

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19391

研究課題名(和文)メカノストレスの可視化による動脈硬化の病態解明

研究課題名(英文)To determine the relation between Yap transcriptional activity and the rate of atherosclerosis progression

研究代表者

寺井 健太(Terai, Kenta)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20616073

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)：膜性骨化における血管内皮の影響は不明な点が多い。膜性骨化の過程は、血管壁の石灰化を伴う動脈硬化病変で認められ、この機序を明らかにすることは臨床的にも重要である。我々は、血管内皮特異的にYap/Tazの優勢劣性変異体を発現させ、特に膜性骨化に与える影響を解析した。その結果、血流は血管内皮におけるYap/Tazの転写活性を促し、BMPの発現を誘導し、間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化を誘導していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The role of blood vessels during endochondral ossification is well known, while their role in intramembranous ossification, especially the intertissue pathway, is poorly understood. Here, we demonstrate endothelial Yap/Taz is a novel regulator of intramembranous ossification in zebrafish. Appropriate blood flow is required for Yap/Taz transcriptional activation in endothelial cells and intramembranous ossification. Additionally, Yap/Taz transcriptional activity in endothelial cells specifically promotes intramembranous ossification. BMP expression by Yap/Taz transactivation in endothelial cells is also identified as a bridging factor between blood vessels and intramembranous ossification. Furthermore, the expression of Runx2 in pre-osteoblast cells is a downstream target of Yap/Taz transcriptional activity in endothelial cells. Our results provide novel insight into the relationship between blood flow and ossification by demonstrating intertissue regulation.

研究分野：イメージング

キーワード：Hippo pathway 膜性骨化 fluid shear stress

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化は血中脂質の沈着、マクロファージの浸潤、血管内膜の肥厚に始まり、後期にはアテローム変性や血管平滑筋における runx2 依存的な石灰化が誘導され、不可逆性病変を形成する。これら動脈硬化性病変は、主に血管分岐部等の乱流が発生する部位に多く認められる。この解剖学的知見に基づき、乱流によるずり応力 (shear stress) 亢進と動脈硬化病変の因果関係が研究されている。

発生時に種々の細胞は、細胞間・組織間の情報伝達経路を介して、多様な反応を示す。細胞の応答には、増殖、分化、細胞死、細胞運動、などがあるが、培養細胞のような均一な細胞集団とは異なり、細胞間・組織間における情報伝達経路は不明の部分が多い。これらの問題を解決するために、個体発生時における情報伝達経路を可視化し、細胞間・組織間における“cue”となる事象と、その結果引き起こされる形態変化を明らかにしようとしている。

そこで我々は、血流の機械的ストレスが、血管内皮依存的な組織分化・形態形成にどのように関与しているか解析を行った。

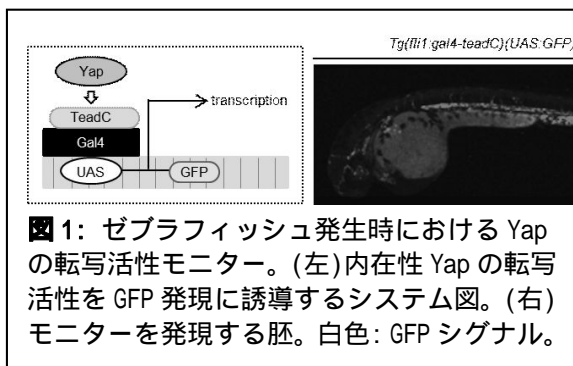
2. 研究の目的

血管内皮における Yap の転写活性亢進が内膜の肥厚化・石灰沈着を引き起こし、ひいては動脈硬化の原因となるという仮説を、モデルマウスを用いて証明する。並行して、Yap の転写活性を抑制する化合物を同定し、その効果を上記のモデルマウスを用いて明らかにする。

3. 研究の方法

まず、モデル生物であるゼブラフィッシュを用いた。ずり応力 (shear stress) 依存的な Yap の活性化を確認するために、血管内皮特異的な Yap の転写活性の可視化を行った。次に、上記の血管において Yap の転写抑制を行い、その表現型と骨分化に与える影響を検討した。

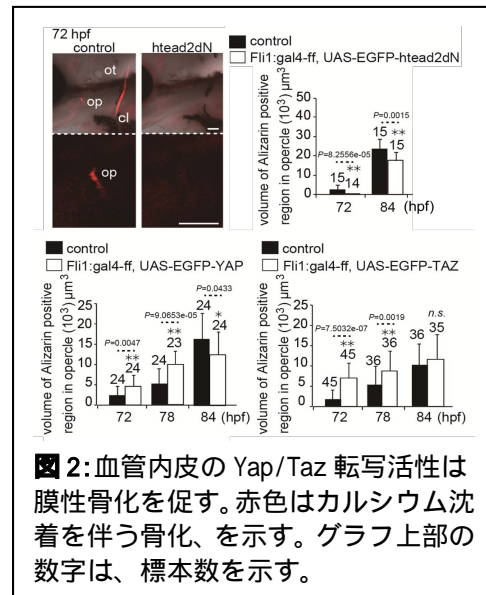
4. 研究成果



(1) 血管内皮特異的に Yap の転写活性をモニターするゼブラフィッシュの作製

図 1 の如く、Gal4/UAS システムを用いて、血管内皮特異的に Gal4-TeadC を発現させ、内在性 Yap の転写活性依存的に GFP を転写する系を構築した。

(2) 血流は血管内皮における Yap/Taz の転写活性を促し、間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化を誘導している。



血管内皮において Yap の優勢劣性変異体を発現させたところ、膜性骨化の遅延が認められた (図 2)。この結果を確認するために、Yap/Taz を血管内皮に強制発現させたところ、膜性骨化を促す結果を得た。これらの結果は、膜性骨化の初期発生を血管内皮の Yap/Taz 転写活性が制御している事を示している。

上記の変化は、初期の膜性骨化では認められたが、受精後 4 日では変化は認められなくなる。そこで我々は膜性骨化の前段階に対して Yap/Taz の転写活性の影響があると考えた。膜性骨化は間葉系幹細胞から前骨芽細胞、骨芽細胞、カルシウム沈着を伴う骨化、という過程が知られている。それぞれの分化過程において指標となる遺伝子に対し、mRNA の発現を解析した。その結果、間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化を、血管内皮における Yap/Taz が促すことが明らかとなった。また、この分化は血流量低下により遅延した。更に、分化には血管内皮由来の BMP (Bone Morphogenetic Protein) が必須であり、BMP 発現は Yap/Taz 依存的であることが明らかとなった。

以上の事から、血流は血管内皮における Yap/Taz の転写活性を促し、BMP の発現を誘導し、間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化を誘導していることが明らかとなった。

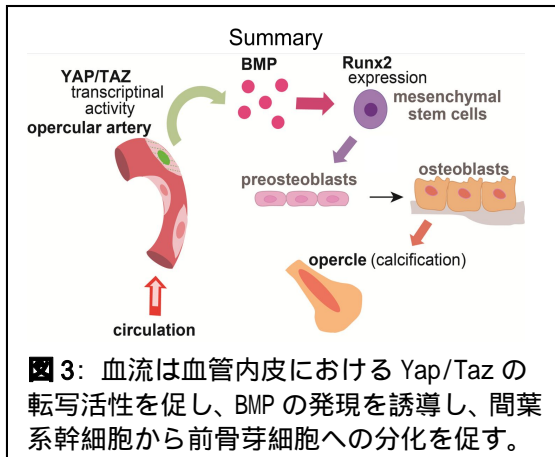


図3: 血流は血管内皮における Yap/Taz の転写活性を促し、BMP の発現を誘導し、間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化を促す。

(3)大血管における退縮過程には、血流依存的な Yap/Taz 転写活性化が必要である。

血管形成時における Yap/Taz の機能を知るために、それらの転写活性抑制が、どのような形態変化を引き起こすか検討した。方法は Zebrafish を用いて血管内皮特異的に優勢劣性変異体を強制発現させた(図4)。その結果、尾部静脈叢(CVP)に血管の退縮不良が確認された。この結果は、Yap/Taz の転写活性が血管の退縮に働いている事を示唆している。また、Yap/Taz の転写活性亢進させるものとして、血流量・血圧が関与する事が確認された。下流因子としては Yap/Taz 転写活性依存的に ctgf (connective tissue growth factor) の発現と actin の重合が起こり、これらが血管退縮に必須であることが明らかとなった。

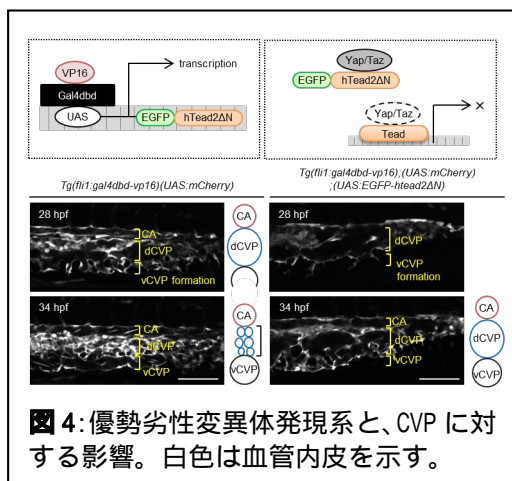


図4: 優勢劣性変異体発現系と、CVP に対する影響。白色は血管内皮を示す。

更に、同様の情報伝達経路が哺乳類でも保存されているか確認するために、マウスの動脈管に着目した。動脈管は胎生期に特徴的な血管であり、生後数時間で退縮するため大血管の退縮過程のモデルとして広く用いられてい

る。動脈管での血管内皮における Yap の挙動は、生後数時間では核内に存在し、生後1日では核外に存在していた(図4)。Yap の転写活性は、その核内局在とよく相関する事が知られており、これらの結果から、動脈管の閉鎖時に Yap の転写活性が上昇していることが示唆された。

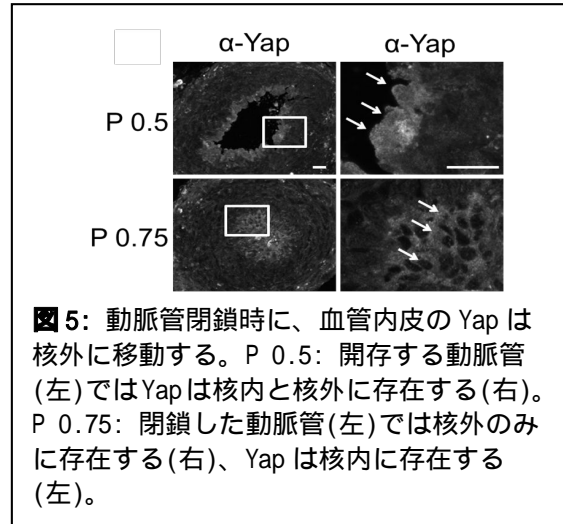


図5: 動脈管閉鎖時に、血管内皮の Yap は核外に移動する。P 0.5: 開存する動脈管(左)では Yap は核内と核外に存在する(右)。P 0.75: 閉鎖した動脈管(左)では核外のみ存在する(右)、Yap は核内に存在する(左)。

以上の事から、大血管における退縮過程には、血流依存的な Yap/Taz の転写活性による ctgf の発現と actin の重合が必須であることが明らかとなった(図5)。

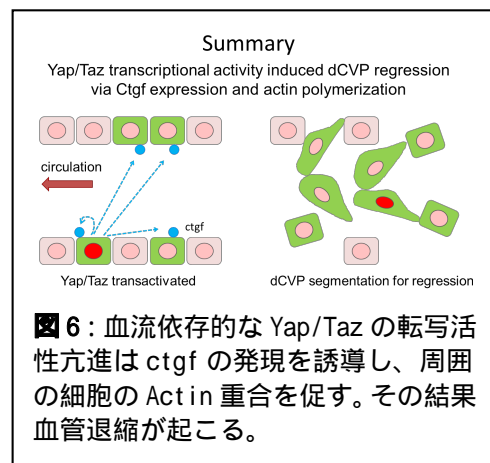


図6: 血流依存的な Yap/Taz の転写活性亢進は ctgf の発現を誘導し、周囲の細胞の Actin 重合を促す。その結果血管退縮が起こる。

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)

Konagaya Y, Terai K, Hirao Y, Takakura K, Imajo M, Kamioka Y, Sasaoka N, Kakizuka A, Sumiyama K, Asano T, Matsuda M. A highly sensitive FRET biosensor for AMPK exhibits heterogeneous AMPK responses among cells and organs. Cell Reports. Accepted.

Nagasawa-Masuda A, Terai K. Yap/Taz transcriptional activity is essential for vascular regression via Ctgf expression

and actin polymerization. PLoS One. 2017;12(4):e0174633.

Nakajima H, Yamamoto K, Agarwala S, Terai K, Fukui H, Fukuhara S, Ando K, Miyazaki T, Yokota Y, Schmelzer E, Belting HG, Affolter M, Lecaudey V, Mochizuki N. Flow-Dependent Endothelial YAP Regulation Contributes to Vessel Maintenance. Dev Cell. 2017 Mar 27;40(6):523-536.e6.

Chiba A, Watanabe-Takano H, Terai K, Fukui H, Miyazaki T, Uemura M, Hashimoto H, Hibi M, Fukuhara S, Mochizuki N. Osteocrin, a peptide secreted from the heart and other tissues, contributes to cranial osteogenesis and chondrogenesis in zebrafish. Development. 2017 Jan 15;144(2):334-344.

Li C, Imanishi A, Komatsu N, Terai K, Amano M, Kaibuchi K, Matsuda M. A FRET Biosensor for ROCK Based on a Consensus Substrate Sequence Identified by KISS Technology. Cell Struct Funct. 2017 Jan 11;42(1):1-13.

Nagasawa-Masuda A, Terai K. ERK activation in endothelial cells is a novel marker during neovasculogenesis. Genes Cells. 2016 Nov;21(11):1164-1175.

Uemura M, Nagasawa A, Terai K. Yap/Taz transcriptional activity in endothelial cells promotes intramembranous ossification via the BMP pathway. Sci Rep. 2016 Jun 7;6:27473.

〔雑誌論文〕(計 3件)

寺井健太 (2017)「リン酸化酵素とGタンパク質のFRETバイオセンサー」生体の科学 (Vol.68 No.5 450-451)

寺井健太、松田道行 (2017)「FRETイメージングを用いたシグナル伝達の可視化 分子活性と細胞機能を顕微鏡で観る技術」医学のあゆみ(Vol.262 No.5 559 565)

寺井健太、松田道行 (2018)「蛍光生体イメージングの最前線」月刊細胞(Vol.50 No.3 144 145)

〔学会発表〕(計 2件)

生体組織における代謝制御機構の可視化、口頭、寺井健太、平成29年度「先端モデル動物支援プラットフォーム」成果発表会、

2018/1/25、滋賀県琵琶湖ホテル

Terai K. Visualization of transcriptional activities in living fish The 1st ABiS Symposium 2017 Feb. Okazaki.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺井 健太 (TERAI, Kenta)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号： 20616073