

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19414

研究課題名(和文) 肺癌及び肺線維症における転写共役因子TAZの機能解析 - 肺間質に焦点を当てて -

研究課題名(英文) Analysis of the functional roles of TAZ in lung cancer and lung fibrosis with a focus on lung mesenchyme

研究代表者

野口 智史 (NOGUCHI, Satoshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60732807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo pathwayの主要な構成因子であるTAZは臓器サイズのコントロールや癌の進展など様々な病態に關与する。本研究では肺線維症におけるTAZの機能的役割を解析した。TAZは特発性肺線維症の肺における線維芽細胞巢において高発現していた。in vitroではTAZは肺線維芽細胞において、筋線維芽細胞への分化、細胞増殖、遊走、マトリックス収縮能を制御していた。遺伝子発現プロファイリングによりCTGFやコラーゲンの発現がTAZによりコントロールされることが分かった。以上より、TAZは肺線維芽細胞を活性化し、肺線維化に寄与することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：TAZ, a key component of the Hippo pathway, regulates a variety of biological processes including control of organ size and cancer progression. In this study, we explored the roles of TAZ in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) through histological analyses of human lung tissues and cell culture experiments. TAZ was highly expressed in the fibroblastic foci of lungs from patients with IPF. TAZ controlled myofibroblast marker expression, proliferation, migration, and matrix contraction in cultured lung fibroblasts. Gene expression profiling revealed TAZ-mediated regulation of connective tissue growth factor and type I collagen. These findings suggest that TAZ is involved in the pathogenesis of IPF through multifaceted effects on lung fibroblasts.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：TAZ Hippo pathway 肺線維症

1. 研究開始当初の背景

Hippo pathway はショウジョウバエからヒトまで進化的に保存された経路で、contact inhibition を担うシグナル伝達系として働き、細胞増殖、生存において重要な役割を果たす。TAZ は Hippo pathway の主要な構成因子である。

近年、Hippo pathway は細胞外基質 (ECM) の硬さや細胞形態などの情報を細胞内に伝えるメカノトランスダクションにおいて中核的な役割を果たすことが報告された。

肺癌では肺線維芽細胞は癌間質の主要な構成成分であり、癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts; CAF) と呼ばれ、活性化された CAF は成長因子などにより細胞間の相互作用や ECM の修飾を誘導し癌の進展を促進する。また肺線維症でも活性化した線維芽細胞が線維化部位に集積し、ECM の産生・分解による ECM のリモデリングを通じ、肺組織の線維化・硬化を引き起こす。両疾患における肺線維芽細胞は高い収縮能や α -smooth muscle actin (α -SMA) の高発現など類似した性質を持ち、ECM リモデリングは両疾患の主要な病態の一つである。

これらのことから肺線維症や肺癌の間質において Hippo pathway が活性化され、これらの病態に寄与している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

肺線維芽細胞における TAZ の機能を解析し、肺癌及び肺線維症への寄与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

肺線維芽細胞における TAZ の機能を、(1) in vitro、(2) in vivo、(3) 臨床検体を用いた実験で解析する。

(1) TAZ の内因性発現が高いヒト肺線維芽細胞株である HFL-1 細胞を用いて、siRNA により TAZ をノックダウンし、細胞増殖、遊走、ECM 産生・分解能を解析する。

細胞増殖能は direct cell count で測定する。遊走能はボイデンチャンバーを用いたトランスウェルアッセイで評価する。マトリクス収縮能はコラーゲンゲルコントラクションアッセイで評価する。type I コラーゲンでコートされた硬度の異なるポリアクリルアミドハイドロゲル上で HFL-1 細胞を培養し、TAZ の細胞局在を免疫蛍光染色で調べる。

TAZ の上記機能における分子学的機序を調べるために、TAZ がノックダウンされた HFL-1 細胞から RNA を抽出し、RNA シーケンスを行い、肺線維芽細胞における TAZ 標的遺伝子を同定する。

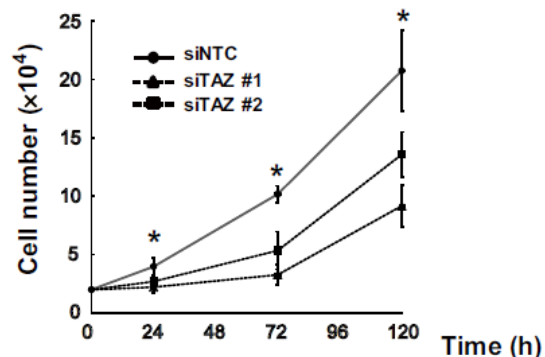
(2) マウスを全身麻酔下に経口挿管し、高圧シリンジに接続したミク口噴霧器を用い

てプレオマイシンの気管内投与を行う。2 週間後、肺組織で Taz の免疫染色を行い、線維芽細胞や肺胞上皮における Taz 発現を解析する。次に、Taz ヘテロノックアウトマウスを用いて実験を行う。プレオマイシン投与 2 週間後、肺組織はホルマリン固定後、HE 染色、Azan 染色を行い、Ashcroft score で肺線維化を評価する。さらに Flexivent を用いた肺エラストランスなどの呼吸機能の評価、Sircol アッセイによる肺のコラーゲンの定量化、肺 RNA・蛋白におけるコラーゲンの発現解析を行う。また、BALF を抽出し細胞成分の解析を行う。

(3) 肺癌及び肺線維症の臨床検体を用いて、CAF や fibroblastic foci などにおける TAZ の発現を免疫組織染色で調べる。 α -SMA の発現も同様に免疫染色で調べ、TAZ との共発現を評価する。

4. 研究成果

(1) HFL-1 細胞において siRNA で TAZ をノックダウンし、まず α -SMA タンパク発現を immunoblot で評価したところ、TAZ ノックダウン群で α -SMA タンパク発現が低下しており、筋線維芽細胞への分化に TAZ が関与していることが示唆された。次に細胞増殖能を評価したところ、TAZ ノックダウン群で増殖能は低下していた。



次にボイデンチャンバーを用いたトランスウェルアッセイおよびスクラッチアッセイで細胞遊走能を調べたところ、TAZ ノックダウン群で遊走能は低下していた。

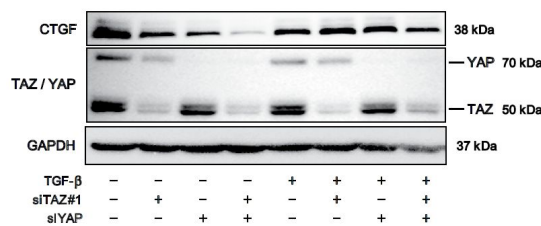
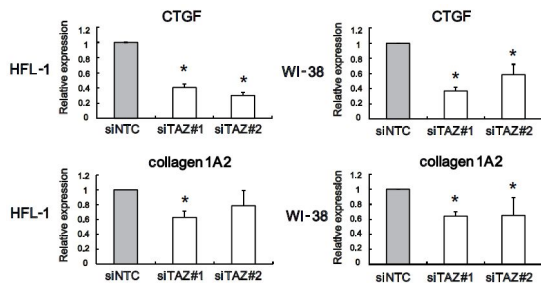
さらにコラーゲンゲルコントラクションアッセイを行い、マトリクス収縮能を評価したところ、TAZ ノックダウン群で収縮能は低下していた。



Hippo pathway は細胞外基質 (ECM) の硬さなどの情報を細胞内に伝えるメカノトランスダクションにおいて重要な役割を果たすことが近年明らかにされている。硬度の異なる

るポリアクリルアミド水ゲル上で HFL-1 細胞を培養し、TAZ の細胞局在を免疫蛍光染色で調べたところ、線維化肺の硬度である 25kPa の水ゲル上では TAZ は核内のみ存在していたが、正常肺の硬度である 0.5kPa の水ゲル上においては核内のみならず細胞質にも TAZ の染色を認めた。このことから線維化肺において ECM の硬度が増すと TAZ の核内移行が促進され、増殖・遊走・ECM リモデリング能が増加し、さらに ECM の硬度が増すという positive feedback 機構の存在が示唆された。

次に上記機能の分子学的機序を探るために TAZ ノックダウン群とコントロール群から RNA を抽出し、RNA-seq による遺伝子発現プロファイリングを行った。2 種類の siRNA で共通する TAZ 標的遺伝子を 94 個抽出し、gene ontology 解析を行ったところ、cell motility や cell migration が上位に挙げられた。その中に CTGF や Col1A2 が存在し、qRT-PCR や immunoblot で再確認した。CTGF は肺線維芽細胞の増殖、遊走、ECM 合成に関わると報告されており、また CTGF は TAZ の direct target であり、TGF- β pathway と協調して発現が促進されることが他の細胞で明らかにされており、肺線維芽細胞においても TAZ が CTGF 発現を抑制し、肺線維化に寄与している可能性が考えられた。



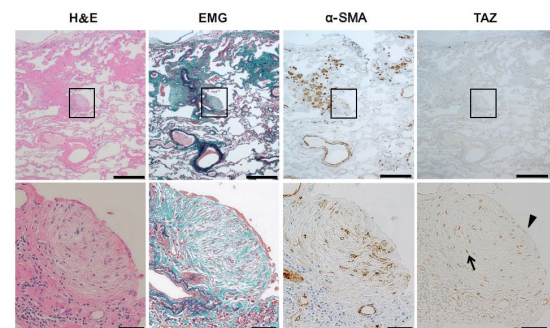
最後に Lung Genomics Research Consortium (LGR) データベースを用いて、間質性肺炎の肺組織における TAZ 発現と肺機能との関連を評価した。TAZ の発現が高いほど、努力肺活量および拡散能が低下することが分かり、TAZ の発現は間質性肺炎の病勢と相関することが示唆された。

(2) 野生型のマウスにミクロ噴霧器を用いてプレオマイシンの気管内投与を行った 2 週間後、肺組織で TAZ の免疫染色を行った。その結果、炎症/線維化部位における肺上皮細胞や線維芽細胞において Taz は高発現してい

た。次に Taz ヘテロマウスを用いて同様にプレオマイシンの気管内投与を行った。2 週間後に抽出した肺組織で Azan 染色を行い、Ashcroft score で肺線維化を評価したが、野生型と Taz ヘテロマウスで有意差を認めなかった。同様に肺エラスタン、肺コラーゲン量、Col1a1 の RNA 発現量、BALF における細胞成分を調べたが、有意差を認めなかった。プレオマイシンの気管内投与による肺炎症/線維化がかなり強く生じてしまったため、マウスの個体差もあり、Taz ヘテロノックアウトの影響が相対的に小さくなってしまった可能性が考えられた。

(3) 肺癌組織で CAF における TAZ の発現を免疫染色で調べたところ、ほとんど全ての CAF に TAZ が高発現していた。そのため、肺癌患者の予後や臨床病理学的パラメーターとの関連を見いだせなかった。

また、特発性肺線維症 (IPF) 患者から得られた肺組織を用いて TAZ の免疫染色を行ったところ、fibroblastic foci の肺線維芽細胞において TAZ は高発現していた。これらの線維芽細胞は α -SMA 発現も高発現しており、筋線維芽細胞としての特性を有していると考えられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

TAZ contributes to pulmonary fibrosis by activating profibrotic functions of lung fibroblasts.

Noguchi S, Saito A, Mikami Y, Urushiyama H, Horie M, Matsuzaki H, Takeshima H, Makita K, Miyashita N, Mitani A, Jo T, Yamauchi Y, Terasaki Y, Nagase T.

Sci Rep. 2017 Feb 14;7:42595. doi: 10.1038/srep42595.

査読あり

[学会発表](計 1 件)

野口 智史 : Hippo pathway の構成因子である TAZ の肺線維症における役割 : 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会 (京都) 2016/4/8

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 智史 (NOGUCHI, Satoshi)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60732807

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()