

審査の結果の要旨

氏名 大木 拓也

本研究は、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おいて重要な役割を演じていると考えられている種を超えて広く保存された Hippo シグナル経路の細胞外基質分子による制御機構を明らかにするため、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系ならびに、ヒト乳がん患者組織を用いた実験系にて、細胞外基質分子による Hippo シグナル制御機構の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト正常乳腺上皮由来 MCF10A 細胞の培養上清中に種々の細胞外基質分子を添加した結果、高分子量ヒアルロン酸 (H-Ha) により核内 YAP が減少した。この結果と一致し、ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞への H-Ha 添加により TEAD 反応性のルシフェラーゼレポーター活性が減少した。H-Ha による YAP の局在制御が Hippo シグナルコアキナーゼである LATS1/2 を介しているかを検討するため、LATS1/2 を発現抑制させた MCF10A 細胞に H-Ha を添加した結果、LATS1/2 発現抑制により H-Ha による核内 YAP の減少が阻害され、H-Ha が Hippo シグナル経路のリガンドとして機能し、YAP の活性を制御することが示唆された。
2. HEK293T 細胞にヒアルロン酸分解酵素 HYAL2 を異所性発現させたところ、細胞密度依存的に抑制される TEAD 反応性のルシフェラーゼレポーターの活性は HYAL2 の異所性発現により回復した。イムノブロット法ならびに三次元培養により、HYAL2 の異所性発現ならびに、ヒアルロン酸の分解により産生される低分子量ヒアルロン酸 (L-Ha) を添加した MCF10A 細胞では、活性型 LATS1/2 および、リン酸化 YAP が減少ならびに細胞増殖の促進が認められた。加えて、この L-Ha による Hippo シグナルの抑制は、H-Ha の共存下で回復することから、Hippo シグナル制御機構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示すことが明らかとなった。
3. H-Ha による Hippo シグナル活性化における受容体を明らかにするため、ヒアルロン酸結合膜タンパク質である CD44 の発現を抑制させた MCF10A 細胞を用いて解析を行ったところ、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 により促進される YAP の細胞質内蓄積が抑制され、CD44 が H-Ha による Hippo シグナル活性化において受容体として機能することが示唆された。
4. 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ところ、LC MS/MS 解析により、PAR1b/MARK2 が CD44 細胞内領域に結合する分子として同定された。免疫沈降実験

ならびに、イムノブロット法により PAR1b は MST1/2 と複合体を形成し、キナーゼ活性依存的に活性型 MST1/2 の量を減少させた。PLA (Proximity Ligation Assay) によりタンパク質-タンパク質相互作用の解析を行ったところ、H-Ha は CD44 と PAR1b の複合体形成を促進させる一方で、PAR1b と Hippo シグナルコアキナーゼである MST1/2 の複合体形成を低下させたことから、H-Ha は、CD44-PAR1b 複合体形成を促進すると同時に、PAR1b-MST1/2 複合体形成を低下させることで 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示唆された。

5. PAR1b による MST1/2 の直接的リン酸化の有無を検討するため、MST1/2 の一次構造中における PAR1b 標的候補配列を検索し、*in vitro* キナーゼアッセイにより MST1-Thr440 および MST2-Ser444 が PAR1b により直接リン酸化されることが示された。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、活性型 LATS1 およびリン酸化 YAP が増加したことから、PAR1b による Hippo シグナルの抑制には MST1/2 の Thr440/Ser444 のリン酸化が重要であることが示唆された。
6. ヒアルロン酸による Hippo シグナル制御機構の病態生理学的意義を検討するため、種々の乳がん細胞株を用いて、HYAL2 および YAP 標的遺伝子 CTGF の発現を qRT-PCR により解析した結果、両者の発現はトリプルネガティブ乳がん細胞株 (TNBC) で有意に増加し、HYAL2 と CTGF 発現間には正の相関が認められた。これらの細胞株のヒアルロン酸分子量を解析した結果、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、PLA ならびに、免疫蛍光染色を用いた解析により、TNBC 細胞株における PAR1b-MST2 複合体形成の促進と、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とから、HYAL2 高発現による H-Ha 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、とりわけ TNBC の進展・悪性化に寄与する可能性が示唆された。

以上、本論文は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示した。加えて、ヒアルロン酸の分解促進による細胞外基質の環境変化が、Hippo シグナル経路抑制による YAP 活性化を介した、発がん微小環境形成に寄与する可能性を示した。本研究成果は、細胞外基質分子による新たな Hippo シグナル制御機構を示し、発がんにおける YAP 活性化機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。