

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06703

研究課題名(和文) Hippo経路関連分子YAP1の制御破綻に基づく動脈硬化の病態機序の解明

研究課題名(英文) The role of Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP1 in the pathogenesis of Atherosclerosis

研究代表者

高栗 郷 (TAKAGURI, AKIRA)

北海道科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：90623710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo経路に制御されるyes-associated protein (YAP)1は、血管平滑筋細胞の生死を制御している。平滑筋特異的YAP1ノックアウトマウス(YAP1-KOマウス)を用い、動脈硬化の進展に及ぼすYAP1の役割について検討した。YAP1-KOマウスは、野生型に比べ、血管障害に誘発される内膜肥厚形成が抑制されることを見出した。また、YAP1の活性化は、Aktの活性化を介して細胞増殖を引き起こすことを見出した。したがって、YAP1は動脈硬化形成において、重要な役割を持ち、治療薬のターゲットになる可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、血管平滑筋細胞のYAP1が、内膜の障害により生じる内膜肥厚形成に重要な働きをすること、その機序としてAktの活性化に影響を与えることを明らかにした。本研究の成果は、YAP1が動脈硬化の形成・進展に重要な役割をもつことを示唆するものであり、これら疾患に対する新たな治療戦略を提唱に繋がる所見と考えられる。また、将来的には、YAP1の活性化と関連する疾患、がん、関節リウマチなどの疾患への応用展開に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Yes-associated protein (YAP)1 is regulated by Hippo pathway, which controls cell survival and cell death in vascular smooth muscle cells. In this study, we investigated the role of YAP1 on the progression of atherosclerosis using a smooth muscle specific YAP1-KO mouse. Smooth muscle specific YAP1-KO mice showed decreased neointima formation induced by injury in carotid artery. Also, activation of YAP1 causes cell proliferation mediated by the phosphorylation of Akt in vascular smooth muscle cells. Accordingly, it suggests that YAP1 is a critical molecules for the pathogenesis of atherosclerosis.

研究分野：薬理学

キーワード：動脈硬化 血管平滑筋細胞 YAP1 炎症 内膜肥厚

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Yes-associated protein (YAP)1 は、MTS1/2 および LATS1/2 に代表されるセリン/トレオニンキナーゼからなる Hippo 経路により制御を受ける転写共役因子である。Hippo 経路の不活化により、YAP1 は活性化され、核へと移行する。活性化された YAP1 は、転写因子である TEAD と複合体を形成し、様々な遺伝子の発現を制御する。動脈硬化形成における YAP1 の役割は不明であったが、我々は YAP1 が血管平滑筋細胞の増殖および細胞死を制御する重要な分子であることを見出し、YAP1 が動脈硬化形成において重要な働きをもつ可能性が示唆された。しかしながら、動脈硬化形成過程における YAP1 の生理的意義やそのメカニズムについては明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、動脈硬化の進展における YAP1 の生理的意義を明らかにすることを最終的な目的とし、具体的には以下の点について検討した。

- 1) 平滑筋特異的 YAP1 ノックアウトマウスを用い、内膜障害に誘発される内膜肥厚形成に、YAP1 が寄与しているのかを検討する。
- 2) 動脈硬化形成の基盤にある炎症に対する YAP1 の影響を検討する。
- 3) YAP1 による内膜肥厚形成(血管平滑筋細胞の増殖)の機序について検討する。

### 3. 研究の方法

- 1) Myh11-CreER<sup>T2</sup> マウスと YAP1 flox マウスを交配させ、YAP1<sup>fl/fl</sup>:Myh11-cre/ERT2 マウスを作出した。5 週齢のマウスにタモキシフェン投与し、平滑筋特異的 YAP1 ノックアウトマウスを作製した。タモキシフェンを溶解させたコーンオイルのみを投与したマウスをコントロールとした。内膜肥厚モデルマウスの作製は、8 週齢の雄性の左総頸動脈の、左内頸動脈と左外頸動脈への分岐部で、6-0 の絹糸を用いて総頸動脈を完全結紮した。28 日後、血管を採取し、パラフィン切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、内膜肥厚の程度を検討した。
- 2) 胸部大動脈から単離した血管平滑筋細胞を用い、siRNA により YAP1 をノックダウンした。また、平滑筋特異的 YAP1 ノックアウトマウスから採取した血管を RNAlater 中に保存した。これらの細胞ならびに組織を用いて、RNA の抽出および逆転写反応を行い、炎症性サイトカインの発現量を real time RT-PCR により解析した。
- 3) 野生型 YAP1、恒常的活性化型 YAP1(YAP1-5SA)、およびコントロールとして GFP のアデノウイルスを作製し、血管平滑筋細胞に一過性に過剰発現させた。また、感染させた細胞の培養上清を正常な血管平滑筋細胞に移すトランスファー実験を行った。細胞増殖を MTS アッセイ、増殖シグナル分子として Akt をウエスタンブロットングにて検出した。

### 4. 研究成果

1) 平滑筋特異的 YAP1 ノックアウトマウス(YAP1-KO) およびコントロールマウスの総頸動脈結紮後 28 日の内膜肥厚形成について観察したところ、YAP1-KO マウスはコントロールに比べ、内膜肥厚形成が抑制されることが明らかになった。我々の in vitro の結果においても、YAP1 のノックダウンにより、血管平滑筋の増殖を抑えられたこと踏まえると、YAP1 は内膜肥厚形成(動脈硬化の進展)に寄与する重要な分子であることが示唆される(図 1)。

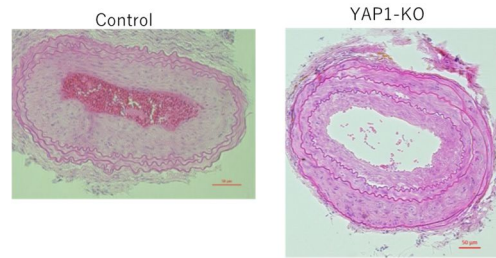


図1. YAP-KOマウスは、内膜肥厚形成が抑制される。

2) 血管平滑筋細胞を用い、YAP1 をノックダウンすると、TNF- $\alpha$  による interleukin(IL)-6 mRNA 発現を増加させた。このことから、YAP1 は炎症応答を抑制する可能性が示唆され、今後詳細な検討が必要である。また、総頸動脈結紮後 28 日後の血管では IL-6 発現には変化が認められず、炎症が落ち着いている状態にあることが、変化がなかった原因の一つであると考えられ、結紮後早いタイミングでの炎症応答に対する YAP1 の生理的役割を今後検討する必要がある(図 2)。

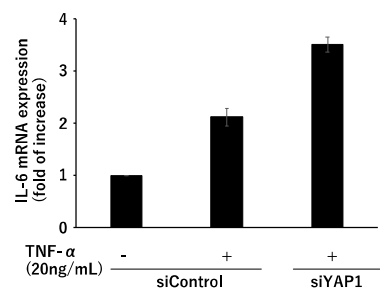


図2. YAP1のノックダウンは、炎症応答を増大させる。

3) YAP1-5SA を過剰発現させた細胞においては、GFP コントロールおよび野生型 YAP1 に比べ、細胞増殖および Akt のリン酸化が増加することが明らかになった。この培養上清を、正常な血管平滑筋細胞に移したところ、Akt のリン酸化が他に比べ顕著に増加した。このことから、YAP1 による細胞増殖は、Akt の活性化ならびに細胞外分泌タンパク質を介した間接的な増殖シグナルの亢進が関与することが示唆される(図 3)。

今後の展望として、上記結果をより強固なものとし、動脈硬化形成に関わる YAP1 の役割と、YAP1 が創薬ターゲットとなりうるのかを検討していきたい。

また、腹部大動脈を含む心血管疾患に対象を広げ、YAP1 の役割を検討していきたい。

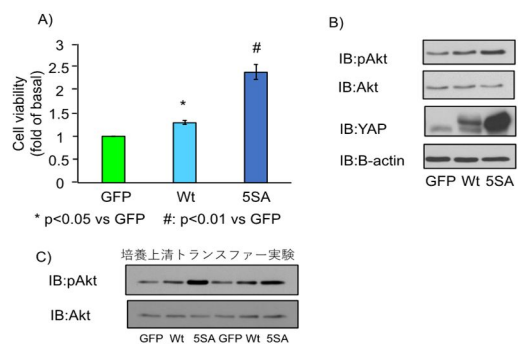


図3. YAP1の活性化は、Aktのリン酸化を亢進させる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Takaguri Akira, Sasano Jun, Akihiro Oomiya, Satoh Kumi  | 4. 巻<br>872                   |
| 2. 論文標題<br>The role of circadian clock gene BMAL1 in vascular proliferation   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>European Journal of Pharmacology  | 6. 最初と最後の頁<br>172924 ~ 172924 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ejphar.2020.172924  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Takaguri Akira, Akihiro Ohmiya, Sasano Jun, Satoh Kumi  | 4. 巻<br>44                    |
| 2. 論文標題<br>Involvement of Yes associated protein 1 (YAP1) in doxorubicin induced cytotoxicity in H9c2 cardiac cells   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Cell Biology International  | 6. 最初と最後の頁<br>873 ~ 881       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/cbin.11285  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Wakame Koji, Takahata Muneaki, Miyake Yasuyoshi, Yasuda Eri, Shimomiya Yoshie, Nakata Akifumi, Sato Keisuke, Mihara Yoshihiro, Takaguri Akira, Komatsu Ken-ichi | 4. 巻<br>10                    |
| 2. 論文標題<br>Metabolomic analysis of SMP30/GNL knockout mice treated with fermented vegetable and fruit extract (OM-X?)   | 5. 発行年<br>2020年               |
| 3. 雑誌名<br>Functional Foods in Health and Disease  | 6. 最初と最後の頁<br>95 ~ 95         |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.31989/ffhd.v10i3.674   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>UCHIYAMA HIRONOBU, KOMATSU KEN-ICHI, NAKATA AKIFUMI, SATO KEISUKE, MIHARA YOSHIHIRO, TAKAGURI AKIRA, NAGASHIMA TAKAYUKI, WAKAME KOJI                            | 4. 巻<br>38                    |
| 2. 論文標題<br>Global Liver Gene Expression Analysis on a Murine Hepatic Steatosis Model Treated with Mulberry (Morus alba L.) Leaf Powder                                    | 5. 発行年<br>2018年               |
| 3. 雑誌名<br>Anticancer Research   | 6. 最初と最後の頁<br>4305 ~ 4311     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.21873/anticancer.12729   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Takaguri Akira   | 4. 巻<br>138               |
| 2. 論文標題<br>Elucidation of a New Mechanism of Onset of Insulin Resistance: Effects of Statins and Tumor Necrosis Factor- on Insulin Signal Transduction | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>YAKUGAKU ZASSHI  | 6. 最初と最後の頁<br>1329 ~ 1334 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1248/yakushi.18-00116   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Chiba Takeshi, Takaguri Akira, Maeda Tomoji  | 4. 巻<br>545       |
| 2. 論文標題<br>Norepinephrine transporter expressed on mammary epithelial cells incorporates norepinephrine in milk into the cells | 5. 発行年<br>2021年   |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>1~7 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2021.01.015   | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-         |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高栗郷、笹野潤、近江谷允明、佐藤久美            |
| 2. 発表標題<br>血管平滑筋細胞の増殖における時計遺伝子BMAL1の役割解明 |
| 3. 学会等名<br>第70回日本薬理学会北部会                 |
| 4. 発表年<br>2019年                          |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>久保貴司、高栗郷、佐藤久美             |
| 2. 発表標題<br>時計遺伝子Bmal1の内臓肥厚形成制御に関する検討 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会北海道支部第145回例会         |
| 4. 発表年<br>2018年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>久保貴司、高栗郷、佐藤久美                     |
| 2. 発表標題<br>血管平滑筋細胞における細胞増殖と細胞死に及ぼすYAP1の機能的役割 |
| 3. 学会等名<br>第91回日本薬理学会年会                      |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>高栗郷、笹野潤、近江谷允明、久保貴司、佐藤久美     |
| 2. 発表標題<br>血管リモデリングにおける時計遺伝子Bmal1の役割解明 |
| 3. 学会等名<br>第92回日本薬理学会年会                |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-------|--|-----------------------------------|----|
| 連携研究者 | 佐藤 久美<br><br>(Sato Kumi)<br><br>(00235334)     | 北海道科学大学・薬学部・教授<br><br><br>(30108) |    |
| 連携研究者 | 黒瀬 等<br><br>(Kurose Hitoshi)<br><br>(10183039) | 九州大学・薬学部・教授<br><br><br>(17102)    |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|