

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17628

研究課題名（和文）肺傷害時の肺上皮幹細胞におけるHippo経路の役割の解明

研究課題名（英文）The effect of conditional knockout of TAZ and YAP in lung injury.

研究代表者

砂金 秀章（Isago, Hideaki）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40821880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、タモキシフェン(TMX)依存的に肺上皮幹細胞においてTAZ/YAPを欠失するコンディショナルノックアウトマウスを作成、複数の肺疾患モデルにおいて、肺上皮幹細胞におけるHippo pathwayの役割を明らかにすることを目的とした。肺上皮特異的なTMX誘導型Creリコンビナーゼ発現マウスとTaz floxedマウス及びYap floxedマウスをそれぞれ交配し、肺上皮幹細胞特異的にTAZ/YAPを欠失するマウス系統を作成、これらに対し肺線維症及び肺気腫の疾患モデルを適用し解析を行ったが、それらの疾患モデルマウスにおいて、病態に有意な差を確認するには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肺の上皮幹細胞において、シグナル経路Hippo pathwayのエフェクターであるTAZおよびYAPが慢性肺疾患の病態に関与しているかを解明することを目的に行われた。TAZおよびYAPはマウスの肺発生において重要な役割を果たしていることが解明されたが、肺線維症モデル・肺気腫モデルにおいては、TAZおよびYAPのノックアウトが肺疾患の病態に寄与することは確認できなかった。TAZ・YAPの役割の解明には、異なる機序の遺伝子改変マウス系統、または異なる疾患モデルを用いたアプローチが必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to analyze the role of TAZ and YAP, the key molecules of Hippo pathway, in lung injury by using conditional knockout mice. We created mouse strains which knockout TAZ or YAP in lung epithelial cells by administration of tamoxifen (TMX). These mice were subjected to lung emphysema model, and bleomycin lung fibrosis model with or without TMX administration. We analyzed the lungs of both groups, and concluded that knockout of TAZ and Yap from lung epithelial cells have little effect in these models.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：Hippo pathway lung injury TAZ YAP

1. 研究開始当初の背景

ヒトの肺は外界と接するため、感染や物理的・化学的な傷害を受けやすく、損傷を受けた際は素早い修復が必要とされる。このため肺は定常状態では turn over の長い臓器だが、傷害時は肝臓や脾臓と並ぶ高い再生能を備えている。しかし喫煙や感染などによる反復する傷害に晒されると修復機序が破綻し、異常な修復の結果として線維化や気腫化を呈する。これが肺線維症や COPD などの慢性肺疾患の発症機序と考えられている。

Hippo pathway は 2003 年に発見された新しいシグナル経路であり、元々は器官のサイズを制御する経路として同定されたが、その後細胞増殖や細胞死、細胞分化制御・発がんなど、様々な細胞の機能を制御することが発見され注目を集めている。Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) と Yes-associated protein (YAP) は Hippo pathway のエフェクターで互いに構造のよく似た転写共役因子であり、Hippo pathway 上流からの刺激を受けて核内へ移行し、いくつかの転写因子と結合、下流の遺伝子群発現を調節する役割を担っている。

当研究室では、これまでに TAZ のノックアウトマウスが肺に気腫性変化を呈することを明らかにし、また bleomycin 投与により生じる肺の線維化が TAZ のヘテロノックアウトマウスでは軽度に留まることを明らかにした。

このように Hippo pathway は肺の再生に重要な役割を担う可能性が示唆されているが、成熟した肺において肺傷害時に Hippo pathway がどのような役割を果たしているかについては未だ明らかとされていない。

2. 研究の目的

本研究は、成熟した肺において、定常状態及び肺再生時の肺上皮幹細胞における Hippo pathway の役割を明らかにし、肺の再生について新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

TAZ KO マウスが成熟肺において気腫性病変を呈することと、YAP KO マウスが胎生致死であることが成熟肺における Hippo pathway の解析の妨げとなっており、我々の研究室がこれまで作出した肺上皮特異的な TAZ・YAP 欠損マウスでもそれは同様であった。このため本研究では肺上皮幹細胞特異的なタモキシフェン誘導型 CKO マウスを作出することとした。まずタモキシフェン (TMX) 誘導型 Cre リコンビナーゼ (II 型肺上皮細胞特異的; SFTPC-Cre/ERT, クララ細胞特異的; CCSP-Cre/ERT) 発現マウスと Taz floxed マウス・Yap floxed マウスをそれぞれ交配し、成長後にタモキシフェン投与によりそれぞれの上皮幹細胞で TAZ, YAP を欠損するマウス系統を樹立した。

これらの実験と並行し、野生型マウスを用いて、bleomycin 投与 (肺線維化モデル) LPS 投与 (炎症・COPD 増悪モデル) エラスターゼ投与 (気腫性変化モデル) の各種刺激モデルを確立し、また傷害された肺を免疫染色等で評価することで、野生型マウスでの再生時の Hippo pathway の動態を観察したのちに、続いて CKO マウスを用いて、これら確立された刺激モデル実験を行った。刺激後の肺は生理学的検査・気管支肺胞洗浄液の解析・肺標本の組織学的解析を行った。

4. 研究成果

肺上皮幹細胞特異的に TAZ/YAP を欠失するマウス系統を作出するため、TMX 誘導型 Cre リコンビナーゼ (II 型肺上皮細胞特異的; SFTPC-Cre/ERT, クララ細胞特異的; CCSP-Cre/ERT) 発現マウスと Taz floxed マウス・Yap floxed マウスをそれぞれ交配し、系統を得た。またこれらのマウスに TMX を投与して TAZ/YAP を欠失させるため、TMX の投与方法・投与量について検討した。TMX の毒性を回避できる投与量を検討し、SFTPC-Cre/ERT 系統においては 2 mg/日連日、CCSP-Cre/ERT 系統においては 5 mg/日隔日の投与量を定めた。

並行して野生型マウスを用いて、bleomycin 投与による肺線維症疾患モデル、LPS 投与による肺炎モデル、豚膵エラスターゼ投与による肺気腫モデルの作出をそれぞれ行い、投与量等を検討し、確立した。

これらの結果を確認したのちに、作出した遺伝子改変マウスに対し、まず bleomycin 投与による肺線維症疾患モデルに供し実験を行った。それぞれの系統について肺線維症の病理学的解析と、qPCR による線維化の定量を行ったが、TMX の投与の有無で線維化の程度について有意な差は認められなかった。

途中コロナ禍による大学ロックダウンのため実験計画が大幅に遅延したため、予定していた実験計画を変更、先の研究から病態に影響があることが期待された TAZ/CCSP-Cre^{ERTM} マウスのエラスターゼによる肺気腫モデルに絞り、研究を継続した。この系統のマウスについて、TMX 投与の有無、及びエラスターゼの投与の有無の 4 群について動物実験を施行、解析した (図 1)。

動物実験の経過では TMX 投与により死亡するマウスが少数みられ、TMX の毒性の影響と考えられた。肺気腫の程度解析については気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の炎症細胞数、肺生理機能、病理学的な mean linear intercept (MLI) の測定を行った。実験中の体重変化については、エラス

ターゼ投与群で一過性の減少がみられたが、有意な差はなかった(図2)。BALF中の炎症細胞数については、エラスターゼ群でやや上昇がみられたものの、エラスターゼ投与群の中ではTMX投与の有無で有意な差は見られなかった(図3)。肺生理機能検査では、肺コンプライアンス及び肺気量はエラスターゼ投与で顕著に上昇し、有意ではないがTMX投与群でやや大きな上昇がみられた(図4)。MLIについては肺生理機能検査と同様の傾向を示し、エラスターゼ投与群/TMX投与群で最大であったが、他の群と比較して有意ではなかった(図5)。これらの結果から、今回の動物実験においては、TAZのコンディショナルノックアウトが肺気腫の形成に影響を与えるという仮説を支持する結果は見出すことができなかった。

今回の研究において、病態に差をもたらすような有意な変化が見られなかった原因としては、TMX投与によるTAZおよびYAPのノックアウトが不十分だった可能性が考えられる。しかし今回のTMX投与量はその毒性の上限近く、ノックアウト効率の増強は困難であった。これまで同じ系統のCreリコンビナーゼ発現マウスを用いた研究は多く報告されており、また同種のCreリコンビナーゼ発現マウスを同様のプロトコルでYAP/TAZのダブルノックアウトを行ったマウスでは肺上皮の機能不全によるマウスの死亡が報告されている(Hicks-Berthet et al. 2021)ことから、分子構造のよく似たTAZとYAPの役割には冗長性があり、それぞれ単独のノックアウトでは病態に差を与えるに至らない可能性が考えられ、TAZおよびYAPそれぞれの役割を解明するには、別種の遺伝子改変マウスや他の疾患モデルでの解析が必要と考えられた。

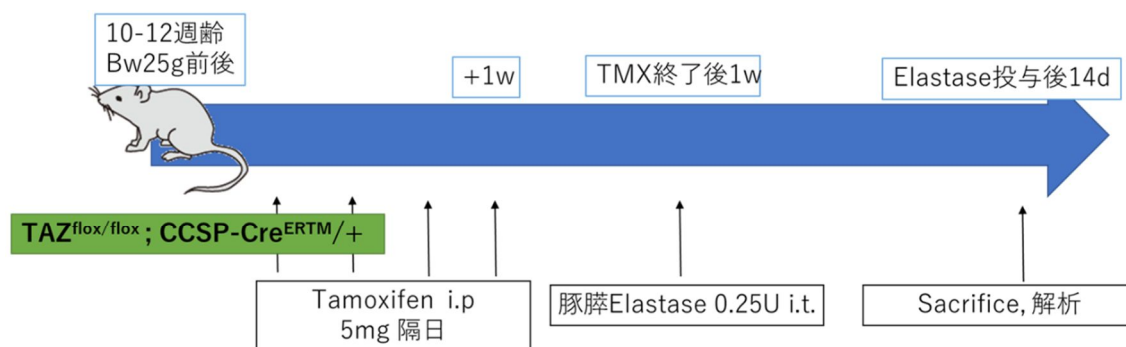


図1 動物実験プロトコル

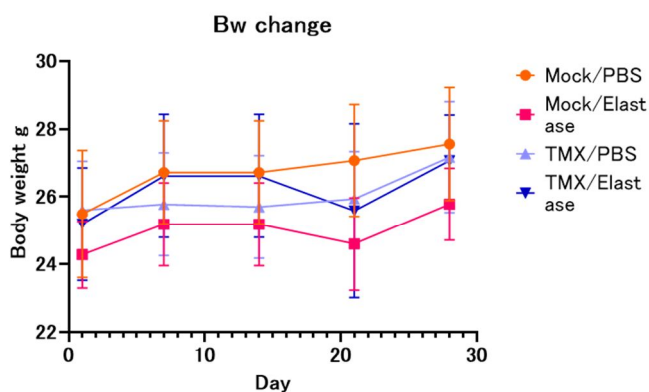


図2 体重変化

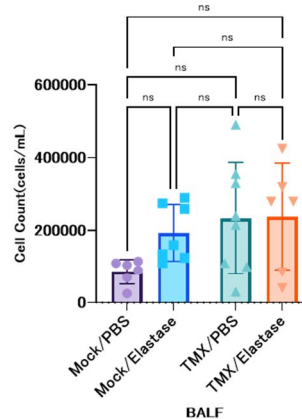


図3 BALF中炎症細胞数

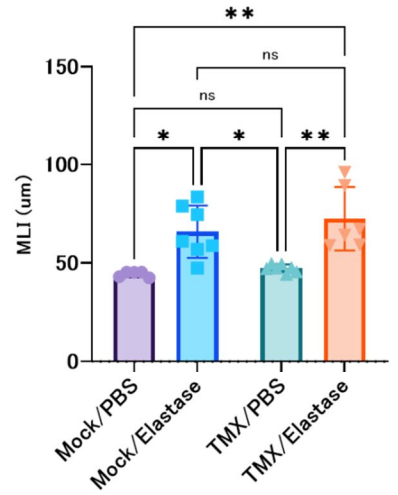
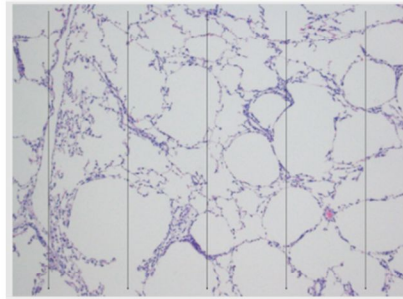
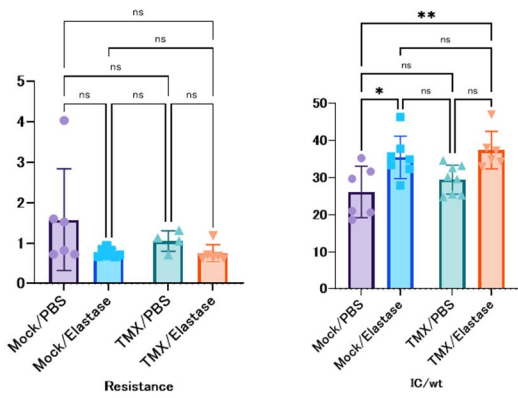
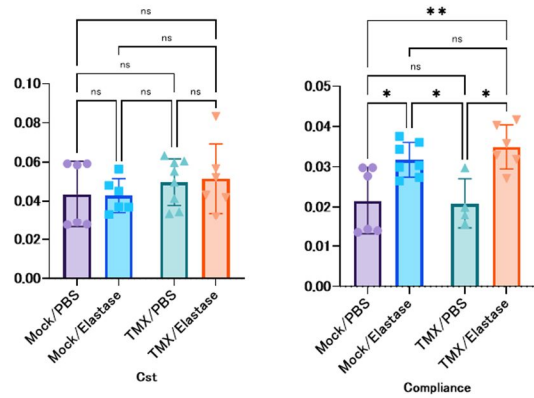


図4 肺生理機能検査

図5 気腫の病理像とMLI測定

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Isago Hideaki, Mitani Akihisa, Mikami Yu, Horie Masafumi, Urushiyama Hirokazu, Hamamoto Ryuji, Terasaki Yasuhiro, Nagase Takahide	4. 巻 62
2. 論文標題 Epithelial Expression of YAP and TAZ Is Sequentially Required in Lung Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 256 ~ 266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2019-02180C	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideaki Isago, Akihisa Mitani, Shiho Kohno, Hiroyuki Nagoshi, Taro Ishimori, Minako Saito, Hiroyuki Tamiya, Yu Mikami, Masafumi Horie, Hirokazu Urushiyama, Taisuke Jo, Go Tanaka, Ryuji Hamamoto, Yasuhiro Terasaki, Takahide Nagase
2. 発表標題 The Hippo pathway effectors TAZ and YAP are sequentially required in lung development
3. 学会等名 欧州呼吸器学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------