

氏名(生年月日) いけ うち まさ よし 池 内 正 剛 (1992年10月23日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第200号

学位授与の日付 2021年3月20日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 v-Srcによるがん化に抵抗するLATS2のキナーゼ活性非依存機能の解析

論文審査委員 (主査) 教授 中山 祐治

(副査) 教授 藤室 雅弘

(副査) 教授 高田 和幸

## 論文内容の要旨

### 序章

日本における死因の第1位はがんであり、罹患数の多い大腸がんや乳がんではc-Srcチロシンキナーゼの活性亢進や過剰発現が知られている。ラウス肉腫ウイルスから発見されたがん遺伝子産物v-Srcはc-Srcの活性異常亢進型であり、増殖促進や足場非依存的増殖能の獲得により細胞をがん化する。しかし、v-Srcの細胞増殖抑制効果も報告され、v-Srcによる細胞がん化機構の全貌が解明されたわけではない。Hippo経路は、正常細胞の過剰増殖を抑制するシグナル伝達経路であり、細胞間の接着などによりLATS1/2キナーゼが活性化し転写共役因子YAPをリン酸化して細胞増殖を抑制する。このHippo経路の破綻は自律性増殖につながり、SrcはPI3K経路の活性化やYAPのリン酸化などを介してこの経路を抑制するが、未解明の機構も示唆されている。しかし、v-Srcによる細胞増殖の抑制は、SrcによるHippo経路の抑制が細胞増殖に直結しないことを示している。そこで、v-Srcによる細胞がん化機構の解明を目指し、LATS2に対する作用を介したHippo経路の破綻と、惹起される細胞応答を解析した。

### 第1章 v-SrcによるLATS2のキナーゼ活性低下とキナーゼ活性に依存しない機能

v-SrcがHippo経路を抑制する複数の機構が報告されており、LATS2の翻訳後修飾の関与を調べた。EGFP-LATS2、V5-LATS2、EGFP-LATS1 (アイソフォーム2)、内在性LATS2のv-Src発現細胞からの免疫沈降により、LATS2のチロシンリン酸化の亢進を見出した。NIH3T3細胞において、v-SrcはLATS2を特異的にモビリティシフトさせた。また、*in vitro*キナーゼアッセイにおいて、v-Srcやc-SrcによるLATS2のリン酸化が観察され、*in vitro*でc-Srcによりリン酸化されたLATS2によるYAPのリン酸化が低下した。よって、c-Src/v-SrcによるLATS2のチロシンリン酸化がLATS2のキナーゼ活性を低下させることが明らかになった。

LATS2のキナーゼ活性に依存しない機能が報告されている。そこで、v-Src発現細胞でLATS2をノックダウンすると、v-Srcにおいて観察された細胞膜の突出(ブレブ)が増加し、野生型LATS2のみならず、キナーゼ不活性型LATS2の再発現はこのブレブ形成を抑制した。すなわち、v-Src発現細胞で、LATS2はキナーゼ活性に依存せず細胞膜の剛性維持に関わることが示唆された。興味深いことに、v-Src発現やHT29細胞の内在性c-Srcの活性化によりLATS2の発現レベルが上昇し、この上昇はYAPノックダウンにより抑制された。LATS2のmRNAレベルはv-Src発現により上昇したが、LATS1は変化しなかった。

一方、プロテアソーム阻害、オートファジー阻害ではこのような発現上昇は観察されなかった。よって、v-SrcによるHippo経路の抑制がYAPの転写活性抑制を解除し、その結果、YAPを介した転写亢進に依存してLATS2の発現レベルが上昇することが明らかになった。これらの結果は、v-SrcはHippo経路の中心的なキナーゼであるLATS2のキナーゼ活性を抑制するが、LATS2はYAP依存的な転写亢進により過剰発現し、キナーゼ活性に依存せずにv-Srcによるブレブ形成を抑制することを示している。

## **第2章 Merlinとの結合に依存したLATS2のブレブ形成抑制**

Hippo経路の活性化において、LATS2はERMファミリータンパク質のMerlinと結合して細胞膜へ運ばれる。Merlinは、細胞膜とアクチン骨格を架橋する働きを持ち、LATS2と同様にMerlinのノックダウンもv-Srcによるブレブ形成を亢進させた。MerlinはLATS2には依存せず細胞膜に局在したが、LATS2はMerlin非導入細胞では細胞膜に局在せず、膜局在したMerlinと共局在した。v-Src発現により、細胞膜上で外因性のMerlinとLATS2の共局在が促進したが、Merlin結合部位を欠く変異体LATS2は共局在を示さず、再発現してもLATS2ノックダウンによるブレブ形成亢進を抑制しなかった。Merlin Ser518のリン酸化はMerlinを他分子と相互作用しない不活性型にするが、v-Src発現細胞ではそのリン酸化が減少し、Merlinと共沈降するLATS2の量が増加した。ERMファミリーに属するezrinも細胞膜とアクチン骨格を架橋してブレブを退縮させるが、Merlin同様、ezrinのノックダウンもv-Srcによるブレブ形成を亢進させた。これらの結果から、v-Srcはブレブ形成を引き起こすが、同時に細胞膜において形成促進したLATS2-Merlin複合体が細胞膜-アクチン骨格架橋を強固にしてブレブ形成を抑制することが示唆された。

## **第3章 v-Srcにより惹起されるDNA損傷応答**

LATS2 はがん抑制遺伝子として知られている。LATS2 のノックダウンによるブレブ形成促進は、LATS2 が v-Src によるブレブ形成を抑制することを示している。ブレブ形成の原因がアポトーシス誘導であれば、v-Src による細胞死をがん抑制遺伝子産物である LATS2 が抑制することになる。しかし、LATS2 ノックダウンでは v-Src による生存細胞数減少は影響を受けず、アポトーシスの指標である活性型 caspase-3 も検出されなかった。一方、v-Src は DNA 損傷などにより誘発される染色体架橋形成を誘導した。v-Src 発現細胞で DNA 損傷の指標である  $\gamma$ H2AX が Src 活性に依存して検出され、ATM/ATR 経路の下流で Chk1/Chk2 キナーゼの活性化を誘導した。よって、v-Src 発現により誘導される DNA 損傷が、ATM/ATR 経路の活性化を介して細胞周期停止を誘導することが示唆され、v-Src 発現細胞で観察される増殖抑制に DNA 損傷応答の関与が推定された。

## **総括**

本研究は、v-Src が LATS2 をリン酸化して不活性化し Hippo 経路を破綻させること、さらに、LATS2 のキナーゼ活性に依存せずに LATS2-Merlin 複合体が v-Src によるブレブ形成を抑制することを明らかにした。ブレブの拡張と退縮は浸潤・転移に関与するため、LATS2 は Hippo 経路が破綻してもキナーゼ活性非依存的にがん抑制に働くと考えられる。よって、v-Src は様々なシグナル経路を活性化するが、細胞はブレブ形成の抑制や DNA 損傷応答により、v-Src による浸潤・転移、形質転換を阻止する。しかし、v-Src は DNA 損傷の蓄積や染色体分配異常を引き起こし、その結果獲得された遺伝的多様性を示す細胞集団から自律性増殖を獲得した細胞が選択されて増殖し、がん細胞が生まれると推測している。本研究は、Src の活性亢進や過剰発現を伴う細胞のがん化に新しい知見を提供し、がんの新規の治療戦略に繋がる可能性を持つ。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

v-Src はラウス肉腫ウイルスから発見されたがん遺伝子産物であり、多くの細胞に発現している c-Src の活性異常亢進型である。v-Src による増殖シグナルや生存シグナルの亢進は、細胞増殖や足場非依存的増殖を誘導し細胞を形質転換する。しかし、v-Src には細胞増殖を抑制する効果もあるなど、長期にわたり研究されてきたにも関わらず、v-Src が細胞に及ぼす影響とがん化機構の全てが明らかになったわけではない。例えば、細胞増殖を抑制的に制御する Hippo 経路を v-Src は阻害するが、この効果は細胞増殖の亢進には直結しない。そこで本研究では、v-Src による細胞がん化機構の解明を目指し、Hippo 経路の主要なキナーゼである LATS2 に着目し、v-Src による Hippo 経路への影響と惹起される細胞応答を解析した。

### 《審査結果の要旨》

#### (1) v-Src 発現細胞における LATS2 の機能

v-Src 発現細胞において LATS2 がチロシンリン酸化される可能性が示唆されていたため、v-Src の関与と LATS2 のキナーゼ活性への影響を *in vitro* キナーゼアッセイなどにより調べた。その結果、v-Src が直接 LATS2 をリン酸化し LATS2 のキナーゼ活性を低下させること、主要なリン酸化部位が Tyr655 と Tyr879 のいずれか、あるいは両方であることを見出した。また、LATS2 のキナーゼ活性低下は、YAP を介して LATS2 自身の転写活性化を誘導し、過剰発現しキナーゼ活性が低下した LATS2 が、v-Src により誘導されるブレブ形成を抑制することを明らかにした。

#### (2) LATS2 による、ブレブ抑制機構

LATS2 によるブレブ形成抑制機構として、ERM ファミリータンパク質である Merlin の関与を調べた。その結果、Merlin も LATS2 同様、v-Src により誘導されるブレブ形成抑制に関与した。LATS2 の細胞膜局在は Merlin に依存し、Merlin 結合部位を欠損する LATS2 変異体は細胞膜局在せず、v-Src により誘導されるブレブ形成を抑制しなかった。さらに、Merlin-LATS2 複合体形成に抑制性に働く Merlin のリン酸化が v-Src により低下し、その結果亢進した Merlin-LATS2 複合体がブレブ形成を抑制することを見出した。

#### (3) DNA 損傷応答の誘導

v-Src による細胞増殖抑制の原因として、ブレブ形成を伴うアポトーシスの関与を調べたが、アポトーシスの指標である活性型 caspase-3 は検出されなかった。一方、v-Src は染色体架橋形成を伴う DNA 損傷を引き起こし、ATM/ATR 経路を活性化した。よって、v-Src が DNA 損傷を引き起こすことで DNA 損傷応答が惹起され、細胞周期停止や細胞増殖抑制が起こることを示した。

### 《審査の結論》

本研究では、v-Src が LATS2 のキナーゼ活性を抑制して Hippo 経路を不活性化するにも関わらず、同時に惹起される DNA 損傷応答により細胞増殖が抑制されることを明らかにした。さらに、v-Src はがん細胞の転移・浸潤にも関わるブレブ形成を誘導するが、Hippo 経路の抑制の結果過剰発現する LATS2 によりブレブ形成が抑制を受けることを見出した。これらの結果は、Src の活性亢進によるがん化シグナルが、このシグナルに抵抗する細胞応答を惹起することを示している。Src による細胞が

ん化機構の一端を明らかにした本研究結果は、Src 活性の亢進や過剰発現を伴うがんに対する新たな治療法の開発に貢献するものである。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。