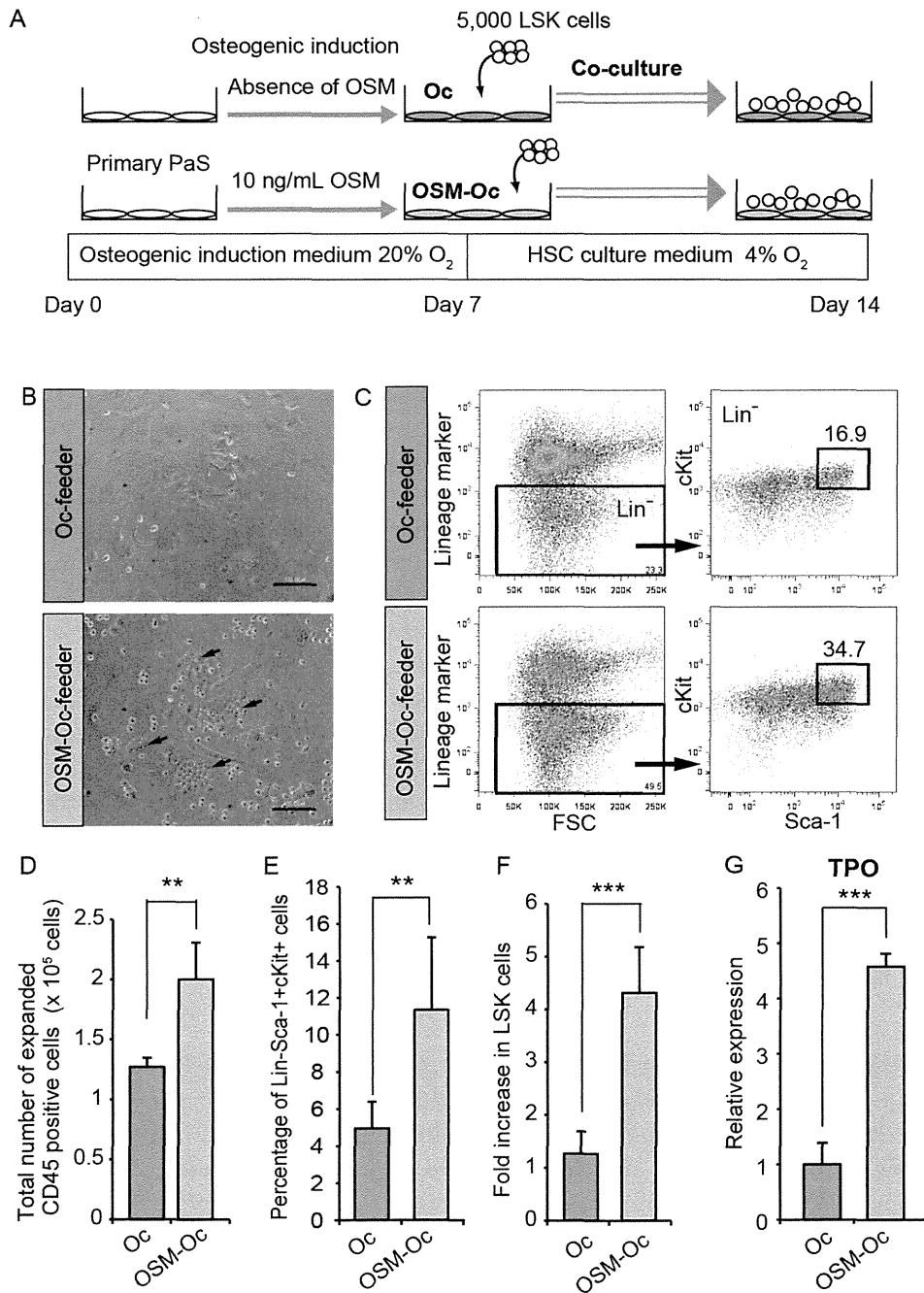


### OSM enhances the hematopoietic capacity of P $\alpha$ S-derived osteolineage cells *in vitro*

To determine whether OSM can potentiate the hematopoietic capacity of osteolineage cells, we developed a co-culture system of P $\alpha$ S-derived osteolineage cells and Lineage-Sca1+cKit<sup>+</sup> (LSK) cells, a fraction of HSPC in the BM (Fig. 4A). We first induced the osteogenic differentiation of P $\alpha$ S cells for 7 days with or without OSM, and used it as a feeder layer, which we named “Oc-feeder” and “OSM-Oc-feeder”, respectively. After wash-out of induction medium, LSK cells were added on each feeder with stem cell factor (SCF), but without OSM. After 3 days of co-culture, many “cobblestone”-like clusters were observed in the co-culture on OSM-Oc-feeder (Fig. 4B). After 7 days of co-culture, the expanded cells from each culture were harvested and reanalyzed by FACS (Fig. 4C). The total number of expanded blood cells on OSM-Oc-feeder was 1.6-fold higher than that on Oc-feeder (Fig. 4D). More importantly, FACS analysis revealed that the percentage of the LSK fraction as well as the total number of LSK cells relative to the input cells on OSM-Oc-feeder were higher than those on Oc-feeder by 2.3-fold and 3.4-fold, respectively (Fig. 4C, E and F). These results suggested that OSM-induced osteolineage cells possessed a high capacity of the *ex vivo* maintenance and expansion of HSPC. To examine the characteristic difference between Oc-feeder and OSM-Oc-feeder, the expression level of Thrombopoietin (TPO), a critical factor for hematopoiesis, was analyzed. Real-time RT-PCR revealed that the expression of TPO in the OSM-Oc-feeder was significantly higher than the Oc-feeder by 4.6-fold, which may account for a part of niche functions (Fig. 4G), although we cannot exclude the possibility that the other cytokines than TPO or the direct interaction between LSK and the feeder layer might be responsible for high capacity of hematopoiesis. Taken together, these results suggested that OSM plays a role in the development of the favorable microenvironment for HSPC by preventing P $\alpha$ S cells from osteogenic maturation as well as adipogenesis.

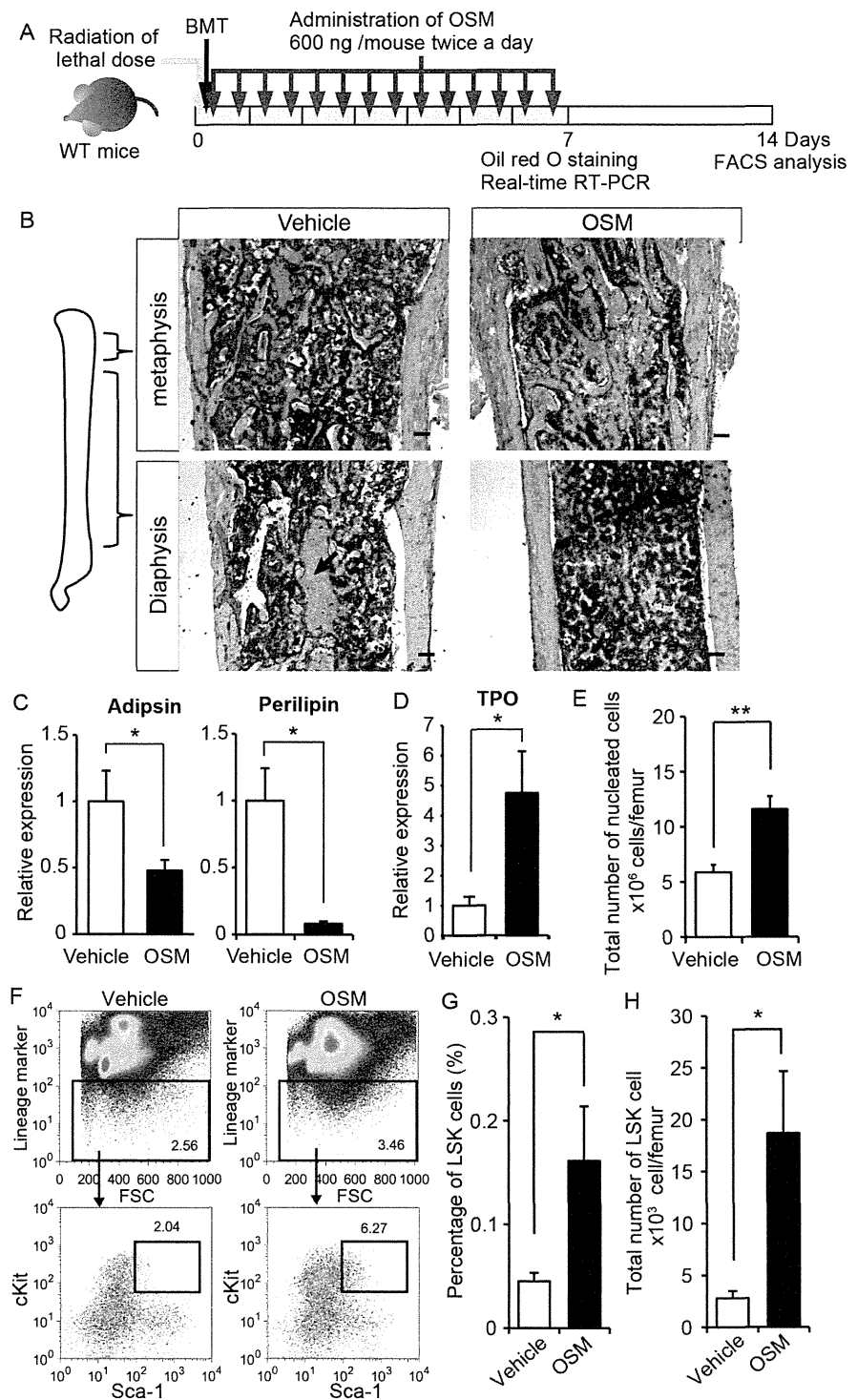
### OSM administration facilitates the reconstitution of the BM microenvironment in lethally irradiated mice

Because OSM is predominantly and constitutively expressed in hematopoietic cells of the BM (Fig. 1C and D), the myelosuppression by lethal irradiation is supposed to cause an insufficient supply of OSM even in the WT BM. To assess the therapeutic advantage of OSM administration for BM microenvironment recovery after myeloablation, WT mice were lethally irradiated and transplanted with BM cells (BMT). After BMT, recombinant OSM was intravenously administered at a dose of 600 ng per a mouse twice a day for a week and then the BM reconstitution was evaluated (Fig. 5A). Oil Red O staining revealed that OSM treatment markedly suppressed the accumulation of lipids in whole BM compared to vehicle injection, indicating that the administration of OSM inhibits the BM adipogenesis *in vivo* (Fig. 5B). Moreover, OSM-treated BM was filled with nucleated hematopoietic progenitor cells whereas vehicle-treated BM displayed



**Fig. 4. OSM enhances the capacity of PaS-derived osteoblastic cells to support hematopoiesis *in vitro*.** (A) The experimental schedule for the co-culture of LSK cells and the feeder layer. After the osteoblastic differentiation of PaS cells with or without OSM, LSK cells were co-cultured under 4% O<sub>2</sub> conditions (balanced by N<sub>2</sub>). After 7 days of co-culture without OSM, cells were harvested and reanalyzed by FACS. (B) The morphology of LSK cells cultured on Oc-feeder and OSM-Oc-feeder. "Cobblestone"-like clusters (arrows) were observed in the OSM-Oc-feeder. Scale bars indicate 100 μm. (C) FACS analysis of harvested cells after 7 days of co-culture. Representative images and the percentage of the LSK cells in lineage negative CD45+ cells are shown. (D) The total numbers of expanded cells after 7 days of co-culture (n=5). (E, F) The percentage of the LSK cells in total CD45 positive cells (E) and fold increase of LSK cells relative to input cells (F) after 7 days of co-culture are shown (n=5). (G) Expression analysis of TPO in the Oc-feeder and OSM-Oc-feeder by real-time RT-PCR (n=3). Data are presented as means ± S.D. \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0116209.g004



**Fig 5. OSM suppresses fatty marrow and enhances the recovery of BM microenvironment after irradiation *in vivo*.** (A) The experimental schedule for irradiation and OSM administrations. BM cells were transplanted into lethally irradiated WT mice by tail vein injection. A dose of 600 ng OSM per mouse was

injected intraperitoneally twice a day for 7 days. (B) Oil red O staining of femur sections from PBS-treated mice (Vehicle) and OSM-treated mice. Arrow shows the open area occupied by erythrocytes. (C) Real-time RT-PCR analysis of genes related to adipocytic differentiation. The expression levels of adipisin and perilipin mRNA are shown (n=4-5 per group). (D) Expression analysis of TPO in the BM by real-time RT-PCR (Vehicle, n=4; OSM-treated mice, n=5). (E) The total number of BM cells per a femur after 14 days of BMT. (F) FACS analysis of BM cells in vehicle-treated and OSM-treated mice. Representative images and the percentage of LSK cells in BM cells are shown. (G) The percentage of LSK cell in BM cells. (H) The LSK number in the BM per a femur. (Vehicle, n=6; OSM-treated mice, n=7). Data are shown as means  $\pm$  S.E.M. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. Scale bars represent 100  $\mu$ m.

doi:10.1371/journal.pone.0116209.g005

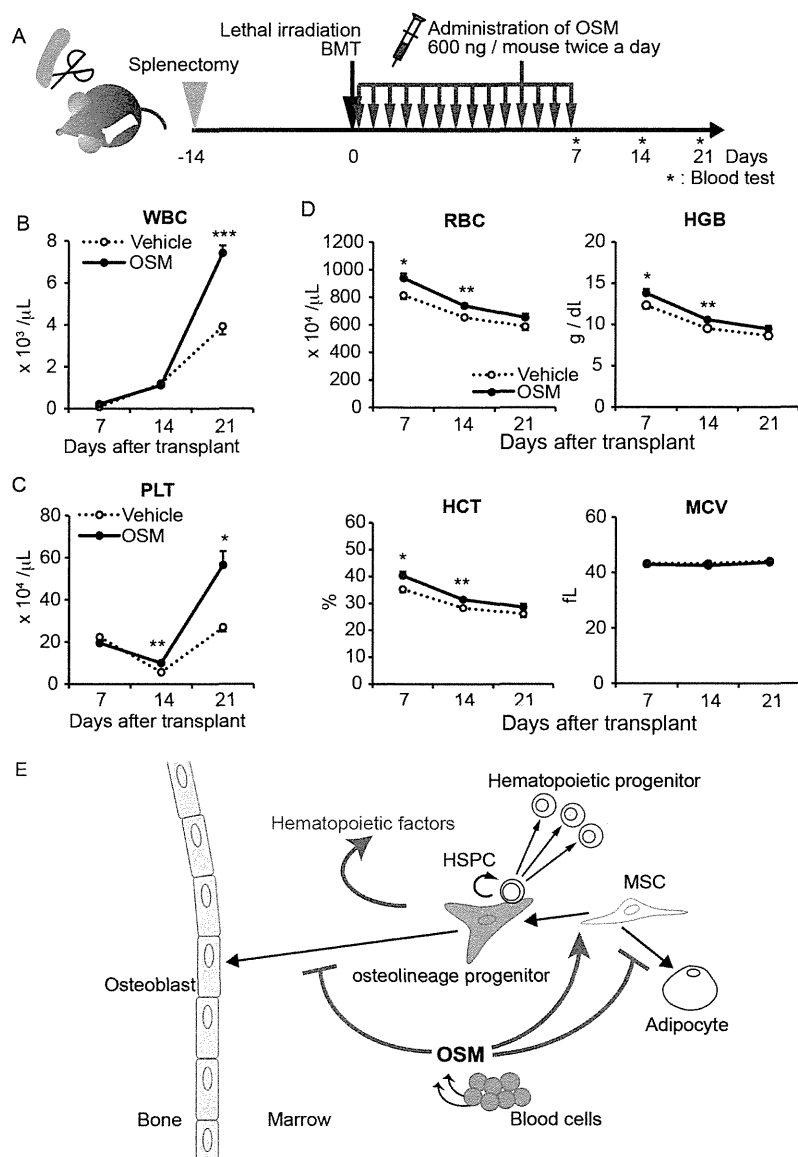
many open areas occupied by enucleated red blood cells (Fig. 5B, arrow). Real-time RT-PCR revealed that the expressions of adipisin and perilipin in the BM of OSM-treated mice were strongly suppressed by 0.48-fold and 0.08-fold compared to the vehicle-treated BM, respectively (Fig. 5C). In contrast, the expression of TPO was 4.7-fold increased in the BM of OSM-treated mice, consistent with the *in vitro* data described above (Fig. 5D and Fig. 4G). These data indicate that the administration of OSM is useful for inhibiting the adipogenesis during the regeneration of BM microenvironment, which would contribute to the recovery of hematopoiesis.

### OSM administration enhances the recovery of BM hematopoiesis after lethal irradiation

To evaluate the effect of OSM administration on the hematopoietic recovery in the BM, the nucleated cells were harvested from vehicle- and OSM-treated femurs after 14 days of BMT and analyzed by FACS. The total number of BM nucleated cells per a femur of OSM-treated mouse was 2.0-fold higher than that of vehicle-treated mouse (Fig. 5E). FACS analysis demonstrated that the percentage of the LSK fraction in total nucleated cells as well as the total number of LSK cells per a femur of OSM-treated mouse were higher than those of vehicle-treated mouse by 4.1-fold and 6.7-fold, respectively (Fig. 5F, G, and H). These results strongly suggested that *in vivo* administration of OSM after lethal irradiation has a beneficial effect on the rapid recovery of hematopoietic microenvironment in the BM.

To further focus on the contribution of BM recovery to peripheral blood, we performed similar BMT experiments for Spx-treated WT mice and monitored the peripheral blood every 7 days after BMT (Fig. 6A). While the recovery of peripheral WBC and PLT was blunted in vehicle-treated mice, OSM administration elicited rapid recovery of WBC and PLT, and their counts were significantly higher than vehicle-treated mice after 21 days of BMT by 1.9- and 2.1-fold, respectively (Fig. 6B and C). Similarly, the values of RBC, HCT and hemoglobin (HGB) in OSM-treated mice were consistently higher than those of vehicle-treated mice (Fig. 6D).

Furthermore, we examined the hematopoietic recovery in Spx-treated OSM KO mice after lethal irradiation with WT BM transplantation. Although the administration of OSM was expected to be more effective in OSM-deficient BM



**Fig. 6. OSM enhances the recovery of BM hematopoiesis after irradiation *in vivo*.** (A) The experimental schedule for splenectomy, irradiation and OSM administrations. WT mice were irradiated at lethal dose after 14 days of splenectomy and then a dose of 600 ng OSM per mouse was injected intraperitoneally twice a day for 7 days. Blood samples were harvested from tail vein and analyzed by automated counter every 7 days. (B–D) Hematologic analyses of peripheral blood after BMT. While blood cell count (WBC) (B) platelet cell count (PLT) (C) were measured by an automated counter. (D) Red blood cell count (RBC), mean corpuscular volume (MCV), hemoglobin content (HGB), and hematocrit values (HCT) are shown. (E) Model of multiple regulatory roles of OSM in the BM stromal cell differentiation and hematopoietic microenvironment. Data are shown as means ± S.E.M. (n=5 per group). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

doi:10.1371/journal.pone.0116209.g006

environment, we could not find its clear advantage in the recovery of peripheral blood nor BM LSK number (S2 Fig.). Because the BM of OSM KO mouse is originally adipogenic, the pre-existing lipids in the KO BM may be less affected by OSM administration while the renewed adipogenesis in WT BM after irradiation is effectively blocked. Altogether, these results indicated that OSM administration was beneficial to suppress the adipogenesis after myeloablation, leading to the recovery of BM microenvironment as well as hematopoiesis.

## Discussion

In the present study, we focused on the effect of OSM on P $\alpha$ S cell because the cell has been reported to differentiate into hematopoietic niche cells, osteoblasts, and adipocytes after *in vivo* transplantation [10]. We demonstrated that OSM exhibits distinct biological activities against adipogenesis and osteogenesis of P $\alpha$ S cells. We previously reported the inhibitory effect of OSM on the adipocytic differentiation of 3T3-L1, a preadipocyte line [20] and that both OSM KO and OSMR KO mice displayed an anemic phenotype accompanied by the reduction of hematopoietic activity in the BM [18, 19]. Here, we showed that OSM is expressed constitutively and abundantly in the BM, a unique feature of OSM among the IL-6 family cytokines. Moreover, the adipogenesis in OSM KO BM was accelerated with age as well as after myeloablation. These results strongly suggest that OSM plays a critical role in the development and/or maintenance of the BM microenvironment. Considering that adipogenic change occurs drastically and extensively in the BM after irradiation and that P $\alpha$ S cells are relatively rare in marrow cavities, OSM may contribute to hematopoietic microenvironment by affecting the other type of BM MSC as well as P $\alpha$ S cells. Adipocytes in the BM are considered to be a negative regulator of the hematopoietic microenvironment, raising the possibility that the administration of a chemical inhibitor of adipogenesis might enhance marrow engraftment and hematopoietic recovery after irradiation by antagonizing BM adipogenesis [11]. Therefore, the regulatory mechanisms underlying BM adipogenesis in the steady state as well as under disease conditions would help us to understand the hematopoietic microenvironment and develop novel therapeutic strategies. Because impaired hematopoiesis in the BM is often compensated by extramedullary hematopoiesis in the spleen, fine regulatory mechanisms in BM hematopoiesis may be masked by the compensatory hematopoiesis. Therefore, we utilized Spx-treated mice to focus on the BM hematopoiesis. In BMT model, one of the myeloablation models, Spx-treated WT mice markedly showed the rapid recovery of peripheral WBC and PLT by OSM administration, suggesting that anti-adipogenic effect of OSM is useful for the recovery of hematopoietic microenvironment in the BM. Unexpectedly, OSM administration into irradiated OSM KO mice did not exhibit enough effect on the recovery of BM hematopoiesis after irradiation. Considering that OSM effectively blocks an early step of adipocytic differentiation [20], it may need more time to replace the pre-existing adipocytes in the OSM KO BM. Therefore, the span and

dose of OSM administration need further consideration to improve the BM microenvironment of OSM KO mouse.

Interestingly, OSM KO mice showed some characteristics similar to the diagnostics of AA; i.e., fatty marrow, high serum EPO concentration, a high frequency in aged individuals, and anemia. For many patients with severe AA, transplantation of BM or cord blood cells is the preferred standard treatment [37, 38]. Transplantation is thought to replace the abnormal hematopoietic progenitor cells in the BM with normal HSPC because hematopoietic progenitors themselves are of pathogenic importance. Our data suggest that defective regulatory molecules for the BM microenvironment could also be linked to the pathogenesis of AA. Notably, OSM is a potentially promising agent for the protection of fatty marrow, although further investigation will be required to clarify the relationship between AA and OSM expression in the BM.

BM contains various cell types involved in the formation of the hematopoietic microenvironment [1, 39, 40]. Previous studies have revealed that various stromal cells, such as osteoblasts [2, 3], osteocytes [41], perivascular Nestin-expressing MSC [42], CXCL12-expressing cells [43–46], and BM sinusoidal endothelial cells [5, 7, 47], contribute to the formation of the BM hematopoietic niche. Among the multiple cell types in the BM, the osteoblast is the first to be identified as a functional niche cell, although several lines of evidence suggest that the role of osteoblasts in HSC regulation is not as it was initially foreseen [48]. It is likely that the osteoblasts constituting the HSC niche are relatively immature, because CD146<sup>+</sup> osteoprogenitors, but not their differentiated osteoblastic progeny, express Angiopoietin-1, a pivotal regulator both of vascular remodeling and of the HSC niche [49]. Moreover, osteolineage cells are also known to express some secreted proteins required for hematopoiesis; e.g., TPO, which enhances LT-HSC quiescence, and Spp1, an extracellular matrix molecule, which enhances the quiescence of primitive HSC through its binding to integrin  $\beta$ 1 [50, 51]. We demonstrated that OSM enhanced the expression of TPO and Spp1 in osteolineage cells derived from P $\alpha$ S cells, and suppressed the expression of Bglap2, a terminal differentiation marker of osteocytic cells, suggesting that OSM also contributes to the supply of stromal cells constituting hematopoietic niche. In fact, OSM-treated osteolineage cells showed marked potentials for maintenance and expansion of the LSK fraction as feeder cells in the co-culture system. These findings may account for the finding in our previous report that the number of hematopoietic progenitor cells in peripheral blood was increased in OSM KO mice, presumably due to the impaired ability of the BM niche to harbor HSPC.

In conclusion, our findings demonstrate that OSM plays multiple regulatory roles in BM stromal cell differentiation and is required to maintain the BM microenvironment for hematopoiesis (Fig. 6E). OSM is a promising therapeutic target for alleviating the BM diseases with fatty marrow as well as myelosuppression after chemotherapy or irradiation. Further characterization of the osteolineage progenitors responsible for the OSM effect would help us to understand the regulatory mechanisms of BM microenvironment for hematopoiesis and to identify novel niche factors for HSPC.

## Supporting Information

**S1 Fig. Comparison between P $\alpha$ S cells derived from WT and OSMR KO mice.** (A) WT-P $\alpha$ S cells and OSMR KO-P $\alpha$ S cells were sorted as CD45<sup>-</sup> TER119<sup>-</sup> and Sca-1<sup>+</sup> PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> population by FACS. (B) The morphology of primary WT-P $\alpha$ S cells and OSMR KO-P $\alpha$ S cells after 7 days of culture. Bars indicate 100  $\mu$ m.  
doi:10.1371/journal.pone.0116209.s001 (TIF)

**S2 Fig. Analysis of the recovery of peripheral blood cells and HSPC in the BM in Spx-treated OSM KO mice.** (A) The experimental schedule for splenectomy, irradiation and OSM administrations using OSM KO mice. OSM KO mice were irradiated at lethal dose after 14 days of splenectomy and then a dose of 600 ng OSM per mouse was injected intraperitoneally twice a day for 7 days. Blood samples were harvested from tail vein and analyzed by automated counter every 7 days. (B) Hematologic analyses of peripheral blood after BMT. The transition of white blood cell count (WBC), platelet cell count (PLT) and red blood cell count (RBC) in vehicle-treated and OSM-treated mice are shown. (C) The total number of BM cells per a femur, the percentage of LSK cell in BM cells, and the LSK number in the BM per a femur after 21 days of BMT are shown. (Vehicle, n=4; OSM-treated mice, n=5). Data are shown as means  $\pm$  S.E.M.  
doi:10.1371/journal.pone.0116209.s002 (TIF)

**S1 Table. Primer sequences for real-time RT-PCR.** All primer sequences used in this study are shown.  
doi:10.1371/journal.pone.0116209.s003 (DOCX)

## Acknowledgments

We thank N. Miyata for assistance with flow cytometry; Y. Kamiya for mouse and technical assistance; and the members of the Miyajima laboratory for their helpful discussion and suggestions.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MT AM YM. Performed the experiments: FS MT. Analyzed the data: FS MT AM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AM MT. Wrote the paper: FS MT AM.

## References

1. Wang LD, Wagers AJ (2011) Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 643–655.
2. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, et al. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425: 841–846.
3. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, et al. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836–841.
4. Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, et al. (2006) Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 439: 599–603.



5. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, et al. (2005) SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121: 1109–1121.
6. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481: 457–462.
7. Winkler IG, Barbier V, Nowlan B, Jacobsen RN, Forristal CE, et al. (2012) Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med* 18: 1651–1657.
8. Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71–74.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
10. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, et al. (2009) Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206: 2483–2496.
11. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, et al. (2009) Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460: 259–263.
12. Kuk JL, Saunders TJ, Davidson LE, Ross R (2009) Age-related changes in total and regional fat distribution. *Ageing Res Rev* 8: 339–348.
13. Young NS, Maciejewski J (1997) The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *N Engl J Med* 336: 1365–1372.
14. Tanaka M, Miyajima A (2003) Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149: 39–52.
15. Mukoyama Y, Hara T, Xu M, Tamura K, Donovan PJ, et al. (1998) In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 8: 105–114.
16. Takeuchi M, Sekiguchi T, Hara T, Kinoshita T, Miyajima A (2002) Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances engraftment to the bone marrow. *Blood* 99: 1190–1196.
17. Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, et al. (1999) Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 18: 2127–2136.
18. Minehata K, Takeuchi M, Hirabayashi Y, Inoue T, Donovan PJ, et al. (2006) Oncostatin m maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow. *Int J Hematol* 84: 319–327.
19. Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, et al. (2003) Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102: 3154–3162.
20. Miyaoka Y, Tanaka M, Naiki T, Miyajima A (2006) Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways. *J Biol Chem* 281: 37913–37920.
21. Song HY, Jeon ES, Kim JI, Jung JS, Kim JH (2007) Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 101: 1238–1251.
22. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, et al. (2010) Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest* 120: 582–592.
23. Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, et al. (2012) Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells* 30: 762–772.
24. Perry JM, He XC, Sugimura R, Grindley JC, Haug JS, et al. (2011) Cooperation between both Wnt/ $\beta$ -catenin and PTEN/PI3K/Akt signaling promotes primitive hematopoietic stem cell self-renewal and expansion. *Genes Dev* 25: 1928–1942.
25. Haase VH (2013) Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev* 27: 41–53.

26. **Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, et al.** (1996) Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J* 15: 1055–1063.
27. **Brown TJ, Lioubin MN, Marquardt H** (1987) Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells. *J Immunol* 139: 2977–2983.
28. **Malik N, Kallestad JC, Gunderson NL, Austin SD, Neubauer MG, et al.** (1989) Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol* 9: 2847–2853.
29. **Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA** (1996) The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 19: 421–428.
30. **Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD** (1994) Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14: 99–129.
31. **Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C** (2004) The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life* 56: 379–385.
32. **McManus PM, Weiss L** (1984) Busulfan-induced chronic bone marrow failure: changes in cortical bone, marrow stromal cells, and adherent cell colonies. *Blood* 64: 1036–1041.
33. **Beck GR, Jr.** (2003) Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 90: 234–243.
34. **Leboy PS, Beresford JN, Devlin C, Owen ME** (1991) Dexamethasone induction of osteoblast mRNAs in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol* 146: 370–378.
35. **Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS** (2003) Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 90: 13–22.
36. **Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, et al.** (2010) Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 464: 852–857.
37. **Yoshimi A, Kojima S, Taniguchi S, Hara J, Matsui T, et al.** (2008) Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 1057–1063.
38. **Scheinberg P** (2012) Aplastic anemia: therapeutic updates in immunosuppression and transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012: 292–300.
39. **Yin T, Li L** (2006) The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116: 1195–1201.
40. **Shen Y, Nilsson SK** (2012) Bone, microenvironment and hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 19: 250–255.
41. **Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, et al.** (2013) Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell* 12: 737–747.
42. **Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, et al.** (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466: 829–834.
43. **Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T** (2004) Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20: 707–718.
44. **Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T** (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25: 977–988.
45. **Ding L, Morrison SJ** (2013) Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495: 231–235.
46. **Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettel LG, Christopher MJ, et al.** (2013) CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495: 227–230.
47. **Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, et al.** (2010) Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 6: 251–264.
48. **Morrison SJ, Scadden DT** (2014) The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505: 327–334.

49. **Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, et al.** (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131: 324–336.
50. **Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, et al.** (2007) Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 1: 685–697.
51. **Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, et al.** (2005) Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106: 1232–1239.

みにれびゅう

## 器官サイズを調節する転写共役因子 YAP の活性制御

畠 星治<sup>1,2</sup>, 堅田 利明<sup>1</sup>, 仁科 博史<sup>2</sup>

### 1. はじめに

組織における細胞の数の制御は、器官のサイズや組織の恒常性の維持に必須であり、この破綻は器官形成不全や発がんに至る。がん抑制シグナル伝達経路の一つである Hippo 経路は、細胞の増殖、生死、分化などを制御して組織における「細胞の数」を調節し、器官のサイズや組織の恒常性を維持している<sup>1)</sup>。YAP (yes-associated protein) とそのパラログである TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) は、Hippo 経路の中心的な役割を果たす転写共役因子である。YAP と TAZ はさまざまな遺伝子発現の誘導を介して細胞増殖を促進し細胞死を抑制することで Hippo 経路のエフェクターとして機能する。近年では多様な Hippo 経路の上流の制御機構が明らかにされ、細胞が接触する細胞外基質や隣接する細胞との接着といった細胞の接触状態の違いによって Hippo 経路の活性が巧妙に制御されていることが明らかになりつつある。本稿では、Hippo 経路の中心的役割を担う YAP の制御機構に焦点をあて、進展の目覚ましい本領域における最新の知見を哺乳動物に関するものを中心として概説するとともに、我々が最近明らかにした翻訳後修飾を介した YAP の新たな制御機構に関する研究成果を紹介する。

### 2. YAP による器官サイズと発がんの制御

器官のサイズは、構成する「細胞の数」と「個々の細胞の大きさ」によって規定されており、Hippo-YAP 経路は器官における「細胞数」の制御を担う(図 1)。一方、「個々の細胞の大きさ」は栄養状態を感知する mTOR 経路によ

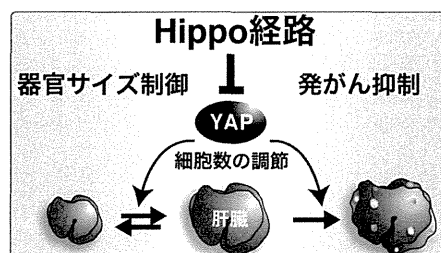


図 1 Hippo-YAP 経路による器官サイズ制御と発がん抑制

り制御されていることが知られているが、多くの場合、器官のサイズ制御は「細胞の数」に依存している<sup>1)</sup>。肝臓や心臓などのいくつかの器官において YAP 依存的にサイズが制御されていることが示されており、特に肝臓においては顕著である。マウス肝臓の肝実質細胞において YAP を過剰発現させると、肝実質細胞の増殖が亢進し、通常は全体重の約 5% に維持されている肝臓重量比が約 25% にまで増大することが示されている<sup>2)</sup>。興味深いことに、肝臓が増大した後に YAP の発現誘導を中止すると、肝臓は元のサイズにまで戻る。これは、肝臓のサイズが YAP 依存的に可逆的に制御されていることを示唆している。さらに、長期間にわたって YAP の発現を誘導すると、肝細胞がんの発症に至る。肝細胞がんを含むヒトのさまざまな種類のがん症例において、YAP 遺伝子座を含むゲノム領域が増幅しており、YAP の発現量の増加や核内局在の亢進が報告されていることから、YAP はがん遺伝子産物であることが明らかとなっている<sup>3,4)</sup>。

### 3. Hippo 経路によるリン酸化を介した YAP の機能抑制機構

哺乳動物の Hippo 経路の主要構成因子はショウジョウバエの Hippo のホモログである Mst1/2 (mammalian ste20-like kinase 1 と 2)、Lats1/2 (large tumor suppressor 1 と 2)、Sav (salvador)、Mobl (mps one binder 1)、YAP と TAZ および TEAD1/2/3/4/である<sup>1)</sup>(図 2A)。YAP と TAZ は転写共役因子であり、転写活性化ドメインを有するものの DNA 結合ドメインは持たない。このため、YAP は核内にてさまざまな転写因子と結合することで各々の転写因子が標的

<sup>1</sup> 東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

<sup>2</sup> 東京医科歯科大学難治疾患研究所発生再生生物学分野

#### Regulations of YAP transcriptional co-activator

Shoji Hata<sup>1,2</sup>, Toshiaki Katada<sup>1</sup> and Hiroshi Nishina<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Laboratory of Physiological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; <sup>2</sup>Department of Developmental and Regenerative Biology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University)

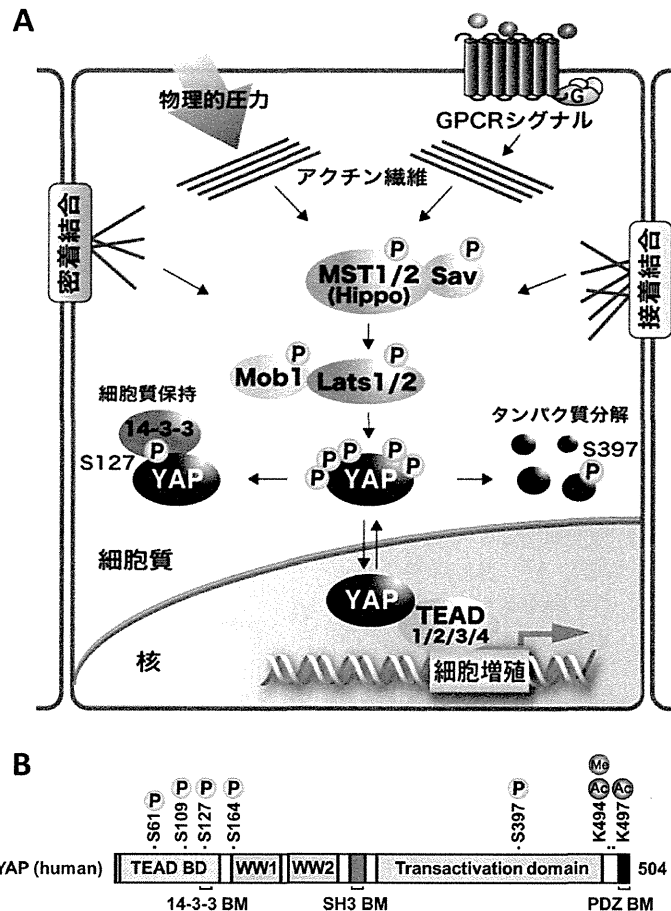


図2 Hippo 経路による YAP のリン酸化制御  
 (A) Hippo 経路の模式図. (B) YAP のドメイン構造. Hippo 経路による 5 か所のリン酸化部位 (P) と新たに同定されたアセチル化 (Ac) およびモノメチル化部位 (Me).

とする遺伝子の発現を誘導する。中でも、YAP の機能を主に介在する転写因子は TEAD であり、TEAD は細胞増殖の促進や細胞死の抑制に関与する遺伝子群の発現を担っている。

Hippo 経路においてシグナル伝達経路としての中核をなすのは、セリン/トレオニンキナーゼの Mst1/2 と Lats1/2 によるキナーゼカスケードである。Mst1/2 は Lats1/2 をリン酸化して活性化させる。活性化された Lats1/2 は YAP の 5 か所のセリン残基をリン酸化する (図 2B)。127 番目のセリン残基がリン酸化されると、14-3-3 タンパク質がこの部位に直接結合することにより YAP を細胞質に保持する<sup>4)</sup>。その結果、YAP の核内局在が抑制されて YAP 依存的な遺伝子発現が負に制御される。また、YAP の 397 番目のセリン残基が Lats1/2 によりリン酸化されると、ユビキチンリガーゼ複合体との相互作用が誘導され、YAP はユビキチン・プロテアソーム系依存的に分解される<sup>5)</sup>。このように、Hippo 経路はリン酸化を介して YAP の細胞内

局在と安定性を制御することで、YAP による細胞増殖や発がん性形質転換の誘導を抑制している。

Hippo 経路の主要構成因子は、ヒトから海綿動物に至る後生動物間において進化的にほぼ保存されている<sup>6)</sup>。植物には保存されていないものの、一部の単細胞真核生物にまで保存されている点は興味深い。Hippo 経路の起源は出芽酵母における分裂期脱出制御分子群 (Mitotic Exit Network) や分裂酵母における隔壁形成分子群 (Septation Initiation Network) にあると考えられており、主要構成因子が保存されているだけでなく、シグナル伝達機構も類似している<sup>7)</sup>。YAP 自体は酵母に保存されていないものの、非後生生物であるアメーバ型の真核単細胞生物 *Capsaspora owczarzakii* には保存されている<sup>8)</sup>。この YAP ホモログも組織サイズ制御能力を保持することがショウジョウバエを用いた解析により示されている。このため、Hippo-YAP 経路は進化的に広く保存された細胞の増殖制御機構であるとみなすことができる。

#### 4. 細胞の接触状態を感知するアクチン細胞骨格による YAP の活性制御

生体器官において血球系以外の細胞は隣接する細胞や周囲の細胞外基質と常に接触した状態にある。細胞による接触状態の感知は組織の恒常性維持に重要であり、その重要性は、非腫瘍性培養細胞株が接触阻害 (contact inhibition) という高細胞密度時にみられる増殖停止機構を有することからも示唆される。Hippo 経路は細胞間の接触によって活性化され、接触阻害の分子機構として機能することが示されている<sup>4)</sup>。特に、上皮細胞はさまざまな細胞間結合によって隣接した細胞と強固に接着している。上皮細胞間結合やそれによって形成される上皮細胞極性の維持は、細胞の腫瘍抑制機構の一つであり、それらが崩壊した細胞では YAP が活性化していることが示されている<sup>1)</sup>。興味深いことに、Hippo 経路の上流制御因子として同定されている多くの分子が、密着結合、接着結合、頂端極性複合体の構成因子として知られている。

細胞は隣接した細胞に加えて細胞外基質にも接触しており、このような接触による外的な物理的圧力を感知して、増殖や遊走といったさまざまな細胞の挙動を制御している。アクチンなどの細胞内骨格がこのような物理的圧力の感知を担っているが、そのシグナルが YAP および TAZ を介して核内での遺伝子発現誘導に至ることが近年明らかになった<sup>9)</sup>。接触する細胞外基質の剛性が高いときや細胞の形態が広がっている場合には、接着斑を介して細胞内のアクチン線維の張力が高まり、YAP および TAZ の活性化を誘導する。アクチン線維から YAP の活性化に至る分子機構は未解明な点が多いが、Hippo 経路依存的な機構と非依存的な機構が報告されている。興味深いことに、物理的圧力に加えて、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) シグナル伝達経路といった、アクチン線維の形成やストレスファイバーの形成を誘導する刺激も YAP の活性化を誘導することが報告された<sup>10)</sup>。また、上皮細胞における接着結合の細胞質側にはアクチン線維が集積しており、密着結合によって形成される上皮細胞極性にはアクチン細胞骨格が必要である。これらのことから、細胞の接触状態に依存したアクチン細胞骨格の変化に反応して YAP の活性化状態を制御し、細胞は増殖や遊走、分化といった細胞機能を発揮していると考えられる。

#### 5. アセチル化とメチル化による YAP の新たな制御機構

##### 1) アセチル化による YAP の制御

上記のように、細胞質における YAP の制御機構は詳細

に解析されているが、YAP が機能する核内での制御機構については不明な点が多い。我々はこの点に着目し、YAP の核内移行を誘導する刺激を利用して核内における YAP の制御機構を探索し、YAP が新たにアセチル化されることを見いだした<sup>11)</sup>。解析の結果、① YAP の C 末端近傍の 2 か所のリシン残基 (K494 と K497) がアセチル化修飾を受けること、② YAP のアセチル化が核内に局在するアセチル化酵素 CBP/p300 によって担われていること、③ 脱アセチル化を担う酵素は SIRT1 であること、④ アセチル化部位の変異により YAP の転写活性化能が変化することを見いだした (図 3A)。CBP/p300 は YAP と同様に転写共役因子として機能することが知られており、また、SIRT1 もエピジェネティックな制御を介して遺伝子発現を調節することが知られている。このため、これらの酵素は YAP のアセチル化状態を制御して、YAP による遺伝子発現誘

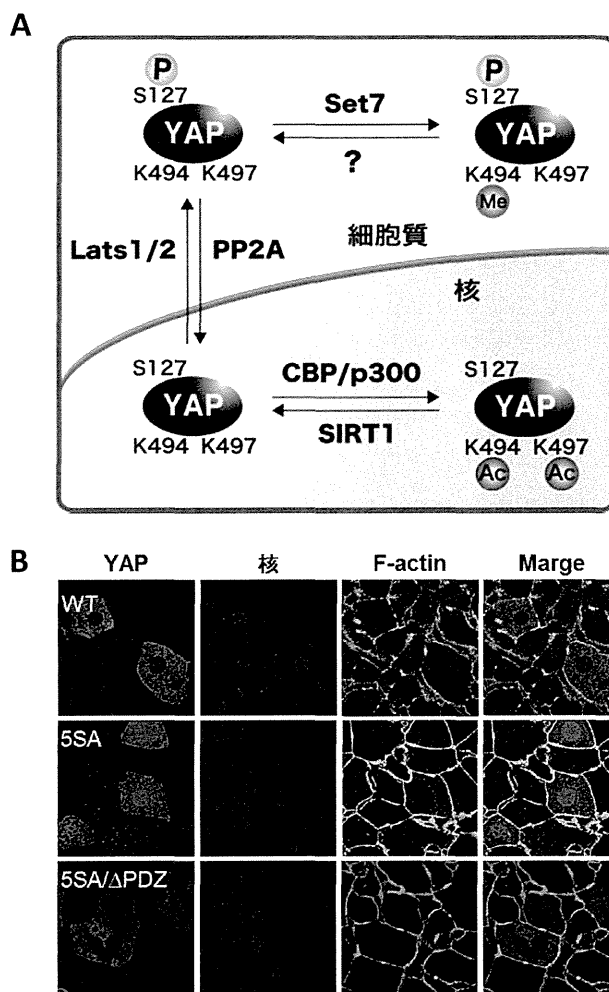


図3 YAP の翻訳後修飾と細胞内局在制御  
(A) YAP のリン酸化, アセチル化, モノメチル化修飾と触媒酵素. (B) 野生型 YAP (上段) と変異型 YAP (中, 下段) のマウス肝細胞内局在.

導を調節している可能性が考えられる。

## 2) モノメチル化による YAP の制御

YAP のアセチル化部位の一つである K494 は、ショウジョウバエからヒトに至るまで進化上高度に保存されているアミノ酸残基である。我々は Zaph らのグループとの共同研究により、YAP の K494 が新たにモノメチル化されることを明らかにした (図 3A)<sup>12)</sup>。解析の結果、①メチル化酵素 Set7 が YAP のモノメチル化および培養線維芽細胞での細胞質への局在化に必要であること、② Set7 を欠損したマウスの腸管上皮において前駆細胞の増加を伴う形態異常が生じること、③この前駆細胞では YAP の核内局在が亢進し下流遺伝子群の発現が亢進することを見いだした。培養線維芽細胞において Set7 は主に細胞質に局在していることから、YAP のモノメチル化は細胞質で生じており、YAP を細胞質に保持するために機能していることが示唆される。また、Set7 欠損マウスで観察される表現型は Hippo 経路の破綻によって生じる表現型と類似している。これらの結果は、リン酸化修飾に加えて、モノメチル化修飾による YAP の機能制御も個体の組織恒常性維持において重要な役割を担っていることを示唆している。

## 3) アセチル化/モノメチル化部位の近傍に存在する PDZ-binding motif の機能

YAP のアセチル化/モノメチル化部位である K494 の C 末端側の数アミノ酸近傍に、PDZ-BM (PDZ-binding motif) が存在する。我々は最近、この PDZ-BM が生体マウス肝臓の肝実質細胞において、YAP の核内局在に必須であることを見いだした<sup>13)</sup>(図 3B)。野生型の YAP (WT) は肝実質細胞において細胞質に局在するが、Hippo 経路によるリン酸化部位をアラニン残基に変異させた YAP (5SA) は核内に強く局在する。しかし、PDZ-BM を欠失した YAP (5SA/ΔPDZ) は核内に局在することはできない。YAP の細胞内局在を制御する分子の一つとして PDZ ドメインを有する ZO2 (zonula occludens 2) が報告されている<sup>14)</sup>。このため、YAP のアセチル化/モノメチル化は近傍の PDZ-BM の機能に影響を与え、ZO2 などの PDZ ドメイン含有タンパク質との相互作用を変化させることで YAP の細胞内局在を制御している可能性が考えられる。

リシン残基はアセチル化修飾とメチル化修飾を同時に受けることができないことから、リシン残基の修飾状態の変化はタンパク質の機能を切り替えるスイッチとして働く可能性がある。これまでに、ヒストン H3 の K9 がアセチル化とトリメチル化の修飾を受け、これらの修飾がクロマチン構造の変換のスイッチの役割を果たすことが知られている<sup>15)</sup>。それゆえ、YAP における K494 のアセチル化とモノメチル化も YAP の機能を制御するスイッチとして働き、

転写活性化能の調節や細胞内局在制御を担う可能性が考えられる。

## 6. おわりに

器官のサイズ制御機構は長い間不明であったが、近年の研究の進展により、器官サイズを制御する細胞内の分子機構 (Hippo-YAP 経路) の実態と、個々の細胞が置かれている状況 (情報) を細胞内へ伝達する分子機構 (アクチン細胞骨格による接触情報の感知) が明らかとなりつつある。このような知見を基盤として、器官サイズ制御機構においていまだ不明な点の多い、器官レベルと細胞レベルの二つの階層間の隔たりを埋める分子機構の解明が期待される。

- 1) Yu, F.X. & Guan, K.L. (2013) *Genes Dev.*, 27, 355-371.
- 2) Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., & Pan, D. (2007) *Cell*, 130, 1120-1133.
- 3) Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., Mu, D., Lucito, R., Powers, S., & Lowe, S.W. (2006) *Cell*, 125, 1253-1267.
- 4) Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.C., & Guan, K.L. (2007) *Genes Dev.*, 21, 2747-2761.
- 5) Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., & Guan, K.L. (2010) *Genes Dev.*, 24, 72-85.
- 6) Hilman, D. & Gat, U. (2011) *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2403-2417.
- 7) Hergovich, A. & Hemmings, B.A. (2012) *Semin. Cell Dev. Biol.*, 23, 794-802.
- 8) Sebe-Pedros, A., Zheng, Y., Ruiz-Trillo, I., & Pan, D. (2012) *Cell Rep.*, 1, 13-20.
- 9) Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2010) *Nature*, 474, 179-183.
- 10) Yu, F.X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X. D., Mills, G.B., & Guan, K.L. (2012) *Cell*, 150, 780-791.
- 11) Hata, S., Hirayama, J., Kajiho, H., Nakagawa, K., Hata, Y., Katada, T., Furutani-Seiki, M., & Nishina, H. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 22089-22098.
- 12) Oudhoff, M.J., Freeman, S.A., Couzens, A.L., Antignano, F., Kuznetsova, E., Min, P.H., Northrop, J.P., Lehnertz, B., Barsyte-Lovejoy, D., Vedadi, M., Arrowsmith, C.H., Nishina, H., Gold, M.R., Rossi, F.M., Gingras, A.C., & Zaph, C. (2013) *Dev. Cell*, 26, 188-194.
- 13) Shimomura, T., Miyamura, N., Hata, S., Miura, R., Hirayama, J., & Nishina, H. (2014) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443, 917-923.
- 14) Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G.D., Sidhu, S.S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., & Sudol, M. (2010) *Biochem. J.*, 432, 461-472.
- 15) Sims, R.J., 3rd, Nishioka, K., & Reinberg, D. (2003) *Trends Genet.*, 19, 629-639.

## 著者寸描

## ● 梶 星治 (はた しょうじ)



日本学術振興会特別研究員 (PD), 東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室所属。理学博士。

■略歴 1983年埼玉県に生る。2006年東京薬科大学生命科学部卒業。11年東京医科歯科大学大学院生命情報科学部博士課程修了。08~11年日本学術振興会特別研究員 (DC1)。11~13年東京医科歯科大学難治疾患研究所特任助教。13年より現職。

■研究テーマと抱負 腫瘍抑制機構の解明を Hippo 経路の観点から行っている。14年3月からドイツ・ハイデルベルク大学 Elmar Schiebel 研究室との共同研究のため、長期の渡独。ドイツ留学を楽しみたい。

■ウェブサイト <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri/>

■趣味 料理, ソフトテニス。



# 肝形成および肝臓における Hippo-YAPシグナル経路の役割

Roles of Hippo-YAP signaling pathway for liver formation and liver cancer



千葉恭敬(写真) 仁科博史

Takanori CHIBA<sup>1,2</sup> and Hiroshi NISHINA<sup>1</sup>

東京医科歯科大学難治疾患研究所発生再生生物学分野<sup>1</sup>, 同大学院医歯学総合研究科分子内分泌代謝学分野<sup>2</sup>

◎肝は糖質・蛋白質・脂質などの代謝をはじめ、有害物質の解毒や胆汁酸の生成・分泌など多岐にわたる機能を有しており、生体の恒常性維持に必要不可欠な器官である。そのため生命活動を維持するのに十分な肝機能を発揮できるように、肝はつねに適切な器官サイズ制御を受けている。近年、細胞内情報伝達経路のひとつである Hippo シグナル経路が、転写共役因子である YAP の活性制御を介してマウスの肝サイズを調節していることが明らかとなった。また、Hippo-YAP シグナル経路は肝臓発症や肝内胆管の発生にも関与することも見出されている。さらに最近では、ヒトの肝臓発症や小児の胆道形成に対する Hippo-YAP シグナル経路の関与を示唆する臨床的な知見も数多く報告されている。本稿ではこのような最近の知見を踏まえ、マウスおよびヒトの肝臓における Hippo-YAP シグナル経路の役割について紹介する。

**Key word** : Hippo, YAP, 肝臓サイズ, 肝臓, 胆管形成

肝は個体の生命維持に必須の器官であり、その機能不全は個体の死に直結する。肝機能不全をきたす代表的な疾患は肝臓(肝細胞癌、胆管細胞癌、肝芽腫など)である。肝臓は、肝を構成する細胞が腫瘍性に増殖することにより発症する。通常、肝を構成する細胞は適切な数を保つように調節されているが、遺伝子変化などにより癌化能力を獲得すると、こうした細胞数の制御から外れ無秩序に増殖し続け、最終的に肝臓を発症する。これまで肝の細胞数を調節するメカニズムは不明であったが、近年になり徐々に解明されつつある。

## Hippo-YAPシグナル経路

Hippoシグナル経路は mammalian Ste20-like kinase 1/2(MST1/2), large tumor suppressor 1/2(LATS1/2), salvador 1(SAV1), mps one binder 1a/1b(MOB1A/1B)により構成されており、Hippoシグナル経路は転写共役因子である YAP をリン酸化することにより負に制御する(図1)。

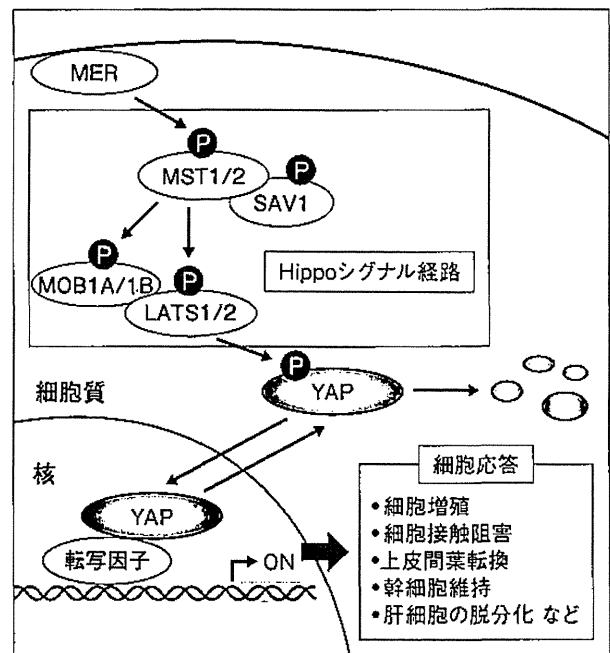


図1 種々の細胞応答を制御するHippo-YAPシグナル経路  
MERはHippoシグナル経路の上流分子であり、Hippoシグナル経路はYAPを負に制御する。YAPは種々の細胞応答を引き起こす遺伝子の発現を制御する。

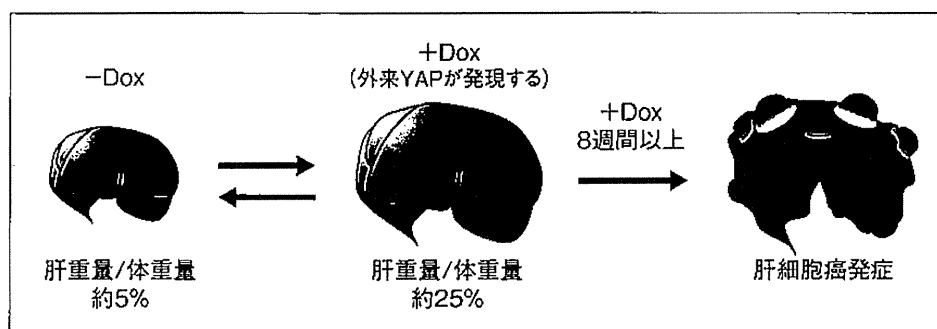


図 2 外来YAP発現誘導による肝のサイズ増大と肝癌発症

Dox 依存的に外来 YAP を過剰発現する Tg マウスの肝。体重に占める肝重量の割合は通常 5% 程度であるが、Dox を投与すると約 25% に増加する。しかし、Dox の投与を中止すると肝のサイズは元に戻る。一方、8 週間以上 Dox を持続的に投与すると肝細胞癌が生じる。

Hippoシグナル経路によってリン酸化された YAP は細胞質に保持または分解される。一方、リン酸化を受けていない YAP は活性型として核内で転写因子と結合し、YAP 依存的な遺伝子発現を誘導する。Hippoシグナル経路の代表的な上流分子として、ヒト II 型神経線維鞘腫の原因遺伝子として同定された *neurofibromatosis type 2(Nf2)* 遺伝子がコードする蛋白質 merlin (MER) が知られている。Hippo-YAPシグナル経路は、細胞レベルの機能として細胞増殖、細胞接触阻害 (contact inhibition)、上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition)、幹細胞維持、および肝細胞の脱分化などにかかわることが報告されている<sup>1-3)</sup>。

### Hippo-YAPシグナル経路による成体マウスの肝サイズ制御と発癌抑制

2007 年に Dong らは、ドキシサイクリン (Dox) 依存的に肝で YAP を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作出した<sup>4)</sup> (図 2)。本 Tg マウスにおいて Dox を投与すると、肝のサイズが野生型マウスと比較して約 5 倍にまで増加した。肝のサイズは“細胞の数”と“細胞の大きさ”により規定されるが、本 Tg マウスはおもに“細胞の数”の増加により肝のサイズが増大していることが明らかとなった。興味深いことに、この増大した肝のサイズは Dox 投与を中止すると元に戻る。すなわち、YAP による肝のサイズ制御は可逆的であることが示された。一方、8 週間以上の長期間にわたり Dox を投与し続けた本 Tg マウスは肝

細胞癌を発症した。以上の結果から、YAP は“細胞の数”を調節することにより肝のサイズを制御しており、このサイズ制御の長期間にわたる破綻が肝癌を惹起したと考えられる。

2009 年以降には、Hippoシグナル経路の構成分子を肝特異的にノックアウト (KO) したマウスの解析がつつぎと報告されてきた (表 1)。MST1 と MST2 の両者の肝特異的な KO マウスは野生型のマウスと比較して生後 2 カ月の段階で肝のサイズが 5 倍程度まで増大し、生後 3~6 カ月において肝細胞癌を発症することが複数のグループにより示された<sup>5-7)</sup>。SAV1 の肝特異的な KO マウスは生後 4 カ月において肝のサイズが 1.5 倍程度に増大し、生後 12~14 カ月ごろに肝細胞癌や胆管細胞癌を発症する<sup>6,8)</sup>。さらに、肝において MOB1A/1B が欠損したマウスは生後 17 カ月ごろに肝癌を発症する<sup>9)</sup>。また、Hippoシグナル経路の上流分子である MER の肝特異的な KO マウスは肝のサイズが 5~7 倍程度に増大し、生後 7~12 カ月において肝細胞癌や胆管細胞癌を発症する<sup>10,11)</sup>。以上のように、Hippoシグナル経路の構成分子や上流分子の KO マウスは YAP Tg マウスと同様に肝のサイズが増大し肝癌を発症することが明らかとなった。

### YAPによる発生期のマウス肝形成の制御

マウス肝の発生は胎生 8 日 (E8) ごろに、前腸内胚葉に肝の予定領域が決定されることよりはじまる。肝の発生の進行に伴い、肝内胆管の形成が起

表 1 Hippo-YAPシグナル経路構成分子の遺伝子改変マウスの表現型

分子	遺伝子改変マウス	肝のサイズ増大	肝臓形成	文献
MER	<i>Nf2<sup>+/-</sup></i>	-	+	23)
	<i>Alb-Cre Nf2<sup>fl/fl</sup></i>	+	+	10,11)
MST1/2	<i>Mst1<sup>-/-</sup>Mst2<sup>+/-</sup>*1</i>	+	+	5)
	<i>Mst1<sup>+/-</sup>Mst2<sup>-/-</sup>*2</i>	+	+	5,24)
	<i>Alb-Cre Mst1<sup>-/-</sup>Mst2<sup>fl/fl</sup></i>	+	+	5)
	<i>Ad-Cre Mst1<sup>-/-</sup>Mst2<sup>fl/fl</sup></i>	+	+	5)
	<i>Alb-Cre Mst1<sup>fl/fl</sup>Mst2<sup>fl/fl</sup></i>	+	+	6)
	<i>Alb-Cre Mst1<sup>-/-</sup>Mst2<sup>fl/fl</sup></i>	+	未記載	7)
	<i>CAGGS-CreER Mst1<sup>-/-</sup>Mst2<sup>fl/fl</sup></i>	+	+	7)
SAV1	<i>Sav<sup>+/-</sup></i>	-	+	8)
	<i>Alb-Cre Sav1<sup>fl/fl</sup></i>	+	+	6,8)
	<i>MMTV-Cre Sav1<sup>fl/fl</sup></i>	未記載	+	6)
	<i>CAGGS-Cre ER Sav1<sup>fl/fl</sup></i>	未記載	+	6)
MOB1A/1B	<i>Mob1a<sup>ΔΔ</sup>Mob1b<sup>+/+</sup>*3</i>	未記載	+	9)
YAP	<i>Tg:ApoE/tTA</i>	+	+	4)
	<i>Tg:LAP/tTA</i>	+	未記載	25)

\*1: Mst2 のアレル欠失が生じると表現型が観察される。

\*2: Mst1 のアレル欠失が生じると表現型が観察される。

\*3: Mob1b のアレル欠失が生じると表現型が観察される。

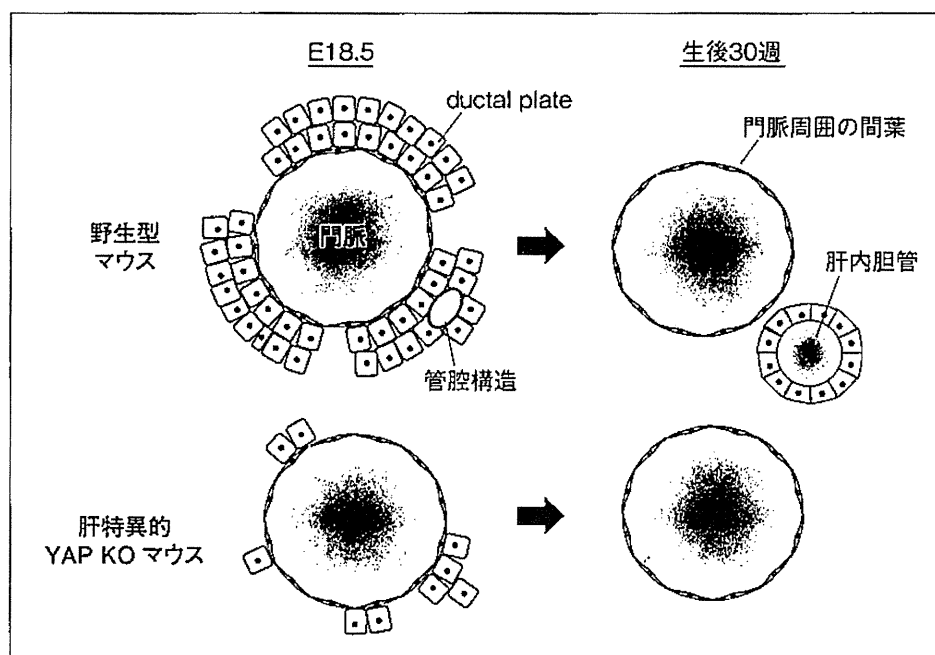


図 3 肝特異的YAP KOマウスにおける肝内胆管発生異常の解析

上: 野生型マウスにおける正常な肝内胆管形成過程. E18.5では ductal plateにより管腔構造が形成され, 生後30週には正常な肝内胆管が形成される.

下: 肝特異的YAP欠損マウスにおける肝内胆管形成異常. E18.5では ductal plateの形態異常が生じ, 管腔構造ほとんど形成されていなかった. また, 生後30週では肝内胆管は認めなかった.

こる. 肝内胆管の形成過程としては通常, E15.5ごろに門脈に隣接する胆管前駆細胞から胆管板 (ductal plate)が形成され, 出生前に ductal plate

の一部が管腔構造を呈する. その後, 管腔構造は門脈周囲の間葉に取り込まれ肝内胆管となり, 残りの ductal plate は生後に退行する.

表 2 ヒト肝癌とHippo-YAPシグナル経路構成分子のかかわり

分子	内容	文献
MST	21 例中 13 例(62%)の肝細胞癌で、切断型 MST1(活性型 MST1)が減少していた	5)
	35 例中 30 例(86%)の肝細胞癌で、リン酸化 MST1(活性型 MST1)が減少していた	13)
LATS	7 例すべての非癌部で LATS は検出されたが、7 例中 4 例(57%)の肝細胞癌で LATS は検出されなかった	14)
MOB1	21 例中 15 例(71%)の肝細胞癌で、リン酸化 MOB1(活性型 MOB1)が減少していた	5)
YAP	YAP 遺伝子座を含むゲノム領域(11q22)が増幅されている肝細胞癌を認めた	15)
	33 例の B 型肝炎ウイルス(HBV)陽性患者の肝細胞癌の解析結果では非癌部と比較して癌部の YAP の mRNA 発現は著明に上昇していた。YAP と HBx(HBV がコードする蛋白質)の両 mRNA の発現レベルには正の相関があった	16)
	20 例中 13 例(65%)の肝細胞癌で YAP の発現は亢進していた	4)
	177 例中 110 例(62%)の肝細胞癌で YAP の発現を認め、大部分は YAP は核に存在していた。YAP 陰性と比較して、YAP 陽性肝細胞癌患者は血清 AFP 値が高く、癌の分化度が低かった。また、YAP 陰性と比較して、YAP 陽性肝細胞癌患者の生存率は低かった	17)
	70 例中 47 例(67%)の肝細胞癌では YAP は強く発現していた。予後のよい患者と比較し、予後の悪い患者の肝細胞癌は核局在の YAP や血清 AFP 値の増加を認めた	18)
	115 例中 63 例(54%)の肝細胞癌で、YAP は強く発現していた	19)
	21 例中 7 例(33%)の肝細胞癌で、リン酸化 YAP(不活性型 YAP)は減少していた	5)
	70 例の肝細胞癌、16 例の胆管細胞癌、22 例の肝芽腫の大部分で YAP は核に存在していた	14)
	103 例中 67 例(65%)の肝細胞癌、62 例中 61 例(98%)の胆管細胞癌、94 例中 80 例(85%)の肝芽腫で YAP は核に存在していた	20)
	YAP 陰性と比較して、YAP 陽性肝細胞癌患者は血清 AFP 値が高く、癌の分化度が低かった。また、YAP 陰性と比較して、YAP 陽性肝細胞癌患者の生存率は低かった	21)

発生期の肝形成における YAP の機能に関してはこれまでに全身性 YAP KO マウスが作出されたが、E8.5 ごろに個体の発生が停止してしまうため肝の評価が困難であった<sup>12)</sup>。そこで Zhang らは肝特異的に YAP を KO することにより致死を回避することに成功し、胎仔や成体の肝の評価を行った<sup>11)</sup>。その結果、本マウスは E18.5 において ductal plate による管腔構造の形成はほとんど認められず、生後 30 週では正常な肝内胆管は形成されないことが示された(図 3)。また、本マウスの成体は血清ビリルビン値や alanine aminotransferase (ALT) 値が上昇しており、さらに肝の線維化をきたしていた。以上のことから、YAP はマウスの肝内胆管の形成に必要であることが明らかとなった。

### Hippo-YAPシグナル経路による ヒト肝癌発症とヒト胆道形成の制御

近年、マウスの知見と同様に、ヒトにおいても肝癌発症に Hippo-YAP シグナル経路が関与していることが明らかにされている(表 2)。Hippo-

YAPシグナル経路が肝癌発症に関与する際には、肝癌細胞において Hippoシグナル経路が不活性化されている、あるいは YAP が活性化されていると考えられる。ヒト肝癌における Hippoシグナル経路の不活性化については、これまでに MST, LATS, ならびに MOB1 に関する報告がなされている。たとえば、MST に関しては 21 例中 13 例(62%)および 35 例中 30 例(86%)のヒト肝細胞癌では非癌部と比較して活性型 MST1 が減少していることが示された<sup>5,13)</sup>。また、LATS に関しては 7 例中 4 例(57%)のヒト肝癌において LATS 蛋白質が検出されないことが報告されている<sup>14)</sup>。さらに MOB1 に関しては、21 例中 15 例(71%)のヒト肝細胞癌では非癌部と比較して活性型 MOB1 が減少していることが示されている<sup>5)</sup>。

2006 年にはヒト肝細胞癌において YAP 遺伝子座を含むゲノム領域(11q22)が増幅されていることが報告され、YAP がヒト肝細胞癌発症に関与することが示唆された<sup>15)</sup>。以降、今日までにヒト肝癌と YAP に関する報告はつぎつぎとなされており、ヒト肝細胞癌では非癌部と比較して YAP