

分担研究報告書

分担研究課題 「モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析」

研究分担者 仁科 博史 東京科学大学 総合研究院 難治疾患研究所
発生再生生物学分野

研究要旨

本分担研究では、これまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品を安全の視点から研究する。特に遺伝子変異やエピジェネティクス変化による解析等を検討し、細胞の分化増殖過程におけるハザード解析を検討する。

転写共役因子 YAP はその強力な細胞増殖促進活性から、正常培養細胞を増やすために利用が考えられている。一方、YAP は強力ながん発症促進活性も有している。それゆえ、YAP 利用に当たっては、正常培養細胞をがん化誘導することなく、正常細胞状態のまま細胞増殖させる技術の開発が必要である。この目的遂行のために、我々はまず、YAP 遺伝子をマウス肝臓に発現させる実験を行った。その結果、1) 野生型(WT)YAP に比較して、3 種類の活性型 YAP (1SA, 2SA, 5SA、それぞれセリン残基を 1 個アラニンに置換したもの、2 個置換したもの、5 個置換したものに対応する) はすべて肝細胞の増殖を促進することが示された。2) また、YAP (2SA) と YAP (5SA) は肝がん発症を誘導した。興味深いことに YAP (1SA) は細胞増殖を促進したが、肝がん発症は誘導しなかった。次にがん化の原因を探索するために、YAP (2SA) 発現による遺伝子変異やエピジェネティクス変化の解析を行った。その結果、3) 既に多くのがんで報告されているように体細胞ゲノム変化が生じていた。興味深いことに、アセチル化やメチル化のエピジェネティクス変化も誘導されていた。以上の結果は、細胞増殖には YAP の活性化が必要であるが、その活性化が強すぎるとがん発症に至ること、また、YAP の強い活性化は予想通り、ゲノム変化やエピジェネティクス変化を誘導することを示唆している。結論として、細胞増殖のために、YAP を利用する場合には、適切 YAP 活性を制御することが必要であることが示された。

A. 研究目的

転写共役因子 YAP はその強力な細胞増殖促進活性から、正常培養細胞を増やすために利用が考えられている。実際、各種細胞に活性型 YAP を導入すると、細胞増殖は促進される。一方、YAP は強力ながん発症促進活性も有している。ヒトの複数のがん種において YAP の活性化が報告されている。肝がんでは、50%以上で YAP が活性化されているという報告もある。それゆえ、YAP 利用に当たっては、正常培養細胞をがん化誘導することなく、正常細胞状態のまま細胞増殖させる技術の開発が必要である。本研究では、野生型 YAP、活性化の程度の異なる YAP を肝細胞に導入し、その細胞増殖能とがん化誘導能を検討することを目的にした。

細胞増殖誘導活性を付与するために、YAP のアミノ酸残基の置換に着目した。野生型は刺激がない場合は不活性型であるため、細胞増殖を誘導しない。細胞増殖を誘導するためには、該当の Ser (S) 残基を Ala (A) 残基に置換する必要がある。3 種類の活性型 YAP (1SA, 2SA, 5SA、それぞれセリン残基を 1 個アラニンに置換したもの、2 個置換したもの、5 個置換したものに対応する) の活性化の程度は、YAP (5SA) > YAP (2SA) > YAP (1SA) の順番になることが知られている。

B. 研究方法

YAP の活性化体 YAP (2SA) を発現する環状プラスミドを、Hydrodynamic 法を用いてマウスの肝臓にモザイク状に導入した。その後、マウスの肝臓を回収し、組織学的解析、RNA-seq 解析、Whole Exome Sequence (WES) 解析、DNA メチル化解析を行った。

ネットワーク解析には、NetworkAnalysist 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca>) を使用した。

プラスミド

Flag タグおよび Myc タグ×5 (5 つの Myc がタンデムになっている) を付加した Full-length human YAP cDNA を pLIVE プラスミド (Mirus Bio) の Xba I サイトに挿入した発現ベクターを用いた。IRES 型プラスミドも同様

に Flag-Myc-YAP (2SA)-IRES-NLS-Cre cDNA を pLIVE プラスミドの Xba I サイトに挿入した発現プラスミドを用いた。YAP (1SA), YAP (2SA), YAP (5SA) は PCR を用いてサイト特異的に変異を導入したものを用いた⁷。発現プラスミドに挿入されたそれぞれの cDNA はマウス AFP エンハンサーおよびマウス Albumin プロモーターによって発現が誘導される。

Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 発現プラスミド (20 μ g) をマウス体重の約 10% 量の TransIT-EE Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus Bio) に希釈した (20–23g のマウスに対して 2 ml)。実験に使用するマウスの尻尾を 42–50°C のお湯に 20–30 秒浸し、2.5ml シリンジと 27G の注射針を用いて発現プラスミドを希釈した溶液を尾静脈から約 7–8 秒で導入した。

HE 染色

マウス肝臓を 4% paraformaldehyde (PFA) 中で 4°C で一晩振盪し、固定した。PFA 固定後 70% EtOH 中で一晩固定した。EtOH 固定後の肝臓は分葉し、Thermo Excelsior ES を用いてパラフィン置換した。パラフィン置換した肝臓を用いてパラフィンブロックを作製した。MICROM HM335E を用いてパラフィンブロックを 5 μ m の厚みに薄切し、切片を作製した。薄切切片の脱パラフィンは、Xylene で 15 分間×2 回、100% EtOH で 10 分間×2 回、90% EtOH で 5 分間×1 回、70% EtOH で 5 分間×1 回、流水で軽く洗浄後、Milli-Q で軽く洗浄する手順で行った。脱パラフィン後の切片を Mayer's Hematoxylin で 10 分間染色し、42–45°C のお湯で 10 分間処理した後に、Eosin で 5 分間染色した。染色後の切片は 70% EtOH で 1 分間×1 回、100% EtOH で 3 分間×2 回、100% EtOH で 5 分間×1 回、Xylene で 5 分間×2 回洗浄する手順で透徹し、MOUNT-QUICK (DAIDO) とカバーガラスを用いて封入した。組織像の観察及び撮影は、BZ-X710 (KEYENCE) で行った。

RNAseq 解析

RNA 配列解析は、タカラバイオ株式会社 (日本、滋賀) に委託した。RNeasy Mini Kits (74104; QIAGEN, Hilden, German) を用いて、製造者の指示に従って total RNA を抽出した。抽出した RNA を DNase I (2270B; Takara, Shiga, Japan) とインキュベートし、ゲノム

を分解させた。RNAの品質は、まず1.5%アガロースゲルでの電気泳動で評価し、その後、吸光度計で評価した。遺伝子は、fold-changeが2より大きいとき、差次的に発現しているとみなされた。GO解析は、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tool (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては組換えDNA実験を含むが、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、およびこれに基づく政省令・告示に示される基準に適合し、かつ所属機関の承認を得ている。また、動物実験の承認も得ている。

C. 研究結果及び考察

その結果、1) 野生型(WT)YAP に比較して、3種類の活性化型 YAP(1SA, 2SA, 5SA、それぞれセリン残基を1個アラニンに置換したもの、2個置換したもの、5個置換したものに対応する)はすべて肝細胞の増殖を促進することが示された。2) また、YAP(2SA)とYAP(5SA)は肝がん発症を誘導した。興味深いことにYAP(1SA)は細胞増殖を促進したが、肝がん発症は誘導しなかった。次にがん化の原因を探索するために、YAP(2SA)発現による遺伝子変異やエピジェネティクス変化の解析を行った。その結果、3) 既に多くのがんが報告されているように体細胞ゲノム変化が生じていた。興味深いことに、アセチル化やメチル化のエピジェネティクス変化も誘導されていた。以上の結果は、細胞増殖にはYAPの活性化が必要であるが、その活性化強すぎるとがん発症に至ること、また、YAPの強い活性化は予想通り、ゲノム変化やエピジェネティクス変化を誘導することを示唆している。

D. 結論

令和6年度は、YAPの有する細胞増殖能とがん化誘導能について検討し、YAPの活性化の強弱によって、がん化誘導能の有無が決定することが示唆された。食品となる培養細胞の増殖に応用する場合は、YAP活性化を制

御可能な技術の導入を考慮する必要があると考えられる。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- Miki Nishio, Keiko Yamaguchi, Junji Otani, Katsuya Yuguchi, Daisuke Kohno, Tsutomu Sasaki, Tadahiro Kitamura, Masakazu Shinohara, Tomoyoshi Soga, Koichi Kawamura, Atsuo T., Masashi Oshima, Hiroki Hikasa, Minna Woo, Takehiko Sasaki, Hiroshi Nishina, Kazuwa Nakao, Tomohiko Maehama and Akira Suzuki (2025) Mob1 deletion in murine mature adipocytes ameliorates obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* accepted
- 仁科博史：やっぱり Science は面白い！ *日本 Cell Death 学会 HP*
- 小藤智史、仁科博史：ストレス応答シグナルによる肝再生制御 *医学のあゆみ* 2025年5月17日発行予定
- 仁科博史、セコム科学技術振興財団の研究者インタビュー 2024年10月1日

2. 学会発表

仁科博史、JNK および Hippo リン酸化シグナル伝達経路の生理的役割、神戸大学 CMX 創発医学講演会(2024. 6. 24) 神戸

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし