

平成 24～26 年度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が期待される。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. Shoji Hata, Jun Hirayama, Hiroaki Kajih, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2012) A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 287, 22089-22098.
2. Yoshimi Uchida, Tomomi Osaki, Tokiwa Yamasaki, Tadanori Shimomura, Shoji Hata, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata, Takeshi Todo, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Involvement of the Stress Kinase Mitogen-activated Protein

Kinase Kinase 7 in the Regulation of the Mammalian Circadian Clock. *J. Biol. Chem.* 287, 8318-8326.

3. Yoshimi Uchida, Tadanori Shimomura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activate ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells. *Appl. Magn. Reson.* 42, 69-77.
4. Miki Nishio, Koichi Hamada, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Fumihito Noguchi, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno, Satoshi O. Suzuki, Youyi Dong, Masaaki Tokuda, Takumi Morikawa, Hiroki Hikasa, Jonathan Eggenschwiler, Norikazu Yabuta, Hiroshi Nojima, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Hiroshi Nishina, Koshi Mimori, Masaki Mori, Takehiko Sasaki, Tak W. Mak, Toru Nakano, Satoshi Itami, and Akira Suzuki (2012) Cancer Susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice. *J. Clin. Invest.* 122(12):4505-4518.
5. Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi, Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tohru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma (2012) Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential. *PLoS ONE* 7(1):e29677
6. Ken Okada, Akihito Kamiya, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hidenori Ito, Hiroki Kondou, Hiroshi Nishina and Hiromitsu Nakauchi (2012) Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem*

Cells and Development 21, 1124-1133.

7. Shoji Hata and Hiroshi Nishina (2012) [Letters to the Editor] Reply to Sun et al.: Targeting YAP acetylation in cancer. ***J. Biol. Chem.*** 287, 35443.

8. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina (2012) [review] Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain. ***J. Signal Trans.*** 2012: 459265.

9. Hiroshi Nishina (2012) [commentary] hDlk-1: A cell surface marker common to normal hepatic stem/progenitor cells and carcinomas. ***J. Biochem.*** 152, 121-123.

10. Asaoka Y, Terai S, Sakaida I, Nishina H. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dis Model Mech.* 2014; 6: 905-14.

11. Oudhoff MJ, Freeman SA, Couzens AL, Antignano F, Kuznetsova E, Min PH, Northrop JP, Lehnertz B, Barsyte-Lovejoy D, Vedadi M, Arrowsmith CH, Nishina H. Gold MR, Rossi FM, Gingras AC, Zaph C. Control of the Hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Dev. Cell* 2013; 26(2): 188-94.

12. Arima N, Uchida Y, Yu R, Nakayama K, Nishina H. Acetylcholine Receptors Regulate Gene Expression that Is Essential for Primitive Streak Formation in Murine Embryoid Bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 435: 447-53.

13. 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

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. 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 bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo.

J. Biochem. 2014; 155: 235-241.

2. 学会発表

1. Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents [2012 FASEB Science Research Conference, Aspen, USA, July 2012]

2. Tokiwa Yamasaki and Hiroshi Nishina; Stress-activated protein kinase MKK7

regulates axon elongation in the developing cerebral cortex [Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, New Orleans, USA, Oct 2012]

3. Shoji Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents [International Symposium on GENETIC AND EPIGENETIC CONTROL OF CELL FATE, Kyoto, Japan, November 2012]

4. Hiroshi Nishina; Liver Formation and Disease: Lessons from Fish and Mouse [4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Taipei, Taiwan, November 2012]

5. 仁科博史; Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [第9回心血管幹細胞研究会;2012年1月/東京]

6. 仁科博史; Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [東京大学薬学セミナー;2012年1月/東京]

7. 仁科博史; モデル生物を用いた器官形成機構の解明[山口大学医学部セミナー;2012年1月/宇部]

8. 岩月麻美子他; 神経組織特異的 Mkk7 欠損マウスの解析[第132回日本薬学会; 2012年3月/札幌]

9. 畠星治、仁科博史; がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第16回日本肝臓医生物学研究会; 2012年3月/熱海]

10. 宮村憲央、[仁科博史](#)；がん遺伝子 YAP による肝細胞がんの発症機構の解明[第 16 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 3 月 / 熱海]
11. [仁科博史](#)；質量顕微鏡法[第 55 回日本腎臓学会学術総会;2012 年 6 月 / 横浜]
12. 畠星治他；がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定[第 19 回肝細胞研究会；2012 年 6 月 / 札幌]
13. 宮村憲央他；がん遺伝子産物 YAP による細胞競合および肝がん誘導系の確立 [第 19 回肝細胞研究会；2012 年 6 月 / 札幌]
14. 内田好海他；ストレス応答性キナーゼ MKK7 による概日リズム制御機構の解明 [第 11 回生命科学研究会；2012 年 6 月 / 秋田]
15. 浅岡洋一；ストレス応答性 MAP キナーゼシグナル伝達系のゼブラフィッシュ初期胚における役割の解明[第 34 回日本比較生理生化学会；2012 年 7 月 / 葉山] 第 21 回吉田奨励賞受賞講演
16. 山崎世和他；細胞の生死を制御するストレス応答性 MKK7 の神経系における生理的役割の解明 [第 21 回日本 Cell Death 学会；2012 年 7 月 / 名古屋]
17. [仁科博史](#)；マウスとメダカから学ぶ肝形成と肝疾患[秋田大学医学部セミナー;2012 年 8 月 / 秋田]
18. 有馬誉恵他；神経細胞特異的欠損マウスを用いた概日リズム制御機構におけるストレス応答性キナーゼ MKK7 の機能解析 [第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム;2012 年 9 月 / 福岡]
19. 内田好海他;ストレス応答性 MKK7-JNK シグナル経路による分子時計制御 [第 11 回ファーマバイオフォーラム 2012；2012 年 9 月 / 福岡]
20. 平山順他；ストレス応答性リン酸化酵素による概日リズム制御 [第 19 回日本時間生物学学会学術大会；2012 年 9 月 / 札幌]
21. 山崎世和他；JNK signaling is required for the maintenance of motor performance in old-age animals [第 35 回日本神経科学大会；2012 年 9 月 / 名古屋]
22. 平山順他；Light-dependent UV-tolerance in zebrafish early embryo [第 18 回小型魚類研究会；2012 年 9 月 / 京都]
23. 浅岡洋一他；Analysis of the Hippo signaling pathway regulating neuronal differentiation in the retina. [第 18 回小型魚類研究会；2012 年 9 月 / 京都]
24. 宮村憲央、[仁科博史](#)；がん遺伝子 YAP による肝細胞癌発症機構の解明[第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月 / 旭川]
25. 千葉恭敬、[仁科博史](#)；がん遺伝子 YAP 誘導性肝細胞がんのゲノム解析 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月 / 旭川]
26. 斎藤光介、[仁科博史](#)；YAP パラログ TAZ の肝がん誘導能の検討 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月 / 旭川]
27. 浅岡洋一、[仁科博史](#)；器官サイズ制御因子 YAP の網膜分化における機能解析 [第 5 回 RRM；2012 年 12 月 / 東京]
28. [仁科博史](#)；がん遺伝子 yap 依存的異常肝細胞の排除と肝細胞がんの発症 [第 35 回日本分子生物学会年会；2012 年 12 月 / 福岡]
29. 平山順他；ストレス応答性キナーゼによる概日リズム制御 [第 35 回日本分子生物学会年会；2012 年 12 月 / 福岡]
30. 畠星治他；がん遺伝子産物 YAP アセチル化サイクルの同定 [第 85 回日本生化学会大会；2012 年 12 月 / 福岡]
31. [Hiroshi Nishina](#)；A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal

- hepatocyte disappearance. [The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells, Osaka, September 26-27, 2013]
32. Shoji Hata, Yutaka Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of YAP is triggered to S_N2 alkylating agents [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
33. Norio Miyamura and Hiroshi Nishina; A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal hepatocyte disappearance [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
34. 仁科博史; 異常肝細胞排除現象の発見と機構解明 [第 19 回日本肝臓医生物学研究会; 2013 年 11 月 30 日 / 札幌]
35. 仁科博史; Roles of Hippo signaling pathway in murine liver [第 86 回日本生化学会大会; 2013 年 9 月 11-13 日 / 横浜]
36. 仁科博史; 細胞の生死を制御する JNK シグナル伝達系の新規生理機能の解明 [第 22 回日本 Cell Death 学会; 2013 年 7 月 19-20 日 / 京都]
37. 仁科博史; 肝臓のサイズとがん発症を制御する Hippo シグナル伝達系 [日本生化学会関東支部例会; 2013 年 6 月 15 日 / 山梨]
38. 仁科博史; ストレス応答性 MKK の生化学・生理機能の解明 [新潟大学医歯学系分子細胞機能学セミナー; 2013 年 3 月 4 日 / 新潟]
39. 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]
40. 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]
41. 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]
42. 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]
43. 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]
44. 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]
45. 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]
46. 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]
47. 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]

48. 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]
49. 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]
50. 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]
51. 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]
52. 濱部凜他；ロ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]
53. 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]
54. 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]
55. 濱部凜他；ロ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]
56. 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]
57. 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]
58. 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]
59. 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]
60. 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]
61. 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]
62. 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]
63. 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