

上皮組織における異常細胞の排除機構の遺伝学的解析

掛村文吾

目次

第 1 部.....	3
略語表.....	4
第 1 章 序論	5
第 2 章 方法	7
ショウジョウバエ系統とクローンの誘導	7
MARCM 法	8
遺伝学的スクリーニング	9
免疫組織化学染色.....	9
EdU 染色	10
画像の撮影、取得.....	10
定量.....	10
Depmap データベース解析	11
統計解析	11
第 3 章 結果	12
3-1 遺伝学的スクリーニング	12
3-2 腫瘍における Crk の抑制は細胞死を増加させる	15
3-3 Crk の抑制は Yki/YAP の不活性化を介して腫瘍を抑制する.....	18
3-4 Crk の抑制は F-アクチン集積を阻害することで Yki 活性を低下させる.....	21
3-5 データベースの解析.....	25
第 4 章 考察.....	27

Crk による Hippo 経路制御メカニズム.....	28
腫瘍における Crk の発現誘導メカニズム	28
CRK あるいは CRKL を標的とした創薬.....	28
補遺.....	31
参考文献.....	39
謝辞.....	43

第 1 部

略語表

Bsk: Basket

Diap1: Death-associated inhibitor of apoptosis 1

Expanded: ex

JNK:c-Jun terminal kinase

Scrib: scribble

Yki: Yorkie

第1章 序論

がん治療標的の探索

がんは上皮組織において生じた遺伝子変異などを持つ異常細胞によって引き起こされる。古典的には、外科手術や抗がん剤による化学療法で治療されてきた。抗がん剤はDNA複製などを阻害するため、増殖細胞のみを標的とするが、少なからず副作用を引き起こすことが重篤な問題となっている[1]。そこで、がんの生存、増殖に寄与する分子を標的として阻害することで、がんを特異的に排除するアプローチである分子標的療法が考案された[2]。例えば、HER2やEGFRなどのがんでの高発現や活性化がみられる分子に対する抗体による阻害がそれに該当する[3]。そのような標的分子の探索の目的で、*in vitro* 系での薬剤スクリーニング、遺伝子編集によるスクリーニング系は確立されているものの[4], [5]、*in vivo* モデルでのそのような標的の探索は技術的に困難である。さらに、がん細胞におけるドライバー遺伝子変異によって活性化される細胞内シグナルや分子が異なるため[6]、ドライバー遺伝子変異に対応した最適な標的分子の探索は必須な課題である。

がんにおける YES-associated protein 1(YAP)

YAP (YES-associated protein 1)は転写共役因子であり、YAPの発現上昇、活性化は様々な種類のがんで観察される[7]、YAPおよびその上流因子はがんに対する治療標的としてみなされている[8]–[10]。ショウジョウバエには、YAPホモログであるYorkie (Yki)が存在し、その制御経路であるHippo経路も高度に保存されている[11]。YAPを標的とした創薬が試みられており、例えば、YAPとTEADとの相互作用を阻害するverteporfinやIAG933がある[12]。ただ、このような分子はYAP非依存的に細胞毒性を発揮することが報告されている[13], [14]。そのうえ、YAPはがん細胞においてTEAD以外にも、変異型p53や β -cateninと相互作用することで、特定の標的遺伝子の転写を誘導し増殖や細胞死耐性を獲得することが報告されている[15], [16]。そのため、YAPの活性化自体を阻害する標的が代替的なアプローチの一つであると考えられる。

がんにおける CRK ファミリータンパク

ヒトCRK (CT10 regulatory kinase) および CRKL (CRK-like)はSH2, SH3ドメインから構成されるアダプタータンパク質であり、細胞移動、接着、増殖に関わることが知られている[17], [18]。これらのタンパクの発現は様々ながん細胞で上昇することが見出されており[19], [20]、MAPK経路などを介して増殖に寄与することが示唆されている。CRK, CRKLは治療の標的の一つとして期待されているが[19]、ヒトにおける冗長性が機能解析の妨げとなっている。ショウジョウバエにおいては、CRKおよびCRKLのホモログは一つ存在する[21]。そこで、ショウジョウバエ腫瘍モデルを用いて、CRKファミリー

タンパク質の機能を解析することでヒトのがんにおける機能の解明に寄与すると考えられた。

ショウジョウバエモデルの利点

ショウジョウバエモデルは *in vivo* での腫瘍の解析を行う優れた系の一つである[22]。ショウジョウバエのゲノムは高度に保存されており、がんを始めとするヒト疾患に関連する遺伝子解析に貢献してきた[23]–[25]。加えて、優れた遺伝学的操作技術によって細胞レベルでの編集、および、MARCM 法によるクローン誘導が可能である[26]。ショウジョウバエ上皮組織において Ras を活性化させ、細胞極性遺伝子 *scribble(scrib)*, *discs large 1 (dlg)* に変異を持つ細胞は悪性腫瘍を形成する[27], [28]。この腫瘍は浸潤、転移、といったヒトのがんと類似した挙動をしめす[25], [27], [29]。さらに、JAK/STAT、Yki/YAP、JNK シグナルなどががんにおいて増殖に寄与することが知られているシグナル経路依存的に増殖、悪性化することが分かっている[29]–[32]。そのため、この腫瘍モデルを用いた遺伝学的スクリーニングによって、がん細胞の選択的排除を可能とする標的分子の同定に寄与できると考えられた。

本研究の目的

本研究では、ショウジョウバエモデルの持つ利点を活かし、腫瘍モデルを用いてがん細胞の排除を可能にする標的を探索した。Ras^{V12}/*scrib*^{-/-}腫瘍内に RNAi を誘導し、腫瘍を抑制する系統を探索した。その結果、ショウジョウバエにおけるヒト CRK、CRKL ホモログである Crk を同定した。Crk のノックダウンは正常細胞には影響を与えないものの、腫瘍において細胞死を増加させ、腫瘍を抑制した。メカニズムを解析したところ、腫瘍においては F-actin の集積を抑制し、Yki/YAP 活性を低下させることを見出した。さらに、ヒトがん細胞データベース解析によって、Yki/YAP が高発現するがんは CRK あるいは CRKL の発現阻害によるがん抑制に対する感受性が高いことを見出した。これらの結果は、正常細胞に影響を与えずに YAP 依存的な腫瘍の選択的な排除を可能にする新たな治療標的を提唱するものである。

第2章 方法

ショウジョウバエ系統とクローンの誘導

ショウジョウバエ系統は標準的なコーンミール、乾燥酵母を含む餌を入れたプラスチックバイアル中 25 度で維持した。20~30 匹のバージン雌を約 10 匹の雄と交配させた。その後、新しいバイアルに移し、産卵は 8~12 時間行われた。X 染色体に、トランスジーンが乗っている場合を除いて、雄、雌どちらも解析に使用した。

モザイククローンを誘導する系統：

w; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / CyO; FRT82B, tub-Gal80, / TM6B, Tb (82B MARCM tester)

w; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / CyO; diap1-lacZ, FRT82B, tub-Gal80, / TM6B, Tb (diap1-lacZ 82B MARCM tester)

UAS-Bsk^{DN}; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / CyO; diap1-lacZ, FRT82B, tub-Gal80, / TM6B, Tb (Bsk^{DN} 82B MARCM tester)

UAS-p35; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / CyO; diap1-lacZ, FRT82B, tub-Gal80, / TM6B, Tb (p35 82B MARCM tester)

eyFLP, UAS-Dcr2; Act>y+>Gal4, UAS-mCherry; FRT82B, tub-Gal80 / T(2:3)SM5-TM6 (82B MARCM mCherry tester)

tub-Gal80, FRT19A; UAS-Ras^{V12}, UAS-Eiger; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP (Ras^{V12}/Egr 19 A MARCM tester)

tub-Gal80, FRT19A; UAS-Yki^{CA}; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP (Yki^{CA} 19 A MARCM tester)

tub-Gal80, FRT19A; UAS-lexA-RNAi; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP (lexA-RNAi 19 A MARCM tester) tub-Gal80, FRT19A; UAS-Crk-RNAi; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP (Crk-RNAi 19 A MARCM tester)

その他の系統: *UAS-Ras^{V12}* (Igaki, Pagliarini and Xu, 2006), *scrib^l* (a gift from David Bilder), *dlg^{m52}* (a gift from Scott Goode), *UAS-Bsk^{DN}* (Adachi-Yamada et al., 1999), *UAS-Yki^{CA}* (BDSC #28836), *UAS-Yki^{CA}* (BDSC #28818), *UAS-p35* (a gift from Marcos González-Gaitán), *UAS-Eiger* (Enomoto et al., 2015), *UAS-Crk-RNAi* (BDSC #55277), *UAS-lexA-RNAi* (BDSC #67947), *UAS-yki-RNAi* (NIG #4005R-2), *mNG::3XFLAG::Crk* (BDSC #83700), *diap1-lacZ/Diap1^{j5C8}* (BDSC #12093), *eyFLP, UAS-Dcr2* (BDSC #58757), *ex697 (ex-lacZ)* (BDSC #44248), *UAS-lacZ* (BDSC #8529), *UAS-Crk* (BDSC #83704).

使用したショウジョウバエの遺伝型は補遺表 1 に示した。

MARCM 法

MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) 法は、任意の遺伝子変異をホモ接合にもつ体細胞クローンを誘導し、さらにそのクローン内での任意の遺伝子の強制発現・ノックダウンを可能にする手法である[33]。Gal4/UAS システムは、酵母由来の転写因子 Gal4 および Gal4 結合配列である UAS (Upstream Activation Sequence)をもちいたバイナリ発現誘導法であり、組織特異的に任意の遺伝子誘導を行うための遺伝学的手法である。Gal4 のリプレッサーである Gal80 を全身で発現させる Tub-Gal80 組み換え遺伝子と任意の突然変異体のトランスヘテロ接合を作成する。このとき、Tub-Gal80 および突然変異体を有する染色体の動原体近位に FRT を導入する。さらに、複眼前駆組織特異的エンハンサー制御下において FLP を発現する eyFLP 組み換え遺伝子を同時に持つと、G2 期において複眼特異的に FRT 配列間で染色体組換えが誘導される。これにより、突然変異体をホモ接合にもつ娘細胞と TubGal80 をホモ接合に持つ娘細胞のペアが生じる。このとき、FLP 依存的に Gal4 を発現する Act5C>y+>Gal4 組み換え遺伝子を同時に持たせておくことで、Tub-Gal80 を持たない突然変異体ホモ接合細胞のみ UAS 依存的な遺伝子誘導、およびクローンの標識が可能となる (図 1)。

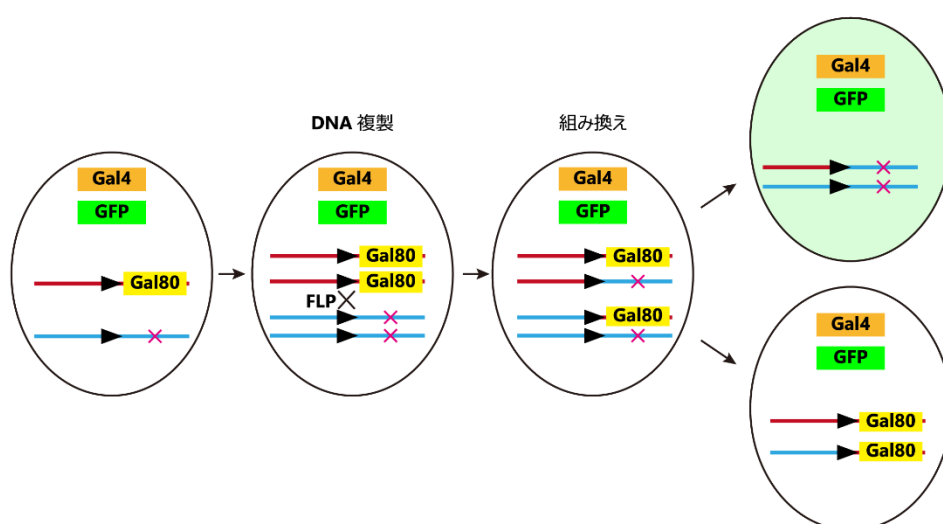


図 1: MARCM 法によるクローン誘導

複眼原基特異的なプロモーターである *eyeless* を用いて、Flippase (FLP) を発現させ、Flippase recognition target (FRT) の間で組み換えを起こす。Gal80 を持たない遺伝子変異をホモ接合に持つ細胞では Gal4/UAS

システムにより GFP の発現が誘導される。一方、Gal80 を持つ細胞では Gal4/UAS システムが阻害され、GFP は発現しない。その結果、遺伝子変異をホモ接合荷物細胞集団がモザイク状に誘導される。

遺伝学的スクリーニング

ショウジョウバエ 4 番染色体に位置する遺伝子（タンパク質をコードするとされる 79 遺伝子[34]）の内、57 遺伝子に対する RNAi システムを用いて腫瘍を抑制する系統（サプレッサー系統）を探索した（補遺表 2）。10 匹前後のバージン雌を、5～10 匹の雄と交配させ、産卵させた後、7 日後にバイアル越しにショウジョウバエ幼虫の頭部に誘導された実体顕微鏡下で観察し、GFP の腫瘍サイズを指標としてサプレッサー系統を単離した。

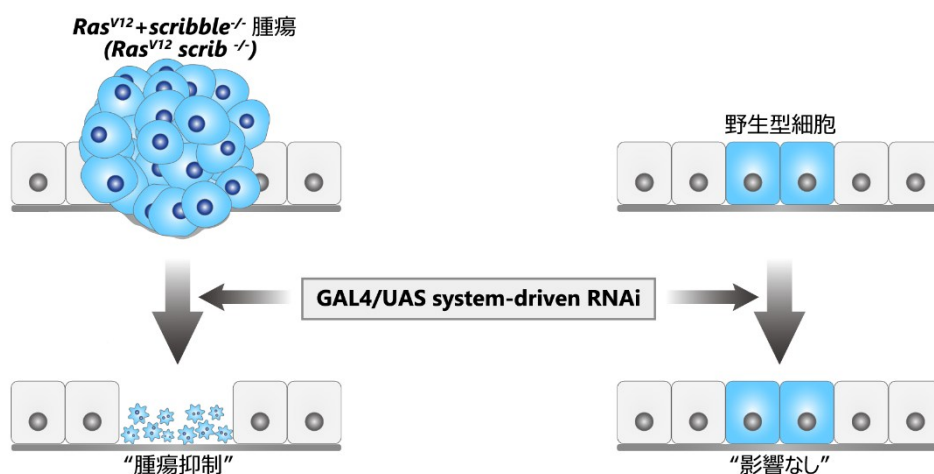


図 2: 遺伝学的スクリーニング

MARCM 法によって、Ras を活性化させ *scribble* 遺伝子に変異を持つ腫瘍 (*Ras^{V12}/scrib^{-/-}* 腫瘍) を 3 齢幼虫の複眼原基に誘導した。RNAi を腫瘍に誘導し、腫瘍が抑制される系統を単離した。そして、正常細胞に誘導した際に影響を与えない系統を単離した。

免疫組織化学染色

3 齢幼虫を Phosphate-buffered saline (PBS) 中で解剖し、4% Paraformaldehyde (PFA) 中で固定した。固定後、PBT(PBS + 0.1% TritonX100)で 20 分間×3 回洗浄し、PBTn (PBT+5%Donkey Serum)で 30 分ブロッキングを行い、一次抗体を 4 度で一晩反応させた。一次抗体反応後は、PBT で 30 分間×3 回洗浄した後に PBTn でブロッキングし、二次抗体を 2 時間室温で反応させた。その後、PBT で 30 分間×3 回洗浄した。

一次抗体：chicken anti- β -galactosidase (Abcam, # ab9361, 1:1000), rabbit anti-cleaved Drosophila Dcp1 (Asp216) (Cell Signaling Technology, # 9578, 1:100), mouse anti-Mmp1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, # 3B8, # 3A6 and # 5H7, 1:1:1 で混合), 1:100), rabbit Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (Cell Signaling Technology, #9255, 1:200), mouse anti-GFP (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES, # D153-A48, 1:200), Alexa Fluor™ 546 Phalloidin (Invitrogen, # A22283, 1:200).

二次抗体: Goat anti-Chicken IgY (H + L) Secondary Antibody Antibody, Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific, # A-21437, 1:250), Goat anti-Rabbit IgG (H + L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, # A-11035, 1:250), Goat anti-Mouse IgG (H + L) Highly Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, # A-11030, 1:250).

EdU 染色

5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)取り込み量の測定による細胞増殖評価には Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific, #C10640)を用いた。3 齢幼虫複眼原基を Fetal Bovine Serum (FBS)を含むシュナイダー培地内 (FBS: 5%)で解剖し 100 μ M EdU に 120 min 取り込ませた。その後 4% PFA 中で固定し、PBT で 20 分間×3 回洗浄した。アジド化蛍光色素と触媒として銅を含む EdU reaction cocktail 中で 120 分間反応させた。反応後、20 分間×3 回洗浄した。

画像の撮影、取得

各画像は ZEN Blue (Carl Zeiss)によって制御した共焦点顕微鏡 ZEISS LSM 880 (Carl Zeiss あるいは Leica Application Suite X version 3.5.5.19976 (Leica Microsystems)で制御した共焦点顕微鏡 TCS SP8 on DMI8 inverted microscope (Leica Microsystems)によって撮影された。

定量

対応する抗体と DAPI で染色した複眼原基、あるいは、翅原基の X.Y.共焦点画像を取得し、FIJI ImageJ-win64 (ver. 1.54 f)を用いて定量した。目的のシグナルによって定量方法に対応させた。

GFP 陽性細胞中の cDCP1 陽性細胞の定量 :

GFP 陽性細胞内の cDCP1 陽性細胞数を Find Maxima 及び、ROI manager を用いて数え、GFP 陽性細胞クローンの面積 (Set Measurements において Area にチェック)を測定し、単位面積あたりの cDCP1 陽性細胞数を算出した。

Phalloidin, pJNK, ex-lacZ, diap1-lacZ, EdU, Mmp1 シグナルの定量 :

GFP 陽性細胞中の各シグナルの平均グレー値を測定した(“Signal intensity (GFP+)”) (Set Measurements において Mean gray value にチェック)。そして、GFP 陰性領域の平均グレー値を測定した (“Signal intensity (GFP-)”)。“Signal intensity (GFP+)”を “Signal intensity (GFP-)”で割ることによって相対的なシグナル比を算出した。

Depmap データベース解析

データは Cancer Dependency Map project (DepMap portal: <https://depmap.org/portal>). からダウンロードして得た。線形回帰解析は DepMap Data Explorer (<https://depmap.org/portal/interactive/>)上で行われた。YAP と共依存する遺伝子群のリストは下記のページから得た(補遺表 3)。Top 100 co-dependent genes with YAP were downloaded from YAP overview page (<https://depmap.org/portal/gene/YAP1?tab=overview>). Pearson correlation score は co-dependency score として表記されている。

統計解析

2 群間比較には Wilcoxon rank sum test を用いた。グラフ中のプロットは生データをプロットしたものである。サンプルサイズの決定は行っていない。すべての解析は RStudio (Ver. 1.0.153)上で R (ver. 3.4.1)を用いて行われた。統計的有意差は以下のように示した。 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$, n.s. (有意差無し): $p > 0.05$.

第3章 結果

3-1 遺伝学的スクリーニング

ショウジョウバエ悪性腫瘍モデルを用いて、RNAi スクリーニングを行った。Flippase(FLP)と FLP recognition target (FRT)による組み換え法[26], [35]を用いて、GFP で標識した Ras^{V12}/*scrib*^{-/-}腫瘍をショウジョウバエ幼虫の複眼原基に誘導し、それらの腫瘍に、これまでスクリーニングされていなかった4番染色体上の遺伝子、57遺伝子のRNAiを誘導した(補遺表1)。そして、腫瘍を抑制する系統を単離し、正常細胞には影響を与えない系統を探索した。その結果、腫瘍を特異的に抑制し、正常細胞には影響を与えない系統として *Crk* を同定した(図3A-D, 図3Eで定量)。ショウジョウバエ *Crk* はヒトにおける CT10 regulatory kinase (CRK) および CRK-Like (CRKL)のホモログである。ショウジョウバエにおける *Crk* はアクチン骨格系を制御することが報告されている[36]。

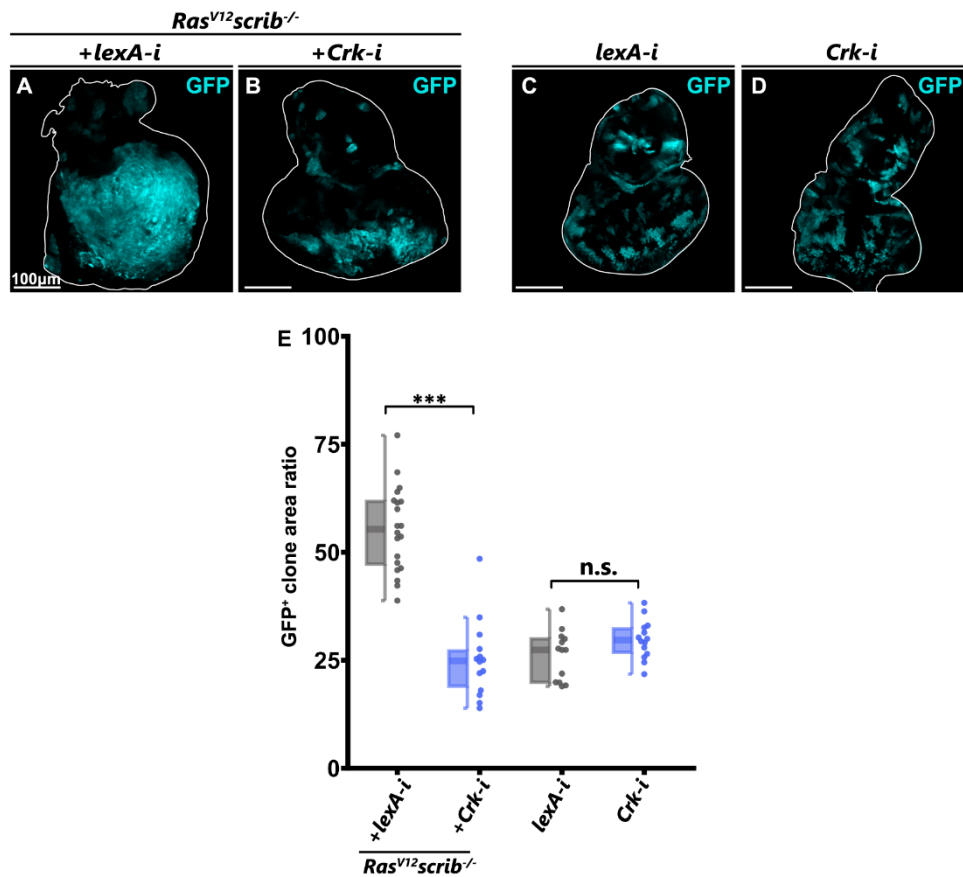


図 3: *Crk* のノックダウンは腫瘍を特異的に抑制する

(A-D) MARCM 法を用いて、*Ras^{V12}+ scrib^{-/-}+ lexA-i* (A)、*Ras^{V12}+ scrib^{-/-}+ Crk-i* (B)、*lexA-i* (C) 及び *Crk-i* (D) クローンを誘導した複眼原基。Scale bars, 100μm.

(E) 上皮組織に占める GFP 陽性クローンの割合を *Ras^{V12}+ scrib^{-/-}+ lexA-i* (n=20)、*Ras^{V12}+ scrib^{-/-}+ Crk-i* (n=14)、*lexA-i* (n=13) 及び *Crk-i* (n=14) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

*** $p < 0.001$; n.s. (有意差無し) $p > 0.05$

また、上記に加えて、 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍と同様に腫瘍モデルとして用いられている $Ras^{V12}/dlg^{-/-}$ 腫瘍[27], [28]も *Crk* のノックダウンによって有意に抑制されることを確認した (図 4A, B, 4C で定量)。さらに、*Crk* の発現量を評価したところ $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍において *Crk* の発現が正常細胞に比べて上昇していることを確認した (図 5A, B)。これらの結果は、 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍は腫瘍の選択的な排除を可能にする標的である *Crk* の発現を上昇させ、*Crk* 依存的に過剰増殖することを示唆している。

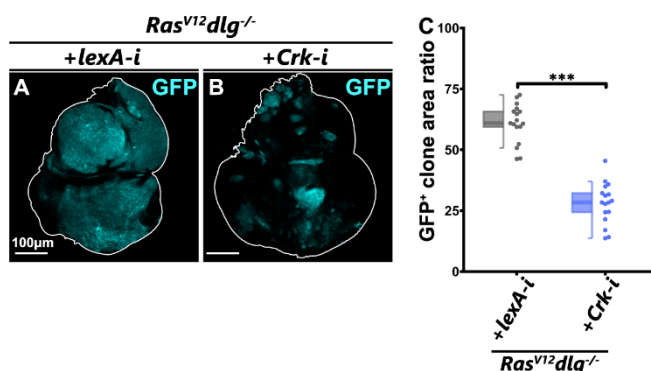


図 4: *Crk* のノックダウンは $Ras^{V12}/dlg^{-/-}$ を腫瘍抑制する

(A, B) MARCM 法を用いて、 $Ras^{V12}/dlg^{-/-} + lexA-i$ (A), $Ras^{V12}/dlg^{-/-} + Crk-i$ (B) クローンを誘導した複眼原基。Scale bars, 100 μm .

(C) 上皮組織に占める GFP 陽性クローンの割合を $Ras^{V12}/dlg^{-/-} + lexA-i$ (n=17), $Ras^{V12}/dlg^{-/-} + Crk-i$ (n=17) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

***p < 0.001

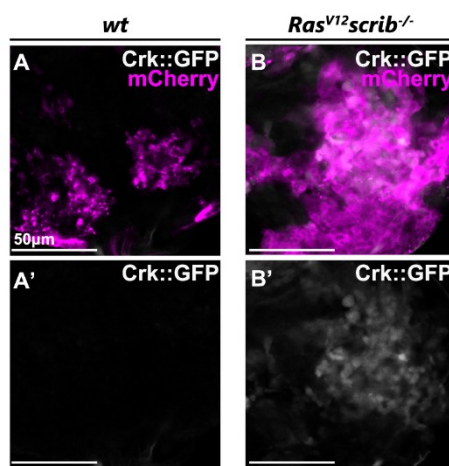


図 5: $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍において *Crk* の発現が上昇する

(A, B) MARCM 法を用いて、wt (A), $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ (B) クローンを誘導し、抗 GFP 抗体で染色した *Crk::GFP* をヘテロ接合に持つ上皮組織。Scale bars, 50 μm .

3-2 腫瘍における Crk の抑制は細胞死を増加させる

次に、Crk の抑制がどのようなメカニズムで腫瘍を抑制するのか、そのメカニズムの解析を行った。Ras^{V12}/scrib^{-/-}腫瘍は、腫瘍における細胞死が増加した場合、排除されることが報告されている[37]。そこで、細胞死に着目し、活性化型カスパーゼ抗体である cDCP1 抗体を用いて細胞死を検出したところ、Crk の抑制は、Ras^{V12}/scrib^{-/-}腫瘍における細胞死を増加させることを見出した (図 6A,B, 図 6E で定量)。重要なことに、正常細胞において Crk をノックダウンしても、正常細胞では細胞死は増加しなかった (図 6C,D, 図 6E で定量)。また、Crk の抑制による腫瘍の抑制は、カスパーゼ阻害因子である p35 を発現させることで部分的にキャンセルされた (図 6F,G, 図 6H で定量)。

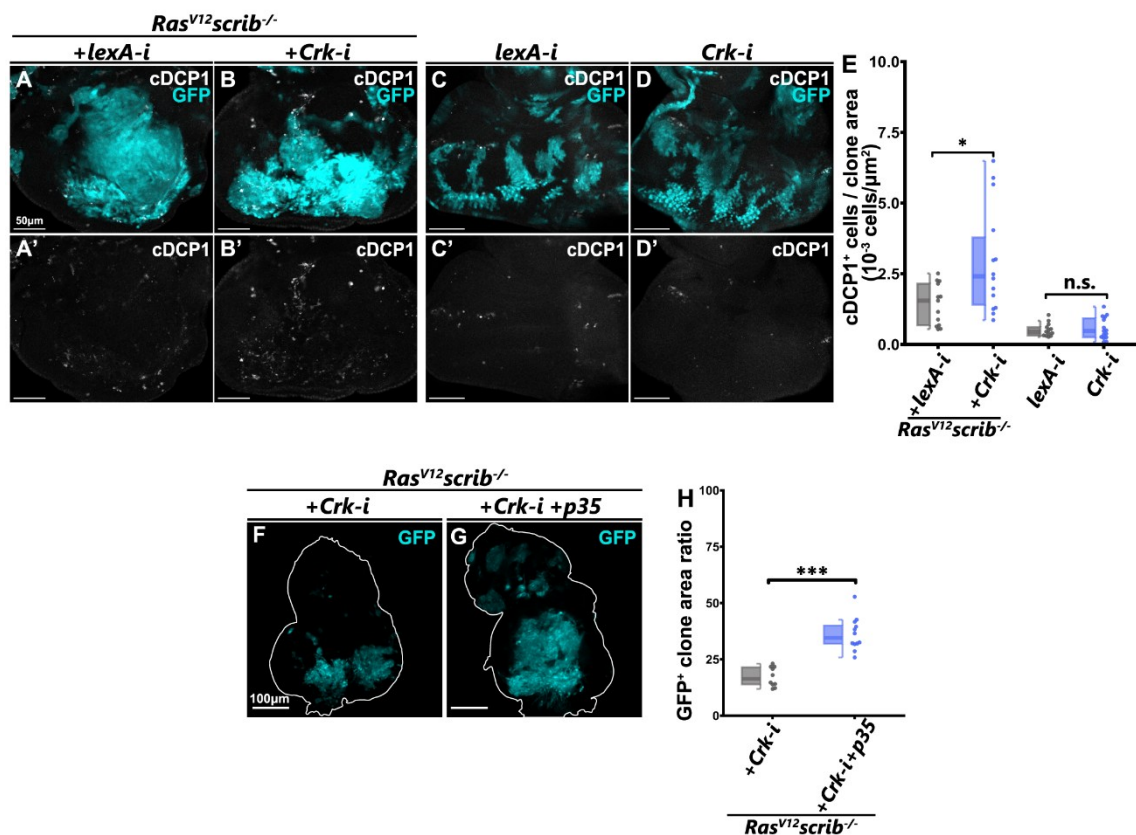


図 6: Crk の抑制による腫瘍の排除は細胞死を介している

(A-D) MARCM 法を用いて、Ras^{V12}+ scrib^{-/-}+ lexA-i (A), Ras^{V12}+ scrib^{-/-}+ Crk-i (B), lexA-i (C)および Crk-i (D) クロームを誘導し、抗 c-DCP1 抗体で免疫染色した複眼原基。Scale bars, 50μm.

(E) GFP 陽性クローン面積あたりの c-DCP1 陽性細胞数を Ras^{V12}+ scrib^{-/-}+ lexA-i (n=13), Ras^{V12}+ scrib^{-/-}+ Crk-i (n=14), lexA-i (n=13), Crk-i (n=15)について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。

Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

***p < 0.001

次に、細胞死の増加メカニズムを検証した。JNK シグナルは細胞内のコンテキストに応じて、細胞増殖、および、細胞死を誘導しうるシグナルであり、 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍においては JNK シグナルが活性化することが報告されている[38]。そのため、JNK シグナルがこの排除に関与する可能性を考えた。Crk を抑制した際に、ショウジョウバエ JNK である Basket (Bsk) のドミナントネガティブ変異体(BskDN)を発現させると、細胞死の増加が抑制された (図 7A, B, 図 7C で定量)。

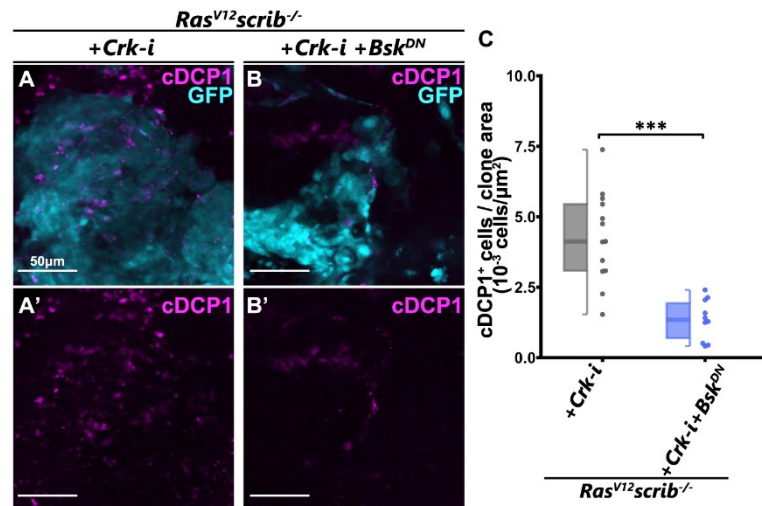


図 7: Crk の抑制による細胞死は JNK 依存的に誘導される

(A, B) MARCM 法を用いて、 $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (A), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i + Bsk^{DN}$ (B) クローンを誘導し、抗 c-DCP1 抗体で免疫染色した複眼原基。Scale bars, 50 μm.

(C) 上皮組織に占める GFP 陽性クローンの割合を $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (n=13), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i + Bsk^{DN}$ (n=10) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

***p < 0.001; Wilcoxon rank sum test.

また、この時、*Crk* のノックダウンは、*Ras^{V12}/scrib^{-/-}*腫瘍における JNK シグナルの活性化に影響しないことを、JNK シグナルの標的分子である Matrix metalloproteinase 1 の抗体染色によって確認した (図 8A, B, 図 8C で定量)。また、リン酸化 JNK 抗体で評価した場合も、同様の結果が得られた (図 8D, E, 図 8F で定量)。これらの結果から、*Crk* は JNK シグナルの下流において、あるいは JNK とは独立して機能すること、そして、*Crk* の抑制は JNK シグナルを介した細胞死誘導を引き起こすことが示唆された。

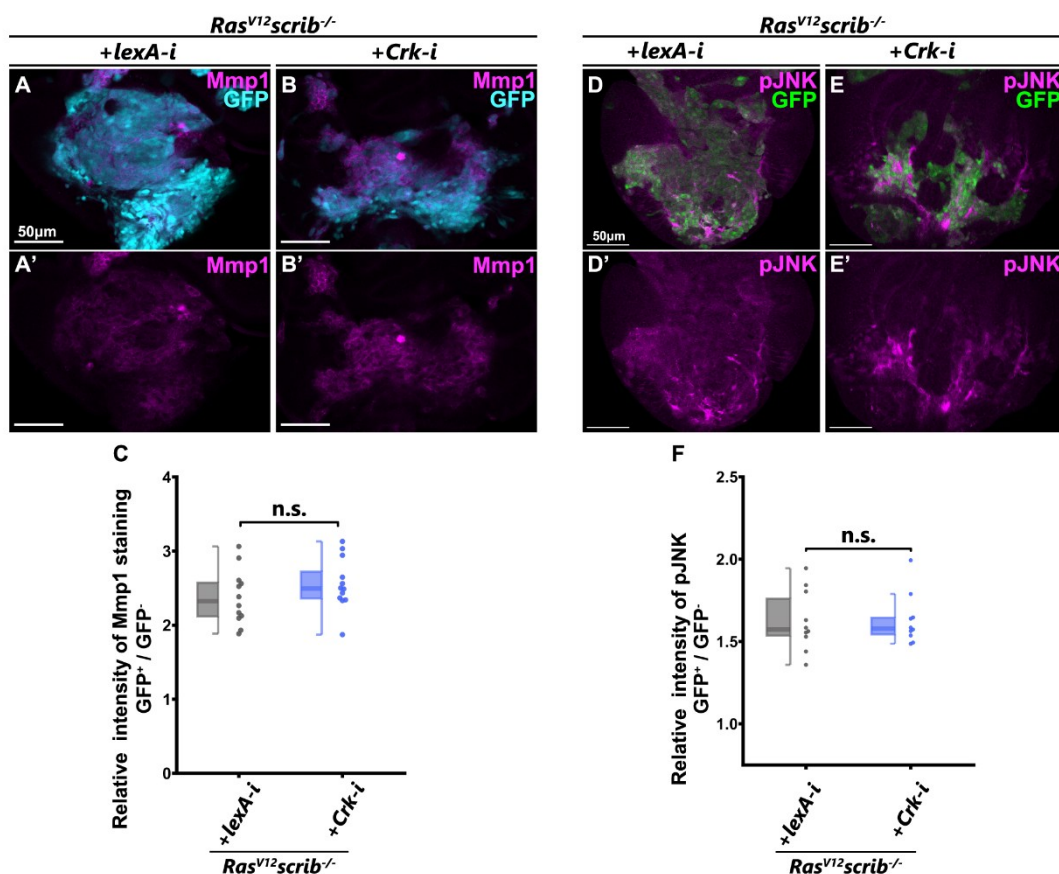


図 8: *Crk* の抑制は腫瘍における JNK の活性に影響しない

(A, B) MARCM 法を用いて、*Ras^{V12}+scrib^{-/-}+lexA-i* (A), *Ras^{V12}+scrib^{-/-}+Crk-i* (B) クローンを誘導し、抗 Mmp1 抗体で免疫染色した複眼原基。Scale bars, 50 μ m.

(C) Mmp1 シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を *Ras^{V12}+scrib^{-/-}+lexA-i* (n=12), *Ras^{V12}+scrib^{-/-}+Crk-i* (n=12) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

n.s. (有意差無し) $p>0.05$

(D, E) MARCM 法を用いて、*Ras^{V12}+scrib^{-/-}+lexA-i* (A), *Ras^{V12}+scrib^{-/-}+Crk-i* (B) クローンを誘導し、抗 pJNK 抗体で免疫染色した複眼原基。Scale bars, 50 μ m.

(F) pJNK シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + lexA-i$ (n=10), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (n=10)について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

n.s. (有意差無し) $p > 0.05$

3-3 Crk の抑制は Yki/YAP の不活性化を介して腫瘍を抑制する

Crk の抑制によって細胞死が増加するメカニズムとして腫瘍の生存、増殖に必要な因子の活性が抑制される可能性を考えた。そのような因子の候補の一つとして、Hippo シグナル経路下流の転写共役因子であるショウジョウバエ YAP ホモログである Yki が考えられた。Yki は $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍の増殖に寄与することが示されている[28], [30], [31]。そこで、Yki の転写標的である *diap1-lacZ* [39]を用いて、Crk の抑制が腫瘍における Yki 活性に影響を与えるかを評価した。その結果、Crk のノックダウンは、 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍における *diap1-lacZ* シグナルを低下させた (図 9A, B, 図 9E で定量)。一方で、正常細胞における *diap1-lacZ* シグナルには影響を与えなかった (図 9A-D, 図 9E で定量)。また、*diap1* と異なる Yki の転写標的である *expanded (ex)-lacZ*[40]を用いた場合も同様に、Crk をノックダウンすることによって、 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍内の *ex-lacZ*シグナルは有意に低下した (図 10A, B, 図 10C で定量)。また、腫瘍の増殖も抑制されることを確認した (図 11A, B, 図 11C で定量)。さらに、 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍において、*yki* をノックダウンすることにより有意に細胞死が増加することも確認された (図 11F, G, 図 11H で定量)。これらの結果から、Crk のノックダウンは $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍における Yki の活性化を特異的に抑制し、JNK シグナル依存的な細胞死誘導を介して腫瘍を抑制することが示唆された。

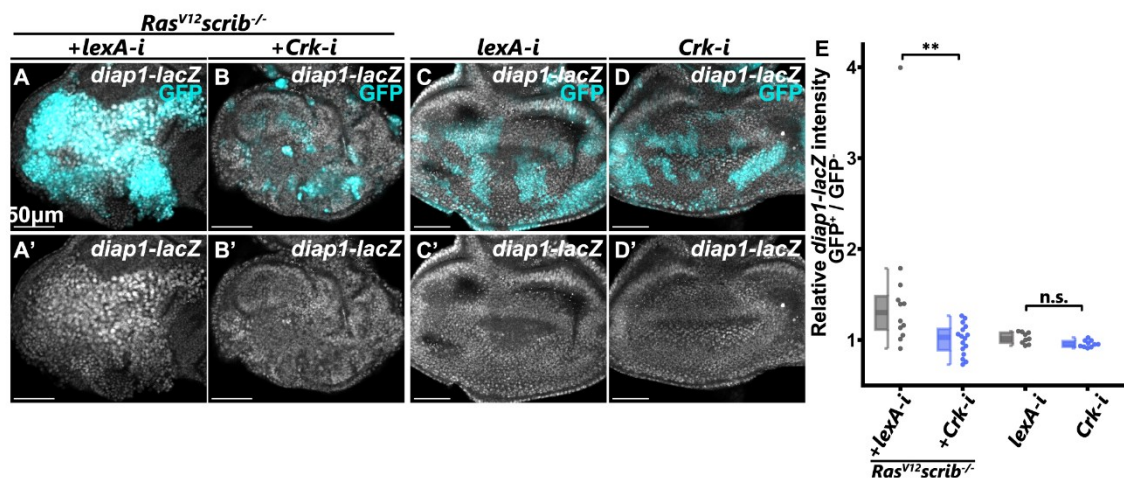


図 9: Crk の抑制は腫瘍における Yki/YAP 活性を低下させる

(A-D) MARCM 法を用いて、 $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + lexA-i$ (A), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (B), $lexA-i$ (C), $Crk-i$ (D) クローンを誘導し、抗 β -galactosidase 抗体で免疫染色した、*diap1-lacZ* をヘテロ接合に持つ複眼原基。Scale bars, 50 μ m. (E) *diap1-lacZ* シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + lexA-i$ (n=12) $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (n=16), $lexA-i$ (n=9) および $Crk-i$ (n=10) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

**p < 0.01; n.s. (not significant) p > 0.05

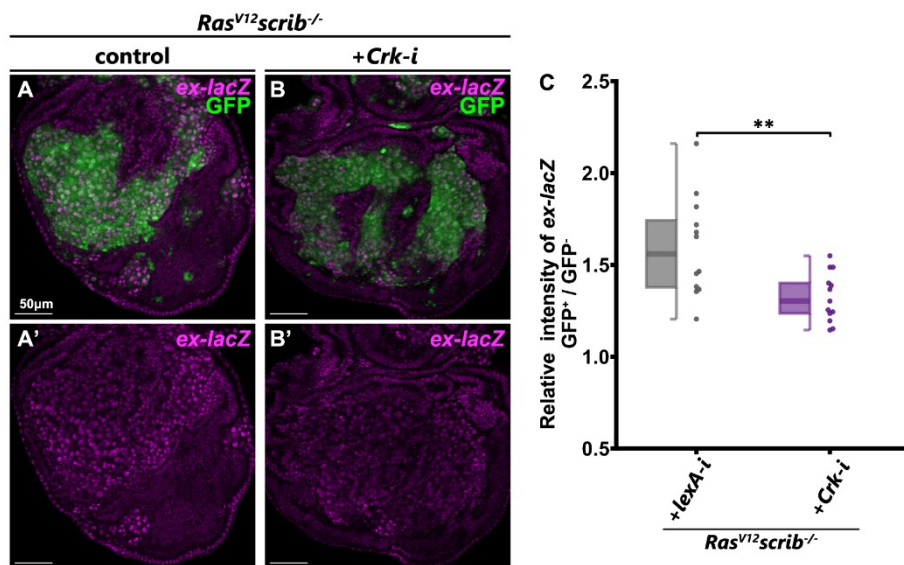


図 10: Crk の抑制は腫瘍における Yki/YAP 活性を低下させる

(A, B) MARCM 法を用いて、 $Ras^{V12} + scrib^{-/-}$ (A), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (B) クローンを誘導し、抗 β -galactosidase 抗体で免疫染色した、*ex-lacZ* をヘテロ接合に持つ複眼原基。Scale bars, 50 μ m.

(C) *ex-lacZ* シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を $Ras^{V12} + scrib^{-/-}$ (n= 12) $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (n= 13) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

**p < 0.01; Wilcoxon rank sum test.

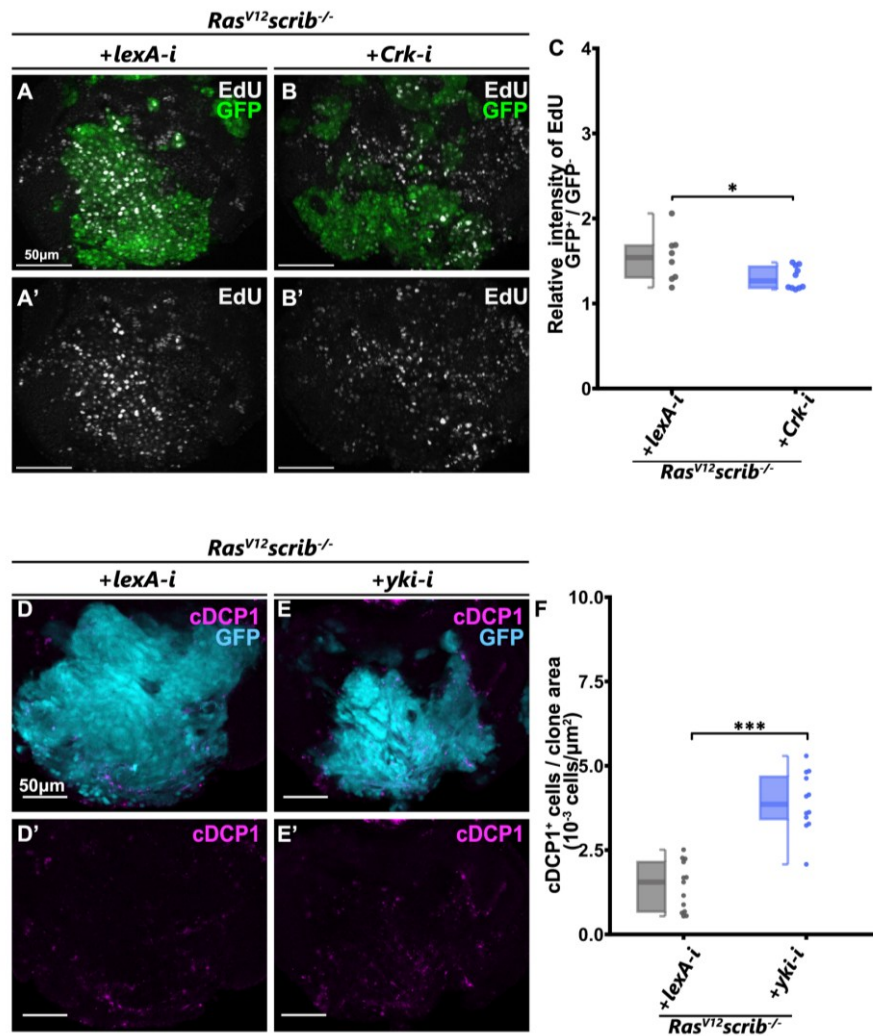


図 11: Crk の抑制は腫瘍の増殖を抑制する

(A, B) MARCM 法を用いて、 $Ras^{V12} + scrib^{-/-}$ (A), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (B) クローンを誘導し、EdU 染色した複眼原基。Scale bars, 50μm.

(C) EdU シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + lexA-i$ (n=8), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i$ (n=10) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

*p < 0.05; Wilcoxon rank sum test.

(D, E) MARCM 法を用いて、 $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + lexA-i$ (D), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + yki-i$ (E) クローンを誘導し、抗 c-DCP1 抗体で免疫染色した複眼原基。Scale bars, 50μm.

(F) GFP 陽性クローン面積あたりの c-DCP1 陽性細胞数を $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + lexA-i$ (n=13), $Ras^{V12} + scrib^{-/-} + yki-i$ (n=12) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

3-4 Crk の抑制は F-アクチン集積を阻害することで Yki 活性を低下させる

次に、Crk の抑制が腫瘍における Yki の活性を低下させるメカニズムを調べた。これまでに、Crk は正常な発生においてアクチン動態を制御することが報告されている[21]。加えて、F-アクチンの集積は、Hippo シグナルの不活性化を介して Yki を活性化することが報告されており、例えば、Ras の活性化と JNK の活性化の協調は F-アクチン集積による Warts (Wts) の抑制を介して、Yki 活性化を誘導することが報告されている[41]。これらの先行研究を基に Crk の抑制が腫瘍における F-アクチン集積に影響するかを調べたところ、Crk の抑制は Ras^{V12}/*scrib*^{-/-}腫瘍における F-アクチン集積を抑制した(図 12A, B, 図 12C で定量)。また、Ras と Egr の強制発現による JNK の活性化は協調して腫瘍を形成することが報告されているが[41]、Ras^{V12}/Egr 腫瘍における F-アクチン集積も抑制された(図 12D, E, 図 12F で定量)。

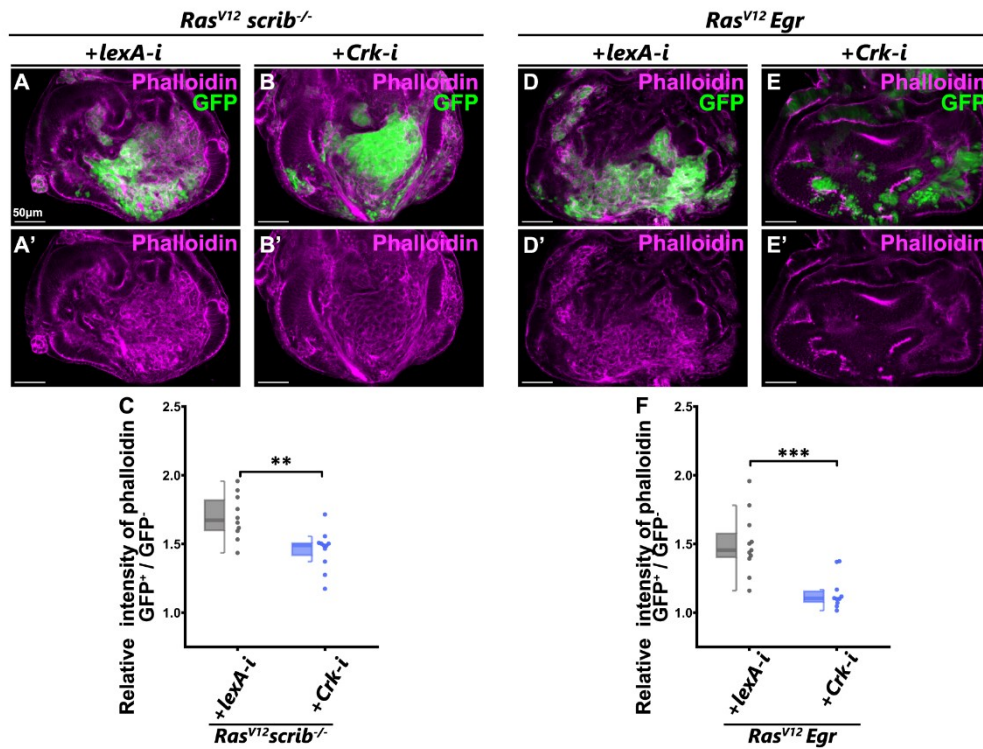


図 12: Crk の抑制は腫瘍における F-アクチンの集積を破壊させる

(A, B) MARCM 法を用いて、*Ras^{V12} + scrib^{-/-}* (A), *Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i* (B) クローンを誘導し、Phalloidin 染色した複眼原基。Scale bars, 50 μ m.

(C) Phalloidin シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を *Ras^{V12} + scrib^{-/-} + lexA-i* ($n=10$), *Ras^{V12} + scrib^{-/-} + Crk-i* ($n=11$) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

** $p < 0.01$; Wilcoxon rank sum test.

(D, E) MARCM 法を用いて、*Ras^{V12} + Egr + lexA-i* (D), *Ras^{V12} + Egr + Crk-i* (E) クローンを誘導し、Phalloidin 染色した複眼原基。Scale bars, 50 μ m.

(F) Phalloidin シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を *Ras^{V12} + Egr + lexA-i* ($n=11$), *Ras^{V12} + Egr + Crk-i* ($n=10$) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

*** $p < 0.001$; Wilcoxon rank sum test.

上記の結果と一貫して、*Crk* のノックダウンは、 Ras^{V12}/Egr 腫瘍の過剰増殖を抑制した (図 13A, B, 図 13G で定量)。また、*Crk* の抑制は *Yki* 恒常活性化変異体 Yki^{S168A} [42], [43] の発現により誘導した *Yki* 活性化腫瘍の腫瘍形成、および、F-アクチン集積には影響しなかった (図 13C, D, 図 13G で定量; 図 14A, B, 図 14C で定量)。この結果は、*Crk* が *Yki* の上流において作用するという仮説に一致している。また、*Ras* 活性化腫瘍の場合も同様に、腫瘍形成、および、F-アクチン集積には影響しなかった (図 13E, F, 図 13G で定量; 図 14D, E, 図 14 F で定量)。これらの結果から、*Crk* の抑制は腫瘍において *Ras* と *JNK* の協調による F-アクチンの集積を低下させることで *Yki* の活性化を阻害し、腫瘍における *JNK* 依存的な細胞死を増加させることで腫瘍を排除することが示唆された。

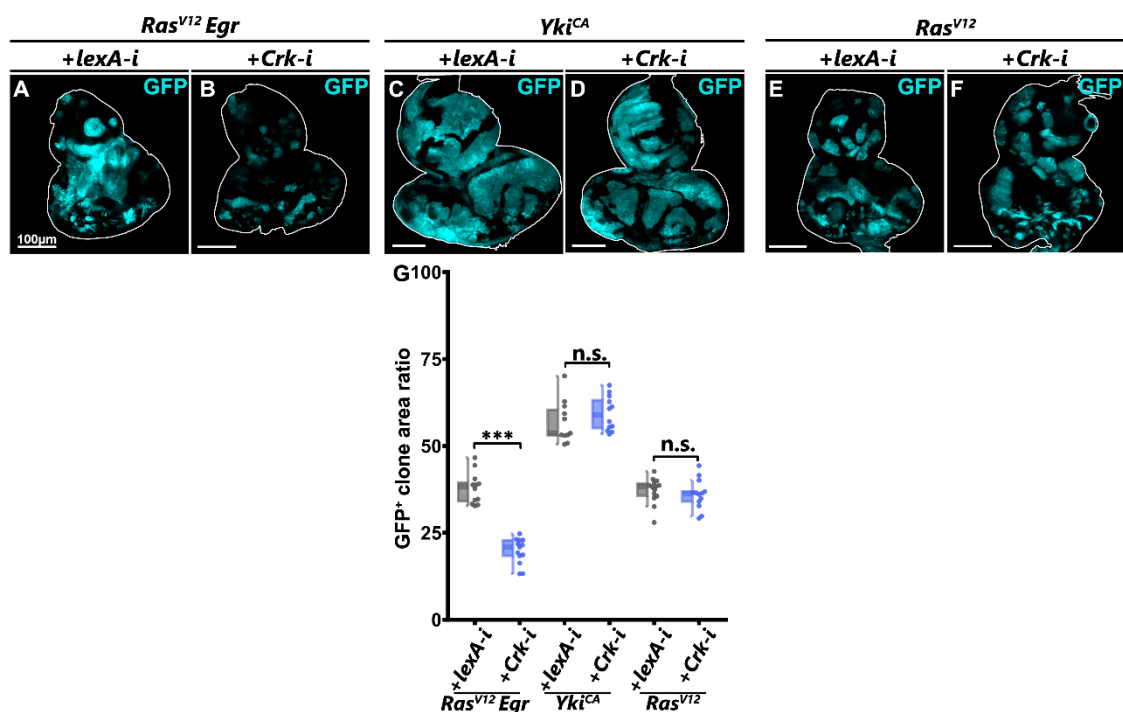


図 13: *Crk* の抑制は *Yki* 活性化、*Ras* 活性化腫瘍には影響しない

(A-F) MARCM 法を用いて、 $Ras^{V12} + Egr + lexA-i$ (A), $Ras^{V12} + Egr + Crk-i$ (B), $Yki^{CA} + lexA-i$ (C), $Yki^{CA} + Crk-i$ (D), $Ras^{V12} + lexA-i$ (E), $Ras^{V12} + Crk-i$ (F) クローンを誘導した複眼原基。Scale bars, 100 μm.

(G) 上皮組織に占める GFP 陽性クローンの割合を $Ras^{V12} + Egr + lexA-i$ (n=12), $Ras^{V12} + Egr + Crk-i$ (n=13), $Yki^{CA} + lexA-i$ (n=11), $Yki^{CA} + Crk-i$ (n=12), $Ras^{V12} + lexA-i$ (n=14), $Ras^{V12} + Crk-i$ (n=13) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

***p < 0.001; n.s. (有意差無し) p > 0.05

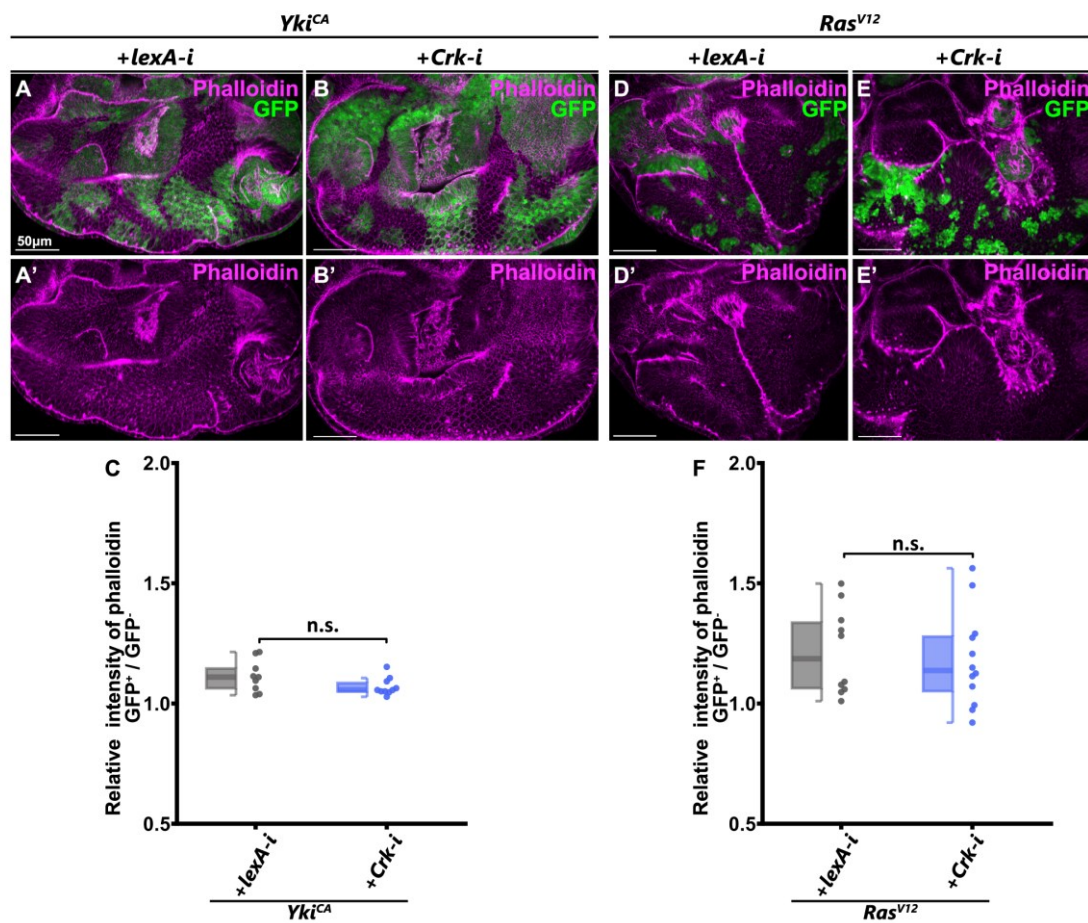


図 14: Crk の抑制は Yki 活性化腫瘍、Ras 活性化腫瘍における F-アクチンの集積には影響しない

(A, B) MARCM 法を用いて、*Yki^{CA}* + *lexA-i* (A), *Yki^{CA}* + *Crk-i* (B) クローンを誘導し、Phalloidin 染色した複眼原基。Scale bars, 50 μm.

(C) Phalloidin シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を *Yki^{CA}* + *lexA-i* (n=9), *Yki^{CA}* + *Crk-i* (n=10) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

n.s. (有意差無し) $p > 0.05$

(D, E) MARCM 法を用いて、*Ras^{V12}* + *lexA-i* (D), *Ras^{V12}* + *Crk-i* (E) クローンを誘導し、Phalloidin 染色した複眼原基。Scale bars, 50 μm.

(F) Phalloidin シグナルの比 (GFP 陽性領域/GFP 陰性領域) を *Ras^{V12}* + *lexA-i* (n=10), *Ras^{V12}* + *Crk-i* (n=12) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

n.s. (有意差無し) $p > 0.05$

3-5 データベースの解析

次に、これまでモデルで見出したメカニズムがヒトにおける YAP 依存的な腫瘍抑制に適応できるかをヒトがん細胞のデータベースである Cancer Dependency Map project (DepMap portal: <https://depmap.org/portal>)を用いて解析を行った。このデータベースには、ヒトがん細胞を用いて行われたゲノムワイド RNAi および CRISPR によるスクリーニングのデータが内包されている[44],[45]。このデータベースにおいては、CRISPR-Cas 9 によるノックアウトや RNAi によるノックダウンによるがん細胞の増殖抑制効果が”dependency score” または,”gene effect”として表現されている。解析の結果、ヒト CRK ファミリータンパクである CRK、および CRKL と YAP の dependency score が正に相関することを見出した (図 15A, “Pearson correlation”を参照)。このことは、YAP に生存を依存する腫瘍は CRK ファミリータンパク質にも依存するという相関があることが示唆している。また、*YAP mRNA* の発現量、および、タンパク質の発現量は、CRK, CRKL の gene effect と有意な負の相関を示すことを見出した (*mRNA*:図 15B-E, タンパク質: 図 15F-I)。これらの結果は、YAP を高発現するがん細胞は CRK や CRKL の欠損によるがん抑制効果に対する感受性が高いことを示唆している。

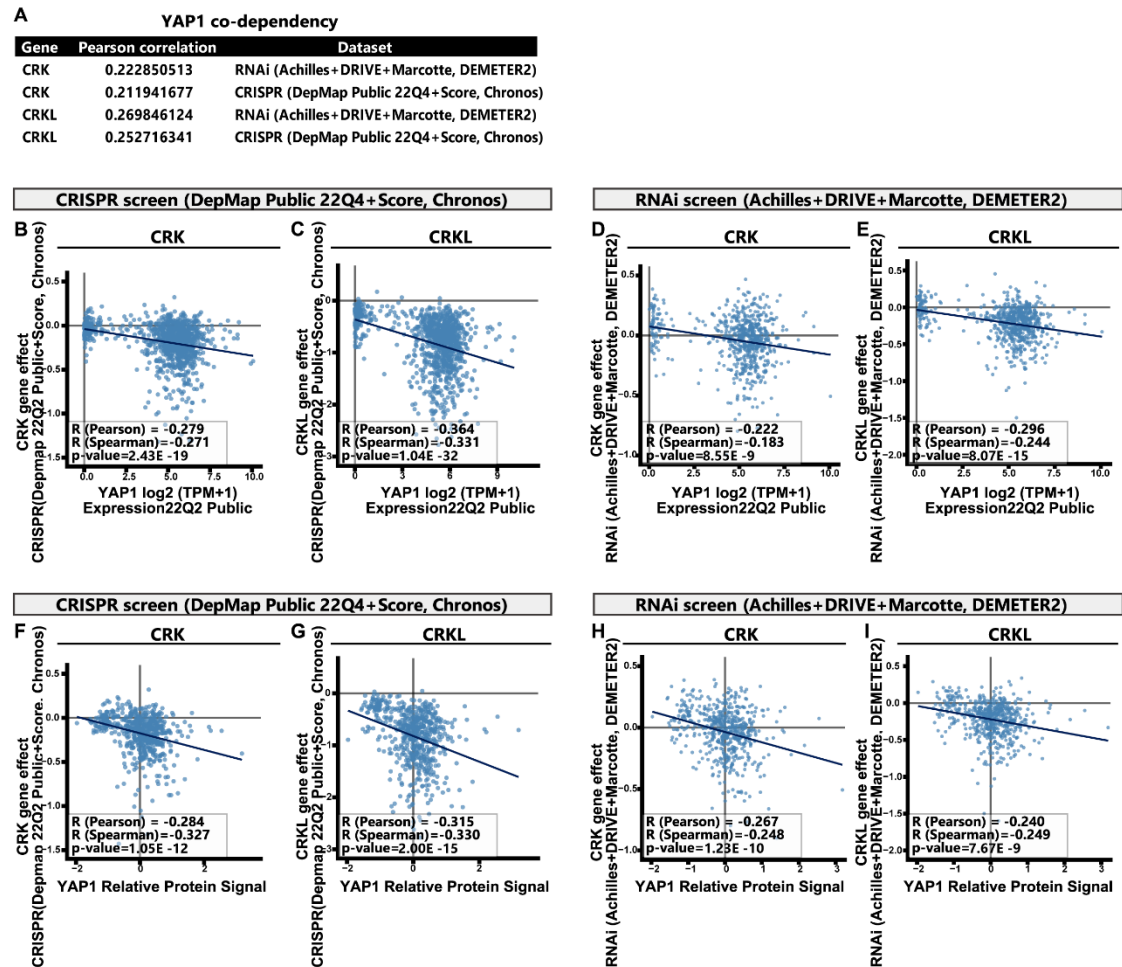


図 15： YAP 発現量は CRK、CRKL 発現抑制効果と有意な相関を示す

(A) CRK, CRKL、および、YAP の dependency score の Pearson 係数。

(B-E) YAP mRNA 発現量 (x-axis) に対する CRK または CRKL の dependency score (y-axis) のプロット。 CRISPR スクリーニング(B, C)、および、RNAi スクリーニング(D, E)。

(F-I) YAP 発現量 (x-axis) に対する CRK または CRKL の dependency score (y-axis) のプロット。 CRISPR スクリーニング(F, G)、および、RNAi スクリーニング(H, I)。

第4章 考察

本研究では、ショウジョウバエ YAP ホモログである Yki 依存的に過剰増殖する悪性腫瘍モデルを用いて、正常細胞に影響を与えずに腫瘍を特異的に排除することを可能とする標的分子を探索および同定し、その阻害による腫瘍の排除メカニズムの解析を行った。 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍においては、Crk が高発現しており、Crk の発現抑制は Yki の活性化を抑制する。メカニズムとしては、腫瘍において、Crk は F-actin の集積を介した Yki 活性化に寄与している。Crk の抑制は Yki の活性を低下させ、その結果、腫瘍において活性化している JNK による細胞死を増加させる。さらに、データベース解析によって、ヒト YAP 高発現がん細胞に対して、CRK、あるいは、CRKL が有効な標的となりうることを見出した。

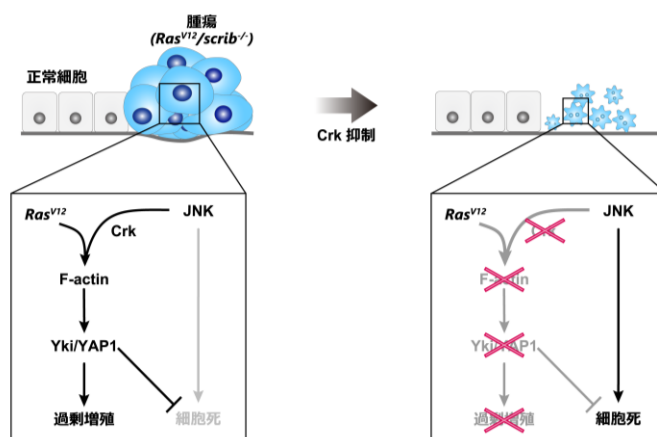


図 16 : Crk 抑制による腫瘍抑制のモデル

ショウジョウバエ Crk は、ヒト CRK および CRKL のホモログであり、 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍で特異的に発現している。 $Ras^{V12}/scrib^{-/-}$ 腫瘍において Crk は F-アクチンの蓄積に寄与し、Yki/YAP の活性化を誘導する。腫瘍における Crk の阻害は、F-アクチンの集積を破綻させ、JNK シグナル依存的に細胞死を増加させ、腫瘍を排除する。

Crk による Hippo 経路制御メカニズム

今回、遺伝学的実験によって、Crk が Hippo 経路を介して Yki の活性化に寄与することを見出した。しかし、その詳細な機構は明らかでない。Crk の抑制は Yki 活性化腫瘍には影響しないことから (図 13C, D, 図 13G で定量)、Yki の上流において Hippo 経路を抑制する可能性が考えられた。そこで、Hippo 経路因子と Crk との上下関係を探るべく、遺伝学的実験を行った。*wt*s 変異体細胞は腫瘍化することが報告されている[46]。興味深いことに、*wt*s 変異細胞の腫瘍化は Crk のノックダウンによって有意に抑制された (図 17A, B, 図 17C で定量)。この結果は、Crk が *wt*s の下流において、Hippo 経路の制御に寄与することを示唆している。今後、Crk と相互作用するタンパク質を近位ラベリング法などを用いて探索することで、Crk による Hippo 経路の制御機構を解明する予定である。哺乳類においても Src による YAP 活性化経路において、CRK あるいは CRKL が Src の下流において F-アクチンを介して YAP の活性化に寄与する可能性が示唆されている [47]。そのため、CRK ファミリータンパク質による Hippo 経路の制御機構は種を超えて保存されている可能性があると考えられる。

腫瘍における Crk の発現誘導メカニズム

本研究では、Crk の発現が腫瘍細胞において上昇することを見出したが (図 5A, B)、腫瘍における Crk の発現誘導メカニズムは不明である。興味深いことに、*scrib* 変異、Ras 活性化、および、Yki 活性化のみでは Crk の発現は上昇しなかった (図 18A-C)。これらの結果から、腫瘍における複数のシグナルの協調によって Crk の発現が誘導されている可能性が考えられる。例えば、MAPK 経路下流の転写因子 Ets at 21C (Ets21C) は JNK 下流の転写因子との協調によって PDGF- and VEGF-related factor 1 (pvf1) や unpaired 1 (upd1) のような分泌因子の発現を誘導すること [48], [49]、また、Yki が JNK と協調することで L-amino acid transporter 1 (LAT1) のような特定の標的遺伝子の発現を上昇させることが報告されており [28], [50]、そのような複数のシグナルの強調によって、腫瘍において Crk の発現が誘導されることが考えられる。今後、その発現誘導機構を解析することで、ヒトのがんにおける CRK あるいは CRKL の発現制御機構の理解に貢献できると予想される。

CRK あるいは CRKL を標的とした創薬

本研究では、*in vivo* モデルでのスクリーニングを通じて YAP 活性化型がん細胞に対する標的として CRK あるいは CRKL を見出した。興味深いことに、*in vitro* 系で肝細胞において CRKL が YAP の活性化に寄与することが示されている。肝細胞がん患者由来の組織においても免疫組織染色によって CRKL の発現と核移行型 YAP のシグナルが正相

関することが示されており、そして、*in vitro*において SNU182, Hep3B などの肝がん細胞において CRKL をノックダウンすると、YAP の標的遺伝子の転写量が低下することすなわち、YAP 活性が低下することが示されている[51]。そのため、ヒトにおいても CRKL が YAP 活性化型がんに対する有効な標的となりうる可能性があるといえるだろう。

CRK の上流のキナーゼである ABL キナーゼによるリン酸化を阻害するペプチド[52]、または、CRK 下流の因子 Ras-associated protein-1 (Rap1)の阻害剤は存在する[53]ものの、現状、直接的に CRK や CRKL を阻害する薬剤は開発されていない。今後、SH2 、あるいは、SH3 ドメインを標的とした創薬によって、CRK や CRKL を起点としたがん治療法が確立される可能性があると考えられる。

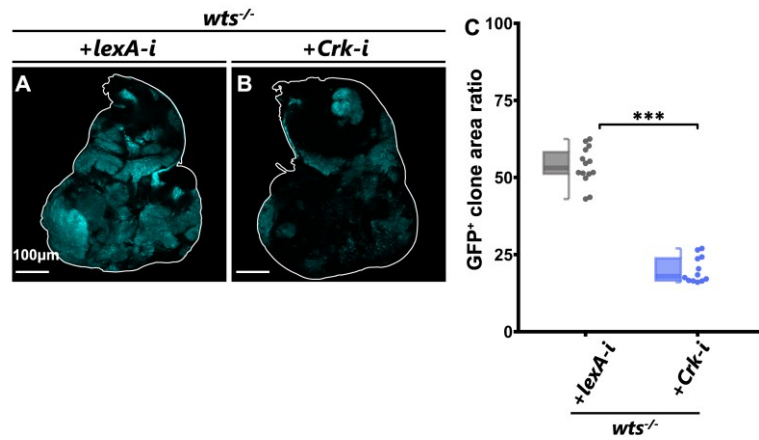


図 17 : Crk の抑制は *wts^{-/-}* 腫瘍を抑制する

(A, B) MARCM 法を用いて、*wts^{-/-} + lexA-i* (A), *wts^{-/-} + Crk-i* (B) クローンを誘導した複眼原基。Scale bars, 100 μm.

(c) 上皮組織に占める GFP 陽性クローンの割合を *wts^{-/-} + lexA-i* (n=14), *wts^{-/-} + Crk-i* (n=12) について定量し、生データをプロットし、ボックスプロットと重ねた。Wilcoxon rank sum test によって検定し、有意差は下記の通り示した。

***p < 0.001

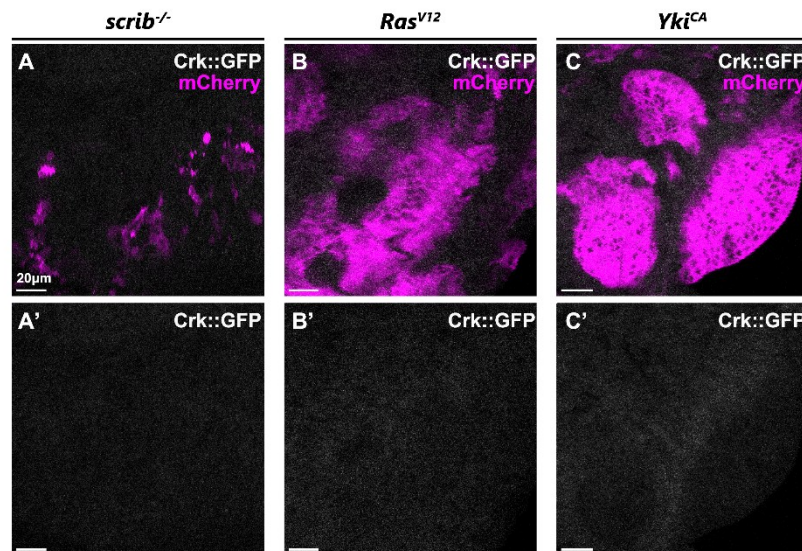


図 18: *scrib^{-/-}*、*Ras^{V12}*、*Yki^{CA}* クローンでは Crk の発現は上昇しない

(A-C) MARCM 法を用いて、*scrib^{-/-}* (A), *Ras^{V12}* (B), *Yki^{CA}* (C) クローンを誘導した上皮組織。Scale bars, 20 μm.

補遺

表 1: 実験に使用したショウジョウバエの遺伝型

図 3

-
- A** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- B** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- C** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ FRT82B*
- D** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ FRT82B*

図 4

-
- A** *tub-Gal80, FRT19A/ dlg1^{m52}, FRT19A; UAS-lexA-RNAi/ UAS-Ras^{V12}; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ +*
- B** *tub-Gal80, FRT19A/ dlg1^{m52}, FRT19A; UAS-Crk-RNAi/ UAS-Ras^{V12}; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ +*

図 5

-
- A** *eyFLP, UAS-Dcr2 / w or Y; Act>y+>Gal4, UAS-mcherry / +; FRT82B, tub-Gal80/ FRT82B; +/- mNG::3XFLAG::Crk*
-

B *eyFLP, UAS-Dcr2 / w or Y; Act>y+>Gal4, UAS-mcherry / +; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l; +/-mNG::3XFLAG::Crk*

 6

A *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

B *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

C *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ FRT82B*

D *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ FRT82B*

F *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

G *UAS-p35 / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

 7

A *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

B *UAS-Bsk^{DN} / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-*

Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l

☒ 8

- A** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/
UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- B** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/
UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- C** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/
UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- D** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/
UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

☒ 9

- A** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; diap1-lacZ, FRT82B,
tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- B** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; diap1-lacZ, FRT82B, tub-
Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- C** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; diap1-lacZ, FRT82B, tub-
Gal80/ FRT82B*
- D** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; diap1-lacZ, FRT82B, tub-
Gal80/ FRT82B*

☒ 10

- A** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / ex-lacZ; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- B** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi, ex-lacZ; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

☒ 11

- A** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- B** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- D** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- E** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-yki-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

☒ 12

- A** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*

- B** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/
UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l*
- D** *tub-Gal80, FRT19A/ FRT19A; UAS-Ras^{V12}, UAS-Eiger/ UAS-lexA-RNAi; eyFLP,
Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ +*
- E** *tub-Gal80, FRT19A/ FRT19A; UAS-Ras^{V12}, UAS-Eiger/ UAS-Crk-RNAi; eyFLP,
Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ +*

☒ 13

- A** *tub-Gal80, FRT19A/ FRT19A; UAS-Ras^{V12}, UAS-Eiger/ UAS-lexA-RNAi; eyFLP,
Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ +*
- B** *tub-Gal80, FRT19A/ FRT19A; UAS-Ras^{V12}, UAS-Eiger/ UAS-Crk-RNAi; eyFLP,
Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ +*
- C** *tub-Gal80, FRT19A/ FRT19A; UAS-Yki^{CA}/ UAS-lexA-RNAi; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-
GFP/ +*
- D** *tub-Gal80, FRT19A/ FRT19A; UAS-Yki^{CA} / UAS-Crk-RNAi; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-
GFP/ +*
- E** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/
UAS-Ras^{V12}, FRT82B*
- F** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/
UAS-Ras^{V12}, FRT82B*

☒ 14

-
- A** *tub-Gal80, FRT19A/ FRT19A; UAS-Yki^{CA}/ UAS-lexA-RNAi; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ +*
- B** *tub-Gal80, FRT19A/ FRT19A; UAS-Yki^{CA} / UAS-Crk-RNAi; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ +*
- C** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B*
- D** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-Ras^{V12}, FRT82B*

☒ 17

-
- A** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-lexA-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ FRT82B, wts^{X1}*
- B** *w / w or Y; eyFLP, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Crk-RNAi; FRT82B, tub-Gal80/ FRT82B, wts^{X1}*

☒ 18

-
- A** *eyFLP, UAS-Dcr2 / w or Y; Act>y+>Gal4, UAS-mcherry / +; FRT82B, tub-Gal80/ FRT82B, scrib^l; +/- mNG::3XFLAG::Crk*
- B** *eyFLP, UAS-Dcr2 / w or Y; Act>y+>Gal4, UAS-mcherry / +; FRT82B, tub-Gal80/ UAS-*

Ras^{V12}, FRT82B; +/- mNG::3XFLAG::Crk

C *eyFLP, UAS-Dcr2 / w or Y; tub-Gal80, FRT40A/FRT 40A; Act>y+>Gal4, UAS-mcherry / UAS-Yki^{CA}; +/- mNG::3XFLAG::Crk*

表 2: 遺伝学的スクリーニングに使用したショウジョウバエ系統

Symbol	Stock no.	Symbol	Stock no.	Symbol	Stock no.
4E-T	NIG HMJ23850	CG32850	NIG HMJ22085	pan	NIG 17964R-3
Actbeta	BDSC 42493	CG32850	NIG HMS02866	pho	NIG 17743R-1
anne	NIG HMS02719	CG33941	BDSC 61205	pho	NIG HMS02619
apolpp	NIG 11064R-2	ci	NIG 2125R-2	PIP4K	BDSC 65891
apolpp	NIG 11064R-3	ci	NIG HMJ23860	PlexA	BDSC 67845
Arf102F	NIG 11027R-2	Crk	BDSC 55277	PlexA	NIG 11081R-1
Arl4	NIG HMJ21438	Crk	NIG HMJ22995	PlexB	NIG 17245R-2
Asator	BDSC 57033	dati	NIG 10204R-2	PlexB	NIG HMJ21821
Asator	NIG HMJ23097	dati	NIG 10204R-5	Pur-alpha	BDSC 67267
bip2	BDSC 65061	Dyrk3	NIG HMJ22332	Rad23	NIG HMS02747
bt	NIG 10285R-1	Eph	BDSC 39066	robo2	NIG5574R-1
bt	NIG 1479R-2	Eph	BDSC 60006	RpS3A	NIG 2168R-2
Cadps	NIG 18026R-1	Ephrin	NIG 1862R-3	Sox102F	BDSC 65133
Cals	NIG 11059R-1	fd102C	NIG 11152R-3	Syt7	NIG 2381Ra-3
Cals	NIG 11059R-3	fuss	NIG 11093R-1	Syt7	NIG HMJ22333
CG11076	NIG HMJ23190	Gat	NIG 1732R-1	unc-13	BDSC 77360
CG11077	BDSC 56889	Hcf	BDSC 36799	unc-13	NIG 2999R-2
CG11155	NIG 11155R-2	JYalpha	NIG HMJ23836	yellow-h	NIG HMJ22823
CG11360	BDSC 62158	Kif3C	BDSC 40886	Zip102B	BDSC 55162
CG11360	BDSC 67933	lgs	BDSC 37476	Zyx	NIG 32018R-1
CG1674	NIG 1674R-2	mav	BDSC 36809	Zyx	NIG HMS01606
CG1674	NIG HMJ23756	mav	NIG 1901R-3		
CG1909	NIG HMC02933	mGluR	NIG 11144R-2		
CG31997	BDSC 57517	mGluR	NIG HMS02201		
CG31997	NIG HMJ23080	Mitf	NIG HMS02857		
CG31998	NIG 11572R-1	myo	NIG 1838R-1		
CG32006	NIG 32006R-1	ND-49	BDSC 57499		
CG32017	BDSC 60450	onecut	NIG HMJ22466		
CG32017	NIG HMJ21288	pan	BDSC 40848		

表 3: YAP と dependency score が相関する遺伝子のリスト

Gene	Entrez Id	Dataset	Correlation	Gene	Entrez Id	Dataset	Correlation
WDR97	340390	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.446977785	ARHGEF7	8874	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.353223359
ENO4	387712	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.345407936	PKN2	5586	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.331888146
C5orf46	389336	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.341591512	TEAD1	7003	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.331221282
YES1	7525	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.324033397	MARK2	2011	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.31849898
CYFIP1	23191	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.323490721	TP53BP2	7159	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.307979957
TEAD1	7003	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.321144925	TEAD3	7005	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.306251827
C1orf109	54955	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.312896928	ILK	3611	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.303833285
SRD5A3	79644	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.299724826	RSU1	6251	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.286966374
MTSS2	92154	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.299446928	NCKAP1	10787	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.285201368
PKN2	5586	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.297865574	RAC1	5879	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.281435863
RAC1	5879	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.293064261	TNKS2	80351	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.278075043
SP4	6671	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.284673639	MOB4	25843	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.275001817
GAPT	202309	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.284193718	KLF5	688	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.27290507
DOK2	9046	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.279804168	DLG5	9231	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.270195563
CEP135	9662	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.279791307	TLN1	7094	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.264679037
RAPGEF1	2889	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.278442696	ITGB1	3688	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.264154242
SAMD4B	55095	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.277600848	LIMS1	3987	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.263702784
TLN1	7094	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.27553753	PAK2	5062	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.258024125
RSU1	6251	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.271141558	CRKL	1399	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.255708113
NCKAP1	10787	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.270580431	PCNX3	399909	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.254117461
CRKL	1399	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.269846124	GRB2	2885	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.251241984
FAM180A	389558	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.268794693	EGFR	1956	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.247605077
SERPINB5	5268	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.266283431	PXN	5829	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.244935754
ARPC2	10109	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.264287049	CEP126	57562	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.235349379
ZNF32	7580	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.26145318	FOSL1	8061	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.232829908
SLC23A1	9963	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.252007104	BCAR1	9564	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.229546749
TENT2	167153	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.248618302	SLMAP	7871	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.22853472
CARD8	22900	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.247086749	CRK	1398	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.227825372
GPC5	2262	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.246360786	DOCK5	80005	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.227694296
SARAF	51669	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.245486959	AMOTL1	154810	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.226340966
CDH23	64072	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.242570485	WDR26	80232	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.219895548
LRRC69	100130742	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.240767016	CD248	57124	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.21825197
ACTR3	10096	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.239775594	ANGPTL5	253935	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.215356457
PPP1R12A	4659	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.239748627	CCDC87	55231	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.214590573
FUT4	2526	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.236350747	TM2D2	83877	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.21421583
TMEM100	55273	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.236083387	PLEKHB1	58473	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.213665539
MAPKAP1	79109	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.234405282	ZFP36L1	677	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.21328175
TTG9B	148014	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.233108226	UBE2H	7328	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.212353382
ITGAV	3685	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.232352408	PC	5091	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.209551912
POLN	353497	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.23091198	ITGB5	3693	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.20917118
HRNR	388697	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.228047096	ALG6	29929	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.208918915
TLK1	9874	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.227943135	MMP27	64066	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.208836568
CLCF1	23529	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.226283808	PPP1CA	5499	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.205113831
MRPL49	740	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.226166511	GRK2	156	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.204881388
HHATL	57467	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.223720604	TRIO	7204	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.204083048
SMO1	255798	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.223460335	TEAD4	7004	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.203927192
CRK	1398	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.222850513	CTTN	2017	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.203285687
EGFR	1956	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.221232716	VCL	7414	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.203035962
MAPKAPK2	9261	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.220654983	FNDC3B	64778	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.202694712
PRSS41	360226	RNAi (Achilles+DRIVE+Marcotte, DEMETER2)	0.218493933	POPG1	22820	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.202251301
				SPTSSA	171546	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.201304447
				TYR	7299	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.201001799
				KCMF1	56888	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.198180848
				FGFR10P2	26127	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.197855619
				SESN3	143686	CRISPR (DepMap 22Q2 Public+Score, Chronos)	0.197824059

参考文献

- [1] U. Anand *et al.*, “Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics,” *Genes Dis.*, vol. 10, no. 4, pp. 1367–1401, Jul. 2023.
- [2] L. Zhong *et al.*, “Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, p. 201, May 2021.
- [3] H.-Y. Min and H.-Y. Lee, “Molecular targeted therapy for anticancer treatment,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 54, no. 10, pp. 1670–1694, Oct. 2022.
- [4] C. Liu, T. Qin, Y. Huang, Y. Li, G. Chen, and C. Sun, “Drug screening model meets cancer organoid technology,” *Transl. Oncol.*, vol. 13, no. 11, p. 100840, Nov. 2020.
- [5] X. Ma, Q. Wang, G. Li, H. Li, S. Xu, and D. Pang, “Cancer organoids: A platform in basic and translational research,” *Genes Dis.*, vol. 11, no. 2, pp. 614–632, Mar. 2024.
- [6] F. Sanchez-Vega *et al.*, “Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas,” *Cell*, vol. 173, no. 2, pp. 321–337.e10, Apr. 2018.
- [7] F. Zanconato, M. Cordenonsi, and S. Piccolo, “YAP/TAZ at the Roots of Cancer,” *Cancer Cell*, vol. 29, no. 6, pp. 783–803, Jun. 2016.
- [8] R. Cunningham and C. G. Hansen, “The Hippo pathway in cancer: YAP/TAZ and TEAD as therapeutic targets in cancer,” *Clin. Sci.*, vol. 136, no. 3, pp. 197–222, Feb. 2022.
- [9] Y. Zhang, X. Wang, and X. Zhou, “Functions of Yes-association protein (YAP) in cancer progression and anticancer therapy resistance,” *Brain Science Advances*, vol. 8, no. 1, pp. 1–18, Mar. 2022.
- [10] J. Luo *et al.*, “The oncogenic roles and clinical implications of YAP/TAZ in breast cancer,” *Br. J. Cancer*, Feb. 2023.
- [11] K. Snigdha, K. S. Gangwani, G. V. Lapalikar, A. Singh, and M. Kango-Singh, “Hippo signaling in cancer: Lessons from Drosophila models,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 7, no. May. Frontiers Media S.A., p. 85, 24-May-2019.
- [12] E. A. Chapeau *et al.*, “Direct and selective pharmacological disruption of the YAP-TEAD interface by IAG933 inhibits Hippo-dependent and RAS-MAPK-altered cancers,” *Nat. Cancer*, vol. 5, no. 7, pp. 1102–1120, Jul. 2024.
- [13] V. R. Dasari, V. Mazack, W. Feng, J. Nash, D. J. Carey, and R. Gogoi, “Verteporfin exhibits YAP-independent anti-proliferative and cytotoxic effects in endometrial cancer cells,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 17, pp. 28628–28640, Apr. 2017.
- [14] H. Zhang *et al.*, “Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1,” *Sci. Signal.*, vol. 8, no. 397, p. ra98, Oct. 2015.
- [15] S. Di Agostino *et al.*, “YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins,” *EMBO Rep.*, vol. 17, no. 2, pp. 188–201, Feb. 2016.

- [16] J. Rosenbluh *et al.*, “ β -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis,” *Cell*, vol. 151, no. 7, pp. 1457–1473, Dec. 2012.
- [17] S. M. Feller, “Crk family adaptors–signalling complex formation and biological roles,” *Oncogene*, vol. 20, no. 44, pp. 6348–6371, Oct. 2001.
- [18] R. B. Birge, C. Kalodimos, F. Inagaki, and S. Tanaka, “Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling,” *Cell Communication and Signaling 2009 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–23, May 2009.
- [19] T. Park, “Crk and CrkL as Therapeutic Targets for Cancer Treatment,” *Cells 2021, Vol. 10, Page 739*, vol. 10, no. 4, p. 739, Mar. 2021.
- [20] M. Tsuda and S. Tanaka, “Roles for crk in cancer metastasis and invasion,” *Genes Cancer*, vol. 3, no. 5–6, pp. 334–340, May 2012.
- [21] A. J. Spracklen *et al.*, “The Crk adapter protein is essential for Drosophila embryogenesis, where it regulates multiple actin-dependent morphogenic events,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 30, no. 18, pp. 2399–2421, Aug. 2019.
- [22] H. Jiang, T. Kimura, H. Hai, R. Yamamura, and M. Sonoshita, “Drosophila as a toolkit to tackle cancer and its metabolism,” *Front. Oncol.*, vol. 12, p. 982751, Aug. 2022.
- [23] L. T. Reiter, L. Potocki, S. Chien, M. Gribskov, and E. Bier, “A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster,” *Genome Res.*, vol. 11, no. 6, pp. 1114–1125, Jun. 2001.
- [24] M. F. Wangler *et al.*, “Model organisms facilitate rare disease diagnosis and therapeutic research,” *Genetics*, vol. 207, no. 1, pp. 9–27, Sep. 2017.
- [25] Z. Mirzoyan, M. Sollazzo, M. Allocca, A. M. Valenza, D. Grifoni, and P. Bellosta, “Drosophila melanogaster: A Model Organism to Study Cancer,” *Front. Genet.*, vol. 10, p. 51, Mar. 2019.
- [26] T. Lee and L. Luo, “Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis,” *Neuron*, vol. 22, no. 3, pp. 451–461, Mar. 1999.
- [27] R. A. Pagliarini and T. Xu, “A Genetic Screen in Drosophila for Metastatic Behavior,” *Science*, vol. 302, no. 5648, pp. 1227–1231, Nov. 2003.
- [28] B. Cong, M. Nakamura, Y. Sando, T. Kondo, S. Ohsawa, and T. Igaki, “JNK and Yorkie drive tumor malignancy by inducing L-amino acid transporter 1 in Drosophila,” *PLoS Genet.*, vol. 17, no. 11, Nov. 2021.
- [29] T. Igaki, R. A. Pagliarini, and T. Xu, “Loss of Cell Polarity Drives Tumor Growth and Invasion through JNK Activation in Drosophila,” *Curr. Biol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1139–1146, Jun. 2006.
- [30] K. Doggett, F. A. Grusche, H. E. Richardson, and A. M. Brumby, “Loss of the Drosophila cell polarity regulator Scribbled promotes epithelial tissue overgrowth and cooperation with

- oncogenic Ras-Raf through impaired Hippo pathway signaling,” *BMC Dev. Biol.*, vol. 11, no. 1, p. 57, Sep. 2011.
- [31] M. Atkins *et al.*, “An Ectopic Network of Transcription Factors Regulated by Hippo Signaling Drives Growth and Invasion of a Malignant Tumor Model,” *Curr. Biol.*, vol. 26, no. 16, pp. 2101–2113, Aug. 2016.
- [32] M. Wu, J. C. Pastor-Pareja, and T. Xu, “Interaction between RasV12 and scribbled clones induces tumour growth and invasion,” *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 545–548, Jan. 2010.
- [33] T. Lee and L. Luo, “Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development,” *Trends in Neurosciences*, vol. 24, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 251–254, 01-May-2001.
- [34] S. L. Goldsmith *et al.*, “New resources for the *Drosophila* 4th chromosome: FRT101F enabled mitotic clones and Bloom syndrome helicase enabled meiotic recombination,” *G3 (Bethesda)*, vol. 12, no. 4, p. jkac019, Apr. 2022.
- [35] T. Xu and G. M. Rubin, “Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues,” *Development*, vol. 117, no. 4, pp. 1223–1237, Apr. 1993.
- [36] P. Jin, R. Duan, F. Luo, G. Zhang, S. N. Hong, and E. H. Chen, “Competition between Blown fuse and WASP for WIP binding regulates the dynamics of WASP-dependent actin polymerization in vivo,” *Dev. Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 623–638, May 2011.
- [37] Z. Wang, X. Xia, J. Li, and T. Igaki, “Tumor elimination by clustered microRNAs miR-306 and miR-79 via noncanonical activation of JNK signaling,” *Elife*, vol. 11, Oct. 2022.
- [38] M. Uhlirova and D. Bohmann, “JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*,” *EMBO J.*, vol. 25, no. 22, pp. 5294–5304, Nov. 2006.
- [39] J. Huang, S. Wu, J. Barrera, K. Matthews, and D. Pan, “The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP,” *Cell*, vol. 122, no. 3, pp. 421–434, Aug. 2005.
- [40] F. Hamaratoglu *et al.*, “The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 1, pp. 27–36, Jan. 2006.
- [41] M. Enomoto, D. Kizawa, S. Ohsawa, and T. Igaki, “JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity,” *Dev. Biol.*, vol. 403, no. 2, pp. 162–171, Jul. 2015.
- [42] J. Dong *et al.*, “Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals,” *Cell*, vol. 130, no. 6, pp. 1120–1133, Sep. 2007.
- [43] H. Oh and K. D. Irvine, “In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization,” *Development*, vol. 135, no. 6, pp. 1081–1088, Mar. 2008.

- [44] R. M. Meyers *et al.*, “Computational correction of copy number effect improves specificity of CRISPR-Cas9 essentiality screens in cancer cells,” *Nat. Genet.*, vol. 49, no. 12, pp. 1779–1784, Dec. 2017.
- [45] J. M. McFarland *et al.*, “Improved estimation of cancer dependencies from large-scale RNAi screens using model-based normalization and data integration,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 4610, Nov. 2018.
- [46] T. Xu, W. Wang, S. Zhang, R. A. Stewart, and W. Yu, “Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase,” *Development*, vol. 121, no. 4, pp. 1053–1063, Apr. 1995.
- [47] A. Hannan *et al.*, “Crk mediates Csk-Hippo signaling independently of Yap tyrosine phosphorylation to induce cell extrusion,” *bioRxiv*, p. 2024.06.27.601065, 01-Jul-2024.
- [48] J. Toggweiler, M. Willecke, and K. Basler, “The transcription factor Ets21C drives tumor growth by cooperating with AP-1,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, Oct. 2016.
- [49] E. Külshammer, J. Mundorf, M. Kilinc, P. Frommolt, P. Wagle, and M. Uhlirova, “Interplay among *Drosophila* transcription factors Ets21c, Fos and Ftz-F1 drives JNK-mediated tumor malignancy,” *Dis. Model. Mech.*, vol. 8, no. 10, pp. 1279–1293, Oct. 2015.
- [50] K. A. Mitchell *et al.*, “The JNK and Hippo pathways control epithelial integrity and prevent tumor initiation by regulating an overlapping transcriptome,” *Curr. Biol.*, vol. 34, no. 17, pp. 3966–3982.e7, Sep. 2024.
- [51] M. C. Wesener *et al.*, “CRKL enhances YAP signaling through binding and JNK/JUN pathway activation in liver cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 25, no. 15, p. 8549, Aug. 2024.
- [52] Q. Shen, V. S. Bhatt, I. Krieger, J. C. Sacchettini, and J.-H. Cho, “Structure-guided design of a potent peptide inhibitor targeting the interaction between CRK and ABL kinase,” *Medchemcomm*, vol. 9, no. 3, pp. 519–524, Mar. 2018.
- [53] F. C. Franke *et al.*, “Novel role for CRK adaptor proteins as essential components of SRC/FAK signaling for epithelial–mesenchymal transition and colorectal cancer aggressiveness,” *International Journal of Cancer*, vol. 147, no. 6, pp. 1715–1731, Sep. 2020.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、学部生のころからお世話になり、研究活動をご教授いただきました井垣達史教授に心より感謝を申し上げます。

また、本研究に際して重要なデータのご提供やディスカッションをしてくださった井垣研究室所属の菅田浩司准教授、谷口喜一郎特定講師、永田理奈助教授、中村麻衣博士、山銅ゆかり氏、松本涼博士課程学生、石原さくら博士課程学生、上田汐莉修士課程学生、福井大学学術研究院医学系部門榎本将人特命教授、京都大学生命科学研究科小田裕香子教授、昭和大学医学部森戸大介講師、Fleming 研究所 Marianti Kiparaki 博士に深く感謝を申し上げます。特に、菅田浩司准教授、松本涼博士課程学生には非常にご尽力いただきました、深く感謝いたします。

共同研究者として、重井医学研究所松山誠博士、小林朋絵氏には抗 Xrp1 抗体をご作成、ご提供いただきました。この抗体なくしては、本研究の遂行はかないませんでした、心より感謝申し上げます。

共同研究者として、京都大学 ASHBi ヒト生物学高等研究拠点村川泰裕教授、安原 聡志氏、竹内 一博氏には、RNA-seq 解析を行っていただきました。本研究の根幹となるデータをご提供いただきました、心より感謝申し上げます。

共同研究者として、東京理科大学近藤周准教授、国立遺伝学研究所斎藤都暁教授、三好啓太助教授には、CRISPR-Cas9 変異体系統をご作成いただきました。この変異体系統を用いて本研究を大きく進める結果を得ることができました、心より感謝申し上げます。

京都大学大学院薬学研究科ナノバイオ医薬創成科学講座の米原伸教授には実験機器の使用の許可をいただきました、深く感謝しています。

多細胞生命自律性の領域の皆様には、領域会議やコロキウムなどで発表を拝聴させていただいたり、ディスカッションをさせていただいたりしました。そのおかげで、重要な視座と研究活動に対する活力をいただきました、誠にありがとうございます。

最後になりますが支援してくださった家族に感謝します。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員 DC1 として行われたものです。

本学位論文は以下の学術論文の内容にもとづいて書かれたものである。

Bungo Kakemura and Tatsushi Igaki

Blockade of Crk eliminates Yki/YAP-activated tumors via JNK-mediated apoptosis in *Drosophila*

Communications Biology volume 7, Article number: 1196 (2024)

DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06897-w>