

令和元年6月11日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18978

研究課題名(和文) マウス生体における細胞競合の普遍性・特異性の解明

研究課題名(英文) Analysis of the generality and specificity of cell competition using an in vivo mouse model

研究代表者

加村 啓一郎 (KAMURA, Keiichiro)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：30604483

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)：肥満は、脂肪細胞を主とした白色脂肪組織の増大に起因する。脂肪細胞の分化の過程で、重要なのが転写因子PPAR $\alpha$ であり、その抑制因子としてTAZがある。TAZの重要性はin vitroの実験では示されていたが、in vivoにおける役割は不明だった。

本研究のマウスは、TazのパラログであるYapを過剰発現しているが、HippoシグナルのフィードバックがYAPを相補的に減少させ、結果的にYAP活性は平常状態に保たれる。しかし、このフィードバックはTAZも抑制するため、脂肪幹細胞におけるTAZ活性の抑制によりPPAR $\alpha$ が活性化され、成熟脂肪細胞への分化促進へとつながり、結果的に脂肪組織が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Yap-Tgマウスが、TAZ抑制による脂肪細胞の分化促進の結果、肥満になることを示した。Yapの過剰発現によって誘導されたHippoシグナルのフィードバックは、脂肪幹細胞においてTAZ活性の減弱化を引き起こす。TAZの抑制によりPPAR $\alpha$ が活性化することで、脂肪細胞の分化を促進し、最終的に脂肪組織の増大へとつながる。

これらの結果により、in vivoにおいてTAZが脂肪細胞の分化に重要であることが明らかになると共に、肥満の治療への見識を得ることもつながった。

研究成果の概要(英文)：Obesity is characterized by an expansion of white adipose tissue mass, which mainly consists of adipocytes. During the differentiation of adipocytes, PPAR $\alpha$  functions as a key transcriptional factor for adipogenesis, and is associated with its suppressive coregulator, TAZ. Previous studies have shown the importance of TAZ in adipogenesis using an in vitro model; however, the understanding of its role in adipogenesis in vivo remains limited. Here, we report a unique obese mouse model that is associated with TAZ downregulation, which arose from the overexpression of Yap, a Taz paralog. YAP activation facilitated Hippo signaling feedback, which induced a compensatory reduction in YAP, subsequently neutralizing its functional activity. This feedback also induced TAZ suppression and exclusion from the nucleus. In Yap transgenic mice, TAZ downregulation in adipose stem cells activated PPAR $\alpha$ , leading to their differentiation into mature adipocytes and consequently increased adipose tissue.

研究分野：発生生物学

キーワード：YAP TAZ Hippoシグナル 脂肪細胞 分化 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究では、Yap 発現細胞をモザイク状に誘導したマウス細胞競合モデルを利用して、マウス発生過程から成体の各組織に至るまで、いつ・どこで細胞競合が起こるのかを広く明らかにし、生体における細胞競合の普遍性・特異性の解明を目指していた。上記目的に沿って、初年度、各組織における細胞競合の有無を調べたが明確な違いは示せていなかった。一方、モザイク状に誘導したマウスのコントロールとして、全身で Yap 発現を誘導したマウスの解析も同時に進めていたところ、新たな表現型として、成体での肥満が観察されたため、初年度後期からはそちらの解析を積極的に進めた。

### 2. 研究の目的

肥満は、脂肪細胞を主とした白色脂肪組織の増大によって起こる。脂肪細胞の分化の過程で、鍵となる働きをするのが転写因子 PPAR $\gamma$  であり、それを抑制的に制御する因子として TAZ が知られている。これまでの知見から、脂肪細胞分化において TAZ が重要な働きをすることが *in vitro* の実験では示されていたが、*in vivo* における役割については明らかになっていなかった。そこで、この課題の解明を新たな研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

この課題の解明に、上記の Yap 発現マウス (以降、Yap-Tg マウス) を活用した。このマウスは、Rosa26 座位より恒常的かつ普遍的に Yap を過剰発現している。しかし、YAP の活性化により Hippo シグナルのフィードバックが起こり YAP の相補的な減少を誘導することにより、結果的に YAP 活性は平常状態に保たれている。一方、このフィードバックは Yap のパラログである TAZ の抑制・核からの排除も引き起こすため、Yap 過剰発現マウスでは、脂肪幹細胞における TAZ 活性の抑制により PPAR $\gamma$  が活性化され、成熟脂肪細胞への分化促進へとつながり、結果的に脂肪組織が増加していた。

### 4. 研究成果

#### (1) Yap-Tg マウスは、脂肪組織が肥大する

私はもともと、細胞競合研究のコントロールとして、全身で Yap を発現するマウス (Yap-Tg マウス) の解析を始めた。Yap-Tg マウスは、発生は正常で、幼少期までは特に目立った表現型は観察されなかった。しかし、8 週齢以降から、コントロールと比較して有意な体重増加が生じた (図 1)。

YAP の活性化は臓器の過増殖につながるということが知られていたことから、その可能性を疑ったが、肝臓を含めた主要な臓器に異常はみられなかった。その代わりに各白色脂肪組織の顕著な増大 (重量比約 3 倍) がみられた。このことから、Yap-Tg マウスは肥満の表現型を示すことが明らかになった。なお、肥満は一般的には、過剰摂食によって生じることから、採餌量を測定したが、コントロールとの違いはみられなかった。

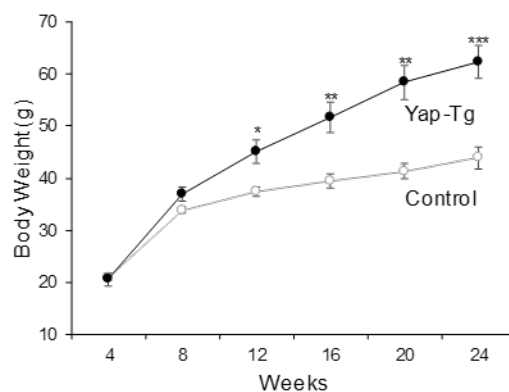


図1. Yap-Tgマウスの体重変化

#### (2) Yap-Tg マウス由来の脂肪細胞では分化が促進している

脂肪組織が増大した原因を調べるために、脂肪細胞マーカー (PPAR $\gamma$ , aP2) の発現を Yap-Tg マウスとコントロールの間で比較した。脂肪組織はそのほとんどが、細胞内に脂肪滴を溜め込んだ成熟脂肪細胞で構成されるが、他に脂肪幹細胞や脂肪前駆細胞などを含んだ間質血管画分 (SVF) と呼ばれる少量の細胞集団も存在する。そこで、SVF と成熟脂肪細胞、それぞれにおいて脂肪細胞マーカーの発現を確認した。すると、SVF において脂肪細胞マーカーの上昇みられた。このことから、Yap-Tg マウスでの脂肪細胞の分化促進が示唆された。

一方、成熟脂肪細胞においては、脂肪細胞マーカーの発現量に変化はみられなかった。さらに、分化後の脂肪細胞特異的に Yap を過剰発現するマウスを作製したところ、体重増加も脂肪組織の増大も生じなかった。これらのことから、Yap の過剰発現は、分化後の脂肪細胞の肥大

には関与しないことが明らかになった。

Yap-Tg マウスでの脂肪細胞の分化促進をより直接的に示すために、*in vitro* の実験をおこなった。SVF 内の脂肪幹細胞を培養し、薬剤処理によって分化誘導をかけた。その結果、Yap-Tg マウス由来の脂肪細胞で有意に分化が促進した ( 図 2 )。

### Primary adipocytes (Day 7)

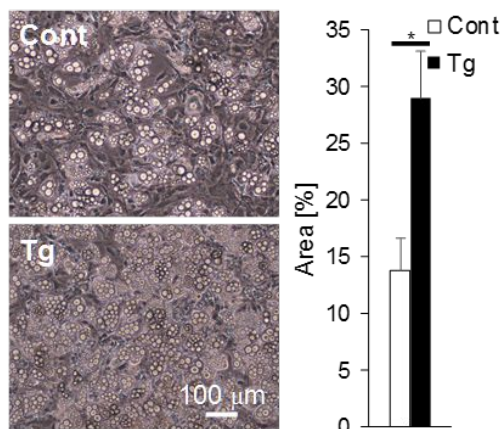


図2. 分化誘導7日後の脂肪細胞

### ( 3 ) 脂肪細胞の分化に YAP は直接関与しない

脂肪細胞の分化における YAP の役割を明確にするために、細胞株に Yap を過剰発現させて、薬剤処理による分化誘導促進の再現を試みた。しかし、Yap 過剰発現細胞株では、むしろ分化が抑制される結果となってしまった。Yap 過剰発現細胞株は過増殖していたので、Yap-target ( 増殖促進因子である *Cyr61*, *Ctgf* ) の発現を確認したところ、たしかに増加していた。一方、Yap-Tg マウス由来の脂肪細胞では、Yap-target の増加がみられなかった。これは、脂肪組織においても同様で、Yap-target の発現は増加していなかった。これらの結果から、Yap-Tg マウスの脂肪細胞では、Yap は過剰発現しているものの、YAP 活性自体は変化していないことが示唆された。

そこで次に、Yap-Tg マウスの脂肪細胞で YAP 活性が抑制されるメカニズムを調べた。まず、Yap の発現量に着目すると、Yap 過剰発現細胞株では非常に高いレベル ( 34 倍 ) にあるのに対して、Yap-Tg マウス由来の脂肪細胞や脂肪組織では穏やかな発現増加 ( 約 2.5 倍 ) に留まっていた。このことから、Yap-Tg マウスの脂肪細胞では、過剰発現している Yap の量が、機能的に YAP を活性化するには不十分であると考えられた。そのメカニズムを検討したところ、最近報告があった Hippo シグナルのフィードバックが関与していることが考えられた。YAP の target 遺伝子には、自身の抑制因子である LATS や NF2 ( Hippo シグナル経路 ) が存在し、負のフィードバックにより、最終的に YAP の活性を抑制することがわかっている。そこで、Yap-Tg マウスにおいてもこの Hippo シグナルのフィードバックが関与していると考え、脂肪組織において、LATS のリン酸化を確認したところ上昇がみられ、結果的に YAP のタンパク質量が定常状態に抑えられていることが確認できた ( 図 3 )。以上のことから、Yap-Tg マウスでは YAP 活性は平常状態に保たれており、脂肪細胞の分化に YAP 自体は直接関与していない、ということが強く示唆された。

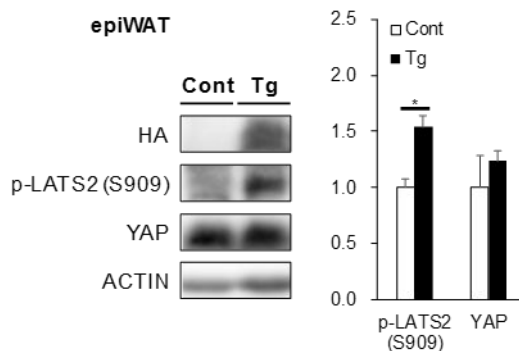


図3. 脂肪組織のウェスタンブロット

### ( 4 ) Hippo シグナルのフィードバックで、脂肪幹細胞における核内 TAZ が減少する

脂肪細胞の分化における Yap 過剰発現の直接的な役割を明らかにするために、Yap のパラログである *Taz* に着目した。なぜなら、TAZ は、脂肪細胞の分化の要となる転写因子 *PPAR $\gamma$*  に結合し抑制する ( 一方、YAP にその働きはない ) ことが知られていたからである。Hippo シグ

ナルのフィードバックは YAP のみならず、TAZ の活性も抑制すると考え、Yap-Tg マウスの脂肪組織において TAZ のタンパク質量を確認したところ、たしかに減少していた。さらに、TAZ の核移行を抑制するリン酸化の上昇も確認できたことから、TAZ の核局在について、脂肪幹細胞の免疫染色で確認したところ、たしかに TAZ が核から排除されていることがわかった(図4)。これらのことから、Yap-Tg マウスでは、Hippo シグナルのフィードバックによって、TAZ のタンパク質量減少とともに、核移行も抑制することで、TAZ の活性が弱められていることが明らかになった。

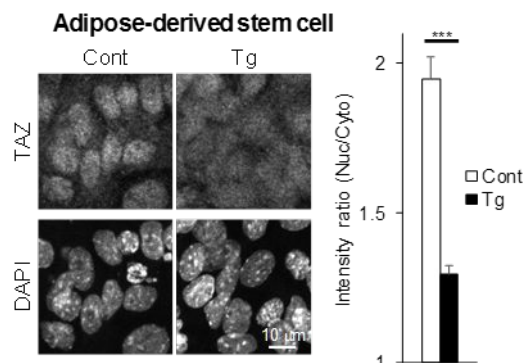


図4. 脂肪幹細胞の免疫染色

(5) まとめ

本研究では、Yap-Tg マウスが、TAZ 抑制による脂肪細胞の分化促進の結果、肥満になることを示した。Yap の過剰発現によって誘導された Hippo シグナルのフィードバックは、脂肪幹細胞において TAZ 活性の減弱化を引き起こす。TAZ の抑制により PPAR $\gamma$  が活性化することで、脂肪細胞の分化を促進し、最終的に脂肪組織の増大へとつながる(図5)。

これらの結果により、*in vivo* において TAZ が脂肪細胞の分化に重要であることが明らかになると共に、肥満の治療への見識を得ることにもつながった。

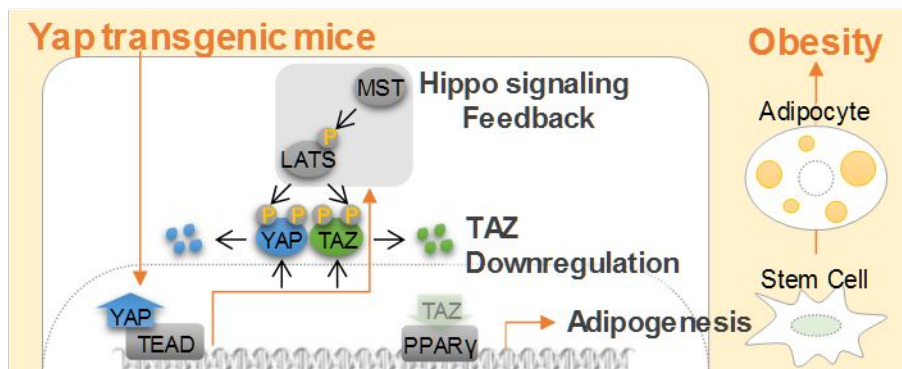


図5. 模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kamura K, Shin J, Kiyonari H, Abe T, Shioi G, Fukuhara A, Sasaki H  
Obesity in Yap transgenic mice is associated with TAZ downregulation  
**Biochemical and Biophysical Research Communications** 査読有  
Vol. 505, 2018, pp. 951-957

竹之下憂祐、加村啓一郎、佐々木洋  
マウス胚線維芽細胞 NIH3T3 を用いた細胞競合モデル系の樹立  
**生体の科学** 査読有  
Vol. 67, 2016, pp. 111-115

〔学会発表〕(計1件)

加村啓一郎、佐々木洋  
脂肪細胞の大きさ制御における Yap/Taz の役割  
ConBio2017、2017

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。