

## 論文の内容の要旨

論文題目 細胞外基質によるがん抑制性 Hippo シグナル経路の活性化制御機構

大木拓也

Hippo シグナル経路は、細胞の増殖・分化から臓器、器官の形成・ホメオスタシス維持に至る多彩な生命現象に関わる重要なシグナル経路の1つとして知られている。細胞密度依存的な Hippo シグナル経路の活性化はタンパク質リン酸化酵素である MST1/2 ならびに LATS1/2 を活性化し、下流の転写共役因子である YAP 及びそのホモログ TAZ をリン酸化することで核移行を阻害する。YAP は転写因子である TEA-domain (TEAD) と結合し細胞増殖に関わる遺伝子群の転写を促進するため、YAP の核移行阻害により細胞増殖が抑制される。正常細胞において見られるこの細胞密度依存的な増殖抑制機構は接触阻害と呼ばれ、正常細胞が示す重要な生物学的特徴の1つとされている。一方で、多くのがん細胞において Hippo シグナル経路の機能異常が報告されており、Hippo シグナル経路の機能回復は新たながん治療戦略となることが期待される。しかしながら、Hippo 経路の活性化を担う MST1/2 の上流シグナルの本態は不明なままである。そこで、本研究では、近年の研究により明らかになった、細胞外基質分子のひとつである高分子量ヒアルロン酸 (H-Ha) が、接触阻害の中でも早い段階で起きる早期接触阻害を誘導する点に着目し、細胞外基質ヒアルロン酸が Hippo シグナル経路の活性制御に与える影響および、そのシグナル伝達の分子機構解明を目指した。

初めに、哺乳動物細胞における Hippo シグナル経路制御に細胞外基質分子が与える影響を検討した。ヒト正常乳腺上皮由来 MCF10A 細胞に種々の細胞外基質分子を添加したところ、H-Ha によって YAP の細胞質内蓄積が促進した。また、H-Ha は濃度依存的に TEAD 反応性レポーター活性を抑制した。さらに MCF10A 細胞において、内因性 LATS1/2 の発現を抑制したところ、H-Ha により促進する YAP の細胞質内蓄積を抑制した。以上の観察から、H-Ha が Hippo シグナル経路を活性化することが示唆された。次に、細胞が直接産生する内因性 H-Ha の分解が Hippo シグナル経路に及ぼす影響を検討するために、ヒアルロン酸分解酵素である HYAL2 を MCF10A 細胞に異所性発現させた。その結果、高分子量分画ヒアルロン酸の分解に伴い活性型 LATS1 (LATS1-pThr1079) および、リン酸化型 YAP (YAP-pSer127) の減少が認められた。加えて、HYAL2 の異所性発現は、細胞密度依存的な TEAD レポーター活性の低下を阻害した。これらの結果から、細胞密度依存的な Hippo シグナル経路の活性制御に内因性のヒアルロン酸の関与が示唆され、細胞外基質 H-Ha が、Hippo シグナル活性化に関わるリガンドとして機能することが示唆された。

次に、H-Ha の分解による Hippo シグナル経路の脱制御が、発がん関連の細胞機能に影響を及ぼすか否かを検討するため、頂底極性及び内腔を持つ MCF10A 細胞シストを三次元培養により形成し形態を観察した。結果、HYAL2 の異所性発現により MCF10A シストの増殖を伴うパイルアップが観察された。さらに、HYAL2 により低分子量分画のヒアルロン酸が増加したことに注目し、Hippo シグナル

経路における低分子量ヒアルロン酸 (L-Ha) の果たす役割を検討した。MCF10A 細胞に L-Ha を添加したところ、Hippo シグナル経路が抑制され、三次元培養において増殖を伴う形態変化が誘導された。また、この現象は H-Ha により抑制された。これらの結果から、細胞外基質 H-Ha は Hippo シグナル経路を活性化し細胞の異常増殖を抑制する一方で、H-Ha の分解により生じる L-Ha は Hippo シグナル経路を抑制することで細胞増殖の促進に寄与することが示された。よって、Hippo シグナル経路においてヒアルロン酸はその分子量によって相反する機能を持つことが明らかとなった。

そこで、細胞外基質ヒアルロン酸による Hippo シグナル経路制御の分子機構を検討するため、ヒアルロン酸受容体として知られる CD44 に注目し、MCF10A 細胞を用いて CD44 の発現抑制を行った。結果、CD44 発現抑制により細胞密度依存的な Hippo シグナル経路活性化の抑制、ならびに、H-Ha により促進する YAP 細胞質内蓄積の抑制が観察された。加えて、三次元培養において CD44 発現抑制は増殖による形態変化を促進し、この現象は内因性 YAP の発現抑制により阻害された。これらのことから、CD44 は H-Ha による Hippo シグナル経路活性化において受容体としての役割を果たすことが示唆された。

次に、H-Ha と CD44 の相互作用を起点とする Hippo シグナルの細胞内伝達機構を解明するため、CD44 下流で機能する分子の探索を行った。GST 融合 CD44 細胞内領域 (CD44-ICD : CD44 intracellular domain) とヒト乳がん由来 MCF7 細胞株の細胞溶解液の GST プルダウンアッセイにより得られた試料を用いた LC MS/MS 解析により、Hippo 経路構成分子 MST1/2 との関連が報告されている MARK4 のファミリーである PAR1b/MARK2 が CD44 細胞内領域に結合する分子として同定された。加えて PAR1b は、イムノブロット法ならびに、免疫沈降実験を用いた解析により、MST1/2 と複合体を形成し、PAR1b のキナーゼ活性依存的に活性型 MST1/2 を減少させた。また、PLA (Proximity Ligation Assay) を用いたタンパク質-タンパク質相互作用の解析を行った結果、H-Ha は CD44 と PAR1b の複合体形成を促進させ、HYAL2 異所性発現によりこの複合体形成は抑制された。一方、H-Ha は PAR1b と MST1/2 の複合体形成を抑制し、HYAL2 異所性発現によりこの複合体形成は促進した。以上の結果から、H-Ha は、CD44-PAR1b 複合体形成を促進すると同時に、PAR1b-MST1/2 複合体形成の解離を進めることで PAR1b による MST1/2 の抑制を解除し、Hippo シグナルを活性化することが推察された。

次に、PAR1b-MST1/2 複合体形成に注目し、PAR1b による MST1/2 活性制御に関しての詳細を検討した。MST1/2 の一次構造から PAR1b の標的候補となり得るスレオニン/セリン残基の有無を検索し、これらの MST1/2 アミノ酸残基が PAR1b により直接リン酸化を受けるか否かを検討するために、*in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、PAR1b は MST1-Thr440 および、MST2-Ser444 残基を直接リン酸化した。加えて、これらのアミノ酸残基をアラニンに置換したリン酸化抵抗型 MST1/2 を HEK293T 細胞に異所性発現させたところ、LATS1-pThr1079 および YAP-pSer127 が増加した。以上の結果から、PAR1b は MST1/2 の Thr440/Ser444 リン酸化を介して Hippo シグナル経路を抑制していることが示唆された。

以上の結果をもとに、CD44-PAR1b 複合体形成と PAR1b による MST1/2 の Thr440/Ser444 リン酸化の機能連関を明らかにするため、*in vitro* キナーゼアッセイにより CD44-ICD 共存下における PAR1b による MST2 Ser444 リン酸化への影響を検討したところ、PAR1b による MST2-Ser444 のリン酸化は CD44-ICD の共存下で抑制された。さらに、MCF10A 細胞において CD44 の発現抑制が PAR1b-MST2 複合体形成を促進させ、活性型 MST2 を減少させた。以上の結果より、CD44-PAR1b 複合体形成と PAR1b-MST1/2 複合体形成は互いに競合することで、MST1/2 活性を制御することが示唆された。

トリプルネガティブ乳がん (TNBC) では HYAL2 の高発現が予後と関連する。この点に注目し、乳がん細胞における H-Ha-CD44-Hippo シグナルの病態生理学的意義を検討した。種々の乳がん細胞を用いて、*HYAL2* および YAP 標的遺伝子 *CTGF* の発現を qRT-PCR 法を用いて解析したところ、両者の発現は TNBC 細胞株で増加し、*HYAL2* と *CTGF* の発現には正の相関があった。また、これらの細胞株のヒアルロン酸分子量を解析したところ、*HYAL2* 発現に一致し TNBC 細胞株において高分子量分画ヒアルロン酸の分解が観察された。さらに、TNBC 細胞株において PAR1b-MST2 複合体形成の促進と活性型 MST2 の減少、および、YAP の核内蓄積が認められた。この結果と一致し、ヒト乳がん患者組織を用いた免疫組織化学染色により、TNBC 患者組織での *HYAL2* の高発現ならびに、*HYAL2* 高発現乳がん組織における YAP の核内蓄積が観察された。これらの結果から、*HYAL2* 高発現によるヒアルロン酸の分解促進が、H-Ha-CD44-Hippo シグナルを抑制することで、乳がん、特に TNBC の進展・悪性化に寄与している可能性が示唆された。

以上の一連の結果より、細胞外基質分子ヒアルロン酸ならびに、CD44 が Hippo シグナル経路を制御するリガンドならびに受容体として機能することを明らかにし、H-Ha-CD44-Hippo シグナルの分子制御機構を明らかにした。さらに、ヒアルロン酸の分解促進による細胞外基質の環境変化は Hippo シグナル経路抑制を介して YAP を活性化し、発がん微小環境形成に寄与することが示唆された。