大学医学部セミナー; 2014年12月12日/秋田]

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

ナシ

2. 実用新案登録

ナシ

3. その他

ナシ