様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　６ 月 １８ 日現在

機関番号：１５５０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2017～2018
課題番号：１７Ｋ１９７０１

研究課題名（和文）生体の物理特性を反映する革新的組織培養法の開発

研究課題名（英文）A novel tissue culture system recapitulating in vivo physical properties

研究代表者
清木　誠（SEIKI, MAKOTO）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：５０２２６６１９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,900,000円

研究成果の概要（和文）：通常の2次元培養では、生体の1000倍以上の力で細胞が進展されYAPの異常な活性化で増殖・分化が促進されるため生体を反映していない。生体組織の物理特性を反映した培養系を開発するために、ポリイミド多孔質膜を用いて眼球の角強膜繊維柱帯(TM)細胞のprimary細胞を培養した。生体での網目構造に近い構造をとり1年以上の安定な長期培養に成功した。YAPの発現は生体を反映し、炎症性サイトカインだけではYAP発現の異常が起こらないことを確認した。慢性炎症において、炎症性サイトカインと物理特性異常の相乗効果で、異常なYAP活性化が分子メカニズムを明らかにするため、Split BioID解析系も確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
体内で全ての細胞は3次元で存在し、形や硬さなどの独自の物理特性を持つ。細胞の物理特性にHippo-YAPシグナル系が敏感に応答し細胞の増殖・分化を緻密に制御しており、破綻するとがんや慢性炎症を引き起こす。私たちが見出したYAPメカノホメオスター シスを指標にして、生体の物理特性を反映した長期細胞培養系の開発に成功した。並行して樹立したSplit-BioID解析系を用いて、慢性炎症における炎症性サイトカインと物理特性の相乗効果の分子メカニズムを解明する。本解析系は、緑内障の眼圧亢進状態を細胞培養系で再現し、病態メカニズムの解明や創薬のプラットフォー ムとして有用である。

研究成果の概要（英文）：Conventional 2D cell culture does not precisely reflect in vivo situation because cells are stretched more than 1000 folds as compared in vivo activating YAP causing aberrant cell proliferation. We developed a polyimide multi-pore membrane based 3D culture system. Intriguingly, we succeeded in culturing ocular trabecular meshwork cells longer than 1 year maintaining its meshwork structure. We confirmed this culture is closer to the in vivo situation by YAP expression and unresponsive to inflammation cytokines. We also established the Split-BioID analysis system to reveal the molecular mechanism underlying the synergistic action of inflammatory cytokines and aberrant mechanical properties of tissues upon YAP target genes.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：メカノホメオスターシス　YAP　角強膜線維柱帯細胞　炎症性サイトカイン

１．研究開始当初の背景

私たちの体内で、全ての細胞は 3 次元で存在し形や硬さなどの独自の物理的な特性を持っ ている。最近、細胞の物理特性が、臓器の生理機能と病態発症に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。特に臓器の大きさを制御する Hippo-YAP シグナル系は、細胞の物理特性に敏感に応答し、細胞の増殖・分化を緻密に制御しており、破綻するとがんなどの病態を引き起こす。しかし、従来の 2 次元細胞培養は、細胞が体内の 1000 倍以上に引き延ばされ YAP が持続的に活性化するために、細胞増殖が促進した状態の解析である。抗がん剤の感受性も生体よりも 10 倍高いために、２次元培養実験の解釈に注意が必要である。私たちは 組織の物理特性をモニターするだけでなく調整するメカニズムを初めて見出し YAP メカノホメオスター シスと名付けた(Porazinski *et al.*, Nature, 2015)。

２．研究の目的

私たちは、生体において組織の物理特性をモニターし制御するメカニズムを見出し、YAP メカノホメオスターシスと名付けた。そこで本研究では、YAP メカノホメオスターシスを活用して、生体の物理特性を正確に反映した細胞培養実験系のプロトタイプを開発する。更に、このシステムを用いて慢性炎症を再現し、その分子メカニズムの一端を明らかにする。

３．研究の方法

（1）*in vitro* での眼圧調整機能の解析モデルの開発

本研究では、より生体に近い物理条件で角強膜線維柱帯細胞 （Trabecular meshwork cell ; TM 細胞）の網目構造を構築することで生体での眼圧調整機能の再現を試みる。①合成多孔膜上で TM 網目構造を形成する方法で細胞を培養し YAP の活性化(核移行)をモニターしながら細胞外基質の硬さを調節することで、生体に近い物理特性を再現する。②作成した TM 細胞網目構造を用いて房水フローシステムを作成する。Syringe Pump により圧力をかけ水圧をモニターする。

（2）メカノホメオスターシス破綻系の作成

上記の房水フローシステムを使って慢性炎症による眼圧上昇の系を作成する。①慢性炎症で細胞外マトリクスが硬化することから、(1) より硬いコラーゲンの多い細胞外マトリクスを用いて TM 細胞網目構造を作成する。②慢性炎症で上昇する炎症性サイトカイン（TGF-β, TNF-α, IL–1βなど）を加え、①と②が相乗的に働いて恒常的な水圧の上昇が起こる条件を最適化する。その際に、緑内障で見られる持続的な YAP の核移行が見られるかどうかを確認する。

（3）メカノホメオスターシス破綻の分子メカニズムの解析

(2) で確立したメカノホメオスターシス破綻の *in vitro* 解析系を用いてその分子メカニズムを明らかにする。上記のように(1),(2)の２段階の分子メカニズムを想定している（図 6）。

①炎症性サイトカインにより細胞外基質の硬度を上げる CTGF の分泌が上昇するメカニズムの同定：

TGF-βの下流で、標的遺伝子の転写を制御する SMAD2/3 及び SMAD4 が YAP に結合し、YAP の転写活性化を増幅するだけでなく、未知の蛋白が関与している可能性もある。そこで、YAP の標的遺伝子 CTGF のプロモーター領域に結合している YAP の蛋白を最近開発された enChIP 法を用いて解析する。更に、同定する分子の結合により CTGF プロモーター活性が増幅されていることをルシフェラーゼレポーターを用いて解析する。

②①によって引き起こされる細胞外基質の硬化がある段階でネガティブフィードバックによ

る軟化ができなくなり持続的な YAP の活性化が起こる可能性の検証。

［1］①の炎症性サイトカインの添加により起こる YAP の活性化が一時的でなくなるかどうかさまざまな期間炎症性サイトカインを添加し調べる。YAP の活性化が一時的な場合と、持続的になった場合で細胞外基質の構造の違いを電子顕微鏡で解析する。

［2］軟化が起こらない合成細胞外基質を用いて TM 細胞網目構造を作成し、持続的な YAP の活性化が起こるかどうか検証する。

以上の解析により、緑内障への YAP メカノホメオスターシスの寄与を明らかにする。

４．研究成果

（1）*in vitro* での眼圧調整機能の解析モデルの開発

TM 細胞の primary culture は可能であるが、トランスフォーメーションをせずに長期培養は困難であると考えられてきた。私たちは、さまざまな培養条件を検討した結果、ポリイミド合成多孔膜上を用いることで本来の TM 細胞が持つ網目構造に似た形態を形成し、特殊な培養液を使わずに１年以上にわたる長期培養を可能にした(図 1) 。

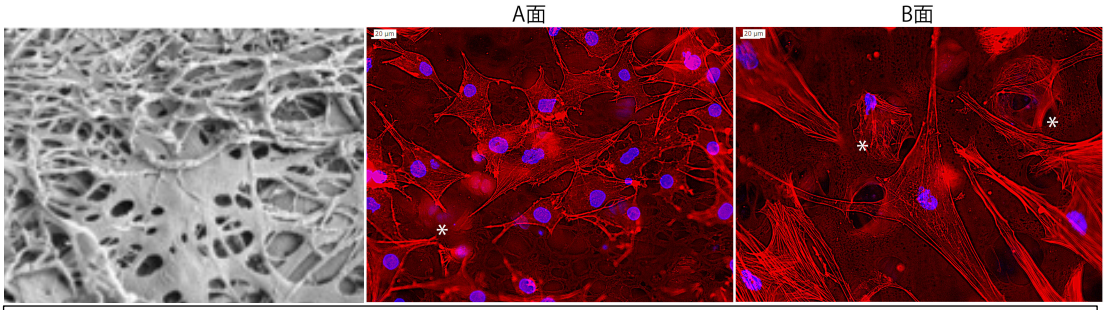

図１：ポリイミド合成多孔膜を用いたヒト TM 細胞、(左)A 面、(中)B 面(裏面)、(右)実際の TM 細胞(走査電顕像)を示す。(赤：ファロイジンで F-actin、(青)DAPI で核を染色。

生体に近い物理特性を再現するために、YAP の活性化(核移行)を解析した(図２)。細胞密度が低い時は、YAP は核に存在したが、密度が高くなるにつれて細胞質に移動した。

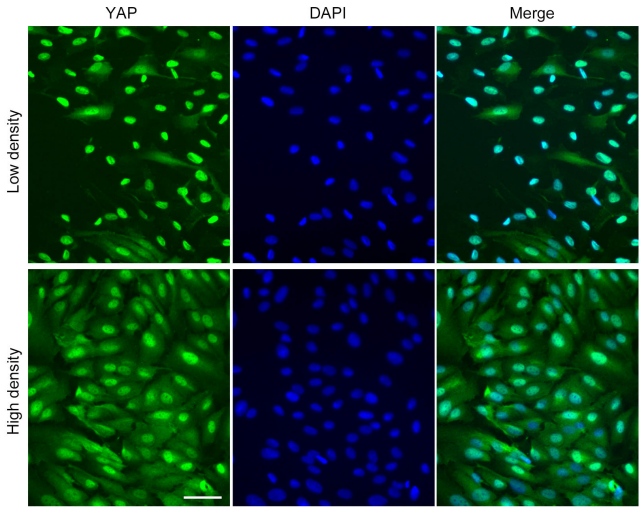

図 2: YAP 活性化の判定：合成多孔膜を用いたヒト TM 細胞の YAP 抗体による免疫染色、(左)Y(中)DAPI、(右)重ね合わせ。細胞が高密度になると YAP の一部が細胞質に移動する。

作成した TM 細胞網目構造を用いた房水フローシステムの作製

合成多孔膜を用いているために、培養液漏れが起こりやすい。そのため、Syringe Pump により圧力をかけ水圧をモニターするさまざまな方法を現在検討中である。

（2）メカノホメオスターシス破綻系の作成

当初は、①慢性炎症で細胞外マトリクスが硬化することから、(1) より硬いコラーゲンの多い細胞外マトリクスを用いて TM 細胞網目構造を作成する。②慢性炎症で上昇する炎症性サ

イトカイン(TGF-β, TNF-α, IL–1β)を加え、①と②が相乗的に働いて恒常的な水圧の上昇が起こる条件を最適化する計画であった。しかし、ポリイミド合成多孔膜は、硬度の調節ができない。そのため、多孔の穴のサイズを小さくすることにより、水圧を上げることができるのではないかと考え、そのような多孔膜を作成中である。

次に②の慢性炎症で上昇する炎症性サイトカインについて検討を行った。

ポリイミド合成多孔膜培養 TM 細胞に、物理的刺激なしで炎症性サイトカイン(TGF-β1, 2, TNF-α, IL–1β)を加え、筋繊維芽細胞への分化が起こせるかどうかを解析した(図 3,4)。炎症性サイトカインのみでは、そのような反応を誘起できないことが判明した。

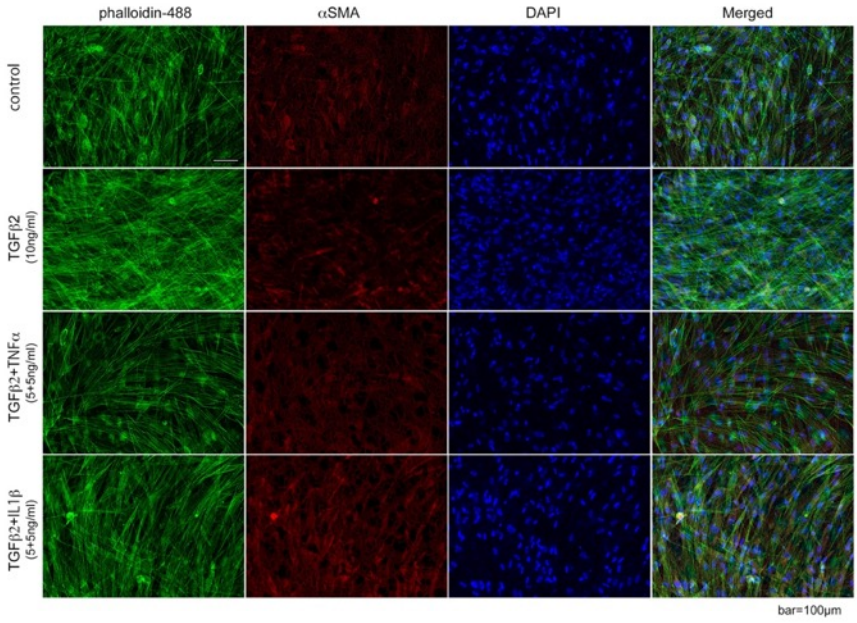

図 3: 炎症性サイトカインによる線維化誘起の解析 1: 合成多孔膜を用いたヒト TM 細胞に炎症性サイトカインを加え、筋繊維芽細胞への分化を αSMA 抗体と F-actin(phalloidin 染色)で検出した。

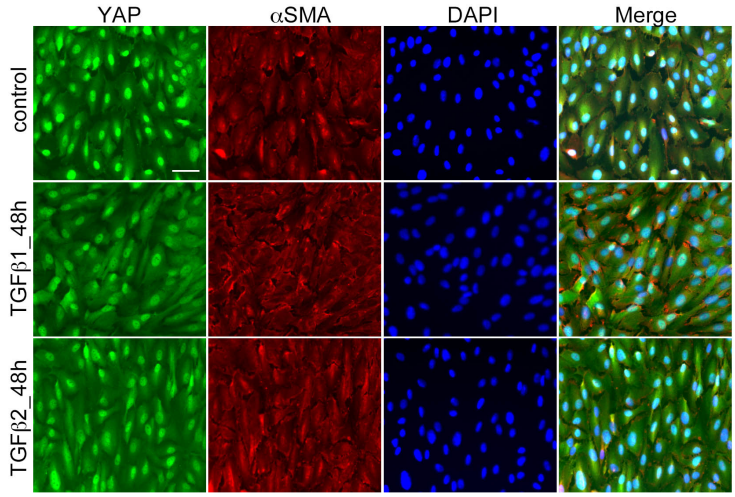

図 4: 炎症性サイトカインによる線維化誘起の解析 2: 図 3 と同様な解析系で、YAP, αSMA の抗体染色を行った。TGF-β1, β2 では、筋繊維芽細胞への分化や YAP の活性化は見られなかった。

(3) メカノホメオスターシス破綻の分子メカニズムの解析

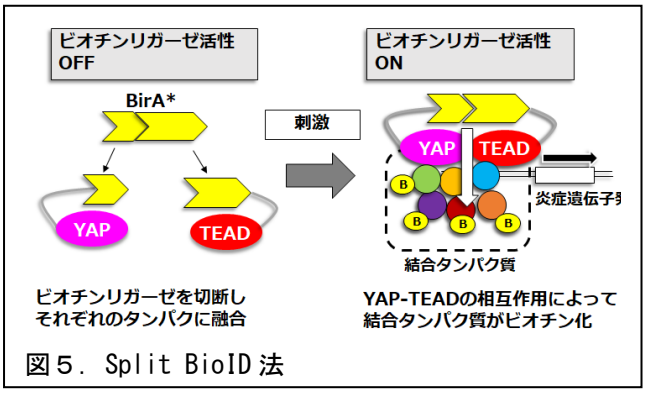

図５. Split BioID 法

物理刺激と炎症が相乗的に働くとメカノホメオスターシスが破綻し症状が悪化するメカニズムを明らかにするため、この２つの同時の刺激により YAP 標的遺伝子のプロモーターで蛋白複合体が形成され転写が起こるとの作業仮説を立てた。プロモーターにおける YAP との蛋白複合体を同定するため、Split BioID システムの構築を行った(図５)。このシステムでは、Split BioID

法では、大腸菌の活性型ビオチンリガーゼ BirA*を分断し、分断した断片に YAP 及び TEAD を結合させ、YAP が転写因子 TEAD に結合したときのみに YAP-TEAD と複合体を作る蛋白がビオチン化される。

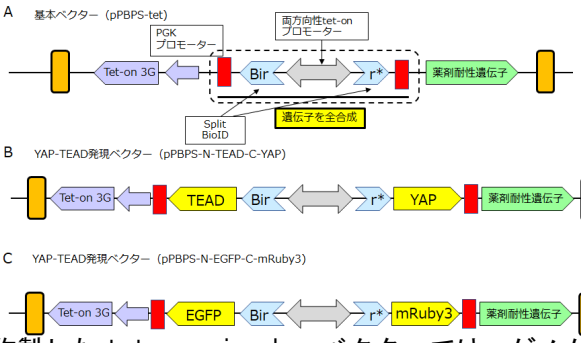

図６．作製した tet-on piggybac ベクターでは、ゲノムへ導入後 doxycycline 添加によって Split Bioid と融合した遺伝子発現が両方向に起こる

本システムの構築のために、Split BioID 用の Tet-On の piggybac system の基本ベクター(図６A) を作製した。ネガティブコントロール用として EGFP、mRuby3 蛍光タンパク質を発現するベクター、YAP、TEAD を発現するベクターを作製した（図６B、C)。

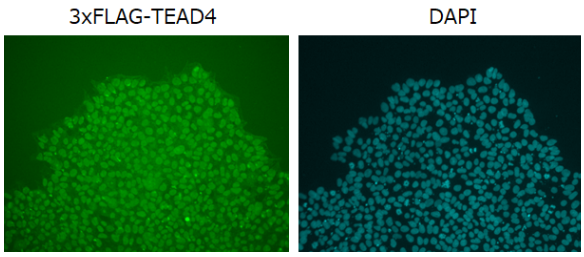

図７．AAVS1 のゲノムに、CRISPR/Cas9TEAD4 遺伝子を導入し、薬剤で選択した。薬剤選択後、doxycycline で TEAD4 の発現を誘導し、FLAG 抗体で検出した。

作製したベクターを iPS 細胞などの細胞へ導入するために、プラスミド DNA を piggybac システムでトランスフェクションしたが、iPS 細胞では epigenetic な制御が他の細胞より強いことなどから、ゲノムへのランダムな挿入では導入遺伝子の発現がうまくいかないことが分かった。そこで、安定的に遺伝子発現が起こる AAVS1 遺伝子座にプラスミドを導入するためにゲノム編集を行った。TEAD4 のみを発現するベクターに CRISPR/Cas9 で切断するサイトを導入し、ヒト iPS 細胞へトランスフェクションし、薬剤によって選択をかけ、遺伝子発現を誘導したところ、均一な遺伝子発現が観察された。このことから、CRISPR/Cas9 を使い、Split BioID プラスミドを iPS 細胞へ導入することができる系を確立した。

現在、作製した Split BioID ベクターに CRISPR/Cas9 で切断できる AAVS1 サイトを導入を試みている。プラスミド DNA が作製できれば、ウイルスを使わずにゲノム編集のみで Split BioID ベクターを iPS 細胞へ導入することができる。この解析系により、炎症と物理特性との相乗作用の分子メカニズムを明らかにできると考える。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）

①Studying YAP-Mediated 3D Morphogenesis Using Fish Embryos and Human Spheroids.
Asaoka Y, Morita H, Furumoto H, Heisenberg CP, **Furutani-Seiki M**. Methods Mol Biol. 2019;1893:167-181. doi:10.1007/978-1-4939-8910-2_14 (**査読無し**)

〔学会発表〕（計１件）

① 招待講演
清木 誠 YAP is essential for 3D body formation withstanding gravity 日本発生生物学会ワークショップ, 2019

〔図書〕（計１件）

①重力拮抗遺伝子 YAP による三次元臓器形成メカニズム（北川 孝雄・古谷一清木 誠 他）
月刊「細胞」2018 年 10 月臨時増刊号 50(12) 532-535

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：木村　和博

ローマ字氏名：KIMURA, Kazuhiro

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8 桁）：60335255

研究分担者氏名：浅岡　洋一

ローマ字氏名：ASAOKA, Yoichi

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学研究科

職名：講師

研究者番号（8 桁）：10436644

研究分担者氏名：北川　隆雄

ローマ字氏名：KITAGAWA, Takao

所属研究機関名：山口大学

部局名：大学院医学研究科

職名：助教（特命）

研究者番号（8 桁）：20614928

(2)研究協力者

なし

※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。