

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09287

研究課題名(和文) YAP阻害による敗血症性臓器障害の制御

研究課題名(英文) The regulation of YAP activation in endothelial cells to ameliorate septic organ damage

研究代表者

太田 淳一 (Junichi, Ota)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：50529667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：敗血症は過剰な炎症と血液凝固の活性化を基盤とし、血管内皮障害を伴う臓器障害を生じる致死率の高い疾患である。本研究課題では血管内皮細胞の転写共役因子YAPを標的として血管内皮障害と臓器障害が改善できるか検討を行ってきた。我々は臓器障害や血管透過性亢進を示す敗血症モデルマウスを確立したが、組織でのYAPタンパク質の活性化は評価できなかった。培養血管内皮細胞を用いてLPS刺激時にYAPの活性化が起こることを示し、YAPが炎症関連遺伝子の発現に関与することを明らかにした。これらは、血管内皮細胞のYAP活性化の制御によって敗血症性臓器障害や血管透過性亢進が改善する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症症状や臓器障害を抑えることができる有効な治療法はなく、その開発は医学的課題である。これまで抗サイトカイン療法、抗炎症療法、抗血液凝固療法が試行されたが、十分な成果は得られていない。本研究では、血管内皮細胞のYAPの活性化制御によって敗血症時の臓器障害や血管透過性亢進が抑制できる可能性を見出した。特に、細菌由来成分や傷害関連分子パターンにより血管内皮細胞のYAPが活性化すること、また薬剤によるYAP抑制が血管内皮細胞の炎症応答を抑えることを明らかにした。これらの結果は、敗血症の新しい治療標的や治療法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Sepsis, is underlying endothelial dysfunction associated with excessive activation of systemic inflammation and blood coagulation, leads to multiple organ damage. In this study, we have focused on the transcription coactivator Yes-associated protein (YAP) in endothelial cells and investigated whether its activation ameliorates vascular endothelial dysfunction and multiple organ damage.

Our sepsis model mice exhibited organ damage and increased vascular permeability, but we could not evaluate YAP activation. Moreover, by using cultured vascular endothelial cells, we found that YAP activation occurs upon Lipopolysaccharides (LPS) stimulation and demonstrated that YAP is involved in the expression of inflammation-related genes. These results indicated that septic organ damage and increased vascular permeability may be ameliorated by the regulating YAP activation in endothelial cells.

研究分野：救急医学

キーワード：敗血症 臓器障害 YAP 炎症 血管透過性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 敗血症は、「感染に対して宿主生体反応の統御不全により生命に危機を及ぼす臓器機能不全を呈している状態」である。すなわち、敗血症は過剰な炎症と血液凝固の活性化や血管内皮障害を伴った著しい血管透過性亢進と臓器障害を呈する致死性の高い疾患である。現在、敗血症に伴う臓器障害をいかにして治療し、回帰を改善するかが医学的課題となっている。

(2) 本分野における基礎と臨床研究は、傷害関連分子パターン (DAMPs) や病原体関連分子パターン (PAMPs) による炎症活性化機構、好中球トラップ (NETs) による細菌捕獲と免疫血栓、代償性抗炎症反応症候群 (CARS) の存在などが敗血症病態の一因であることを明らかにした。こうした理解は敗血症の改善につながると期待されている。

(3) 近年、トロンボモジュリン製剤やアンチトロンビンⅢ製剤が抗凝固作用に加えて、血管内皮細胞に対して抗炎症作用と細胞保護作用を有することが基礎研究レベルで証明されつつある。その作用機序の解明は、敗血症の治療標的分子の同定や各製剤が有効性を示す敗血症患者の判別マーカーの開発につながると期待される。

(4) これまで我々は、播種性血管内凝固症候群 (DIC) の治療薬であるトロンボモジュリン製剤が血管内皮細胞の硬化を抑制するなど抗炎症作用の機序を明らかにしてきた。これらの一連の研究から血管内皮細胞の転写共役因子 Yes-associated protein (YAP) の活性化の制御が抗炎症作用に重要であることを見出した。本研究課題では、敗血症モデルマウス、*in vitro* 培養血管内皮細胞を用いて、YAP の活性化を解析し、その活性化の制御が敗血症における血管透過性亢進と臓器障害を改善しうるか検証を試みた。

2. 研究の目的

(1) 転写共役因子 YAP は transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) と複合体を形成し、細胞分裂と増殖、アポトーシス、器官の大きさを制御している。YAP/TAZ を負に制御する Hippo 経路は、癌抑制シグナルとして知られている。血管内皮細胞において YAP/TAZ は細胞質および細胞膜付近に存在し、炎症時にはすみやかに細胞核へ移動して標的遺伝子の発現を誘導する。我々のグループは炎症時の YAP/TAZ の活性化は細胞間結合を減弱することを秋からかにしているが、感染症や敗血症病態における YAP の活性化とその役割は十分に理解されていない。

(2) 本研究課題では、「YAP 阻害が敗血症性の血管透過性亢進と臓器障害を改善するか」を検証することを目的とした。まず、Lipopolysaccharides (LPS) 投与、盲腸結索穿刺 (CLP) 誘導性敗血症モデルマウスにおける YAP の活性化と血管透過性亢進または臓器障害を解析した。次にヒストン投与による敗血症モデルの臓器障害を解析した。薬剤を用いた YAP の制御による臓器障害の変化について評価を試みた。さらに *in vitro* 培養血管内皮細胞を用いて LPS 刺激における YAP の活性化を調べ、YAP 阻害による炎症や血液凝固関連遺伝子の発現変動を解析した。これらの研究によって敗血症性臓器障害や血管透過性亢進が血管内皮細胞の YAP 活性化を制御することで抑制できるか検討した。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルの作成

C57BL/6J 雄性マウス (8~9 週齢) の腹腔内に LPS を投与、または開腹して CLP を施術して敗血症モデルを作成した。24 時間後の致死率、血圧、脈拍数、直腸温、体重、白血球、血小板数を測定した。さらに、生存マウスから肺および腎臓を摘出してヘマトキシリンエオシン (H&E) 染色、フィブリノーゲン染色を行い、臓器障害と血管透過性を評価した。また、C57BL/6J 雄性マウス (8~9 週齢) の静脈内にヒストンを投与して敗血症モデルを作成し、上記と同様に臓器障害を評価した。

(2) 敗血症モデルマウス、LPS 投与血管内皮細胞における YAP の局在解析

摘出した肺および腎臓の組織標本を作成し、抗 YAP 抗体を用いて YAP の局在を可視化して、核内移行を指標に YAP の活性化を評価した。また、培養血管内皮細胞に LPS 刺激またはヒストン刺激を加え、4 時間後に YAP の蛍光染色を行い、YAP の局在を評価した。

(3) 培養血管内皮細胞における YAP の活性化解析

YAP の活性化を精査するため、培養血管内皮細胞に LPS 刺激を加えた後、経時的にタンパク質を回収した。YAP 蛋白とリン酸化 YAP 蛋白の発現量をウェスタンブロット法で評価した。また、細胞から RNA を回収・精製し、YAP1 の標的遺伝子である Cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CYR61)、Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)、Connective tissue growth factor (CTGF) mRNA の発現量を定量的 PCR 法で解析した。

4. 研究成果

(1) 敗血症モデルの作成

マウスに 20mg/kg の LPS を投与後、6 時間後には 6 匹中 4 匹のマウスが死亡した。10mg/kg 投与したマウスでは全例が生存したが、血圧、体温、心拍数が低下したことを確認した。血清中の炎症性サイトカインの濃度が上昇傾向を示した。また、H&E 染色、フィブリノーゲン染色で臓器障害、血管透過性を評価した結果、肝臓、腎臓の一部で白血球の浸潤など弱い障害およびフィブリノーゲンの漏出が確認され (図 1)、GOT、GPT の値も上昇した。CLP モデルでも全例が生存し、一部に臓器障害が確認されたが、個体ごとに差異があり、安定して敗血症モデルを誘導するに至らなかった。

より明確な臓器障害を誘導するため、ヒストン 50mg/kg を静脈内投与した敗血症モデルを作成した。全例が生存し、血圧、体温、心拍数では有意な変化が確認されなかった。しかし、H&E 染色では肺臓と肝臓に LPS 投与群よりも強い臓器障害が観察された。

これらの結果から、LPS およびヒストンを投与することで臓器障害と血管透過性亢進を伴う敗血症様症状を呈するモデルマウスを作成することが可能となった。

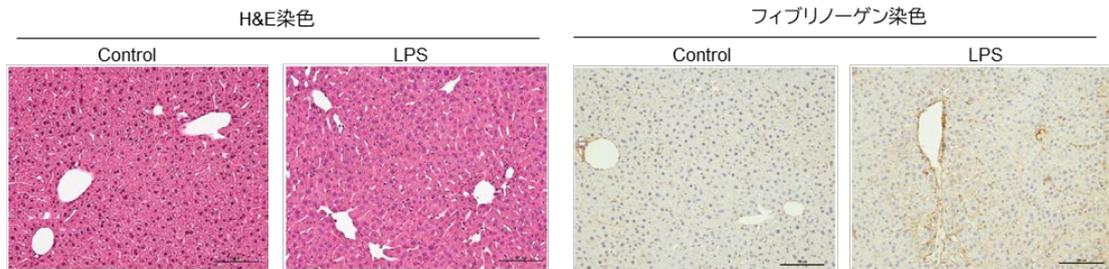


図1 LPS投与敗血症モデルマウスにおける臓器障害
マウス腹腔内にLPS(10mg/kg)を投与し、肝臓における臓器障害をH&E染色とフィブリノーゲン染色にて評価した。LPS投与により白血球の浸潤、フィブリノーゲンの沈着、組織内浸潤が観察された。

(2) 敗血症モデルマウス、LPS 投与血管内皮細胞における YAP の局在解析

次に、敗血症モデルマウスから得られた組織切片を用いて血管内皮細胞および組織細胞での YAP の活性化について YAP タンパク質の局在を可視化して核内移行を指標に評価を試みた。しかしながら、我々が所持する設備を用いた実験系では細胞内 YAP タンパク質の局在変化の判別を客観的に行うことができなかった。そこで、培養血管内皮細胞を用いて、細胞に LPS またはヒストン刺激を加え、YAP タンパク質の局在変化を評価した。その結果、LPS またはヒストン刺激を加えることで YAP タンパク質の核内移行が誘導された (図 2)。

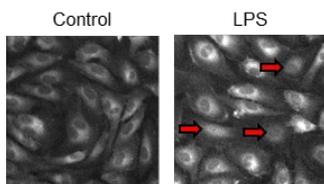


図2 培養血管内皮細胞におけるYAPタンパク質の局在変化
培養血管内皮細胞にLPS刺激を加え、4時間後にYAPタンパク質の局在を傾向免疫染色法で評価した。未刺激のコントロール細胞ではYAPタンパク質は細胞質内に存在するのに対して、LPS刺激により、YAPタンパク質の核内移行が誘導された(赤矢印)。

(3) 培養血管内皮細胞における YAP の活性化解析

YAP タンパク質は、正常時にはリン酸化された不活性型で細胞質内に存在し、脱リン酸化されて活性化されると、核内へ移行する。核内に移行した YAP は転写共役因子として働き、その標的遺伝子の発現を調節する。これまで YAP は複数の転写関連因子と相互作用し、多様な遺伝子の発現を制御することが報告されている。ここでは、まず LPS 刺激に対する YAP タンパク質の脱リン酸化を調べた。LPS 刺激後、時間の経過とともに YAP タンパク質は増加傾向を、リン酸化 YAP タンパク質は減少傾向を示した。

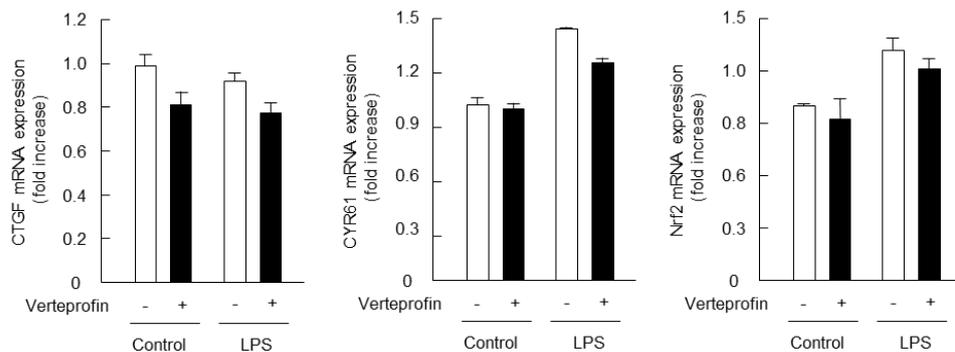


図3 LPS投与によるYAPの活性化評価
培養血管内皮細胞にLPS刺激を加え、4時間後にRNAを回収し、YAPの標的遺伝子の発現を定量的RT-PCR法で評価した。LPS刺激によってCTGFの発現は増加しなかったが、CYR61、Nrf2の発現亢進が見られた。これらの発現はYAP阻害剤のVerteporfinによって抑制されることを確認した。

さらに YAP の標的遺伝子である CYR61、Nrf2、CTGF mRNA の発現量を定量的 PCR 法で解析し、YAP

の転写因子活性を評価した。その結果、LPS 刺激によって CTGF の発現は増加しなかったが、CYR61, Nrf2 の発現亢進が見られた。これらの発現は YAP 阻害剤の Verteporfin によって抑制されることを確認した (図 3)。

また、YAP を阻害することで LPS 誘導性の ICAM-1、VCAM-1 mRNA の発現が部分的に抑制された。一方で、YAP 活性化剤の XMU-MP-1 を単独に加え、YAP を活性化した際には IL-6、ICAM-1、VCAM-1 の発現誘導はほとんど見られなかった (図 4)。

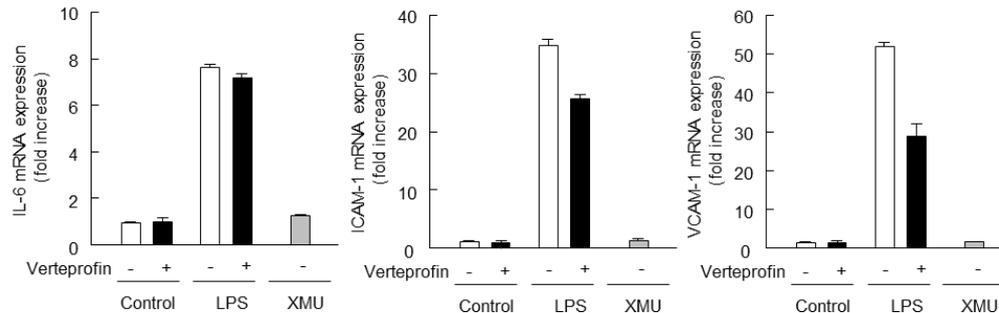


図4 LPS投与による炎症性遺伝子発現に対するYAPの影響

培養血管内皮細胞にLPS刺激を加え、4時間後にRNAを回収し、炎症関連遺伝子の発現を定量的RT-PCR法で評価した。LPS刺激によってIL-6、ICAM-1、VCAM-1 mRNAの発現増加が見られ、VerteporfinによってYAPを阻害することでICAM-1、VCAM-1 mRNAの発現が部分的に抑制された。一方で、YAP活性化剤のXMU-MP-1(XMU)を単独に加え、YAPを活性化した際にはIL-6、ICAM-1、VCAM-1の発現はほとんど変化しなかった。

これらのことから LPS 誘導性の炎症応答に YAP は部分的に関与するが、YAP の活性化だけでは強い炎症応答を起こすには至らないと考えられた。これらの結果から、YAP は血管内皮細胞の炎症のマスターレギュレーターではないが、協調して活性化され、その YAP の活性化を制御することで敗血症に伴う臓器障害や血管透過性亢進を調節できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10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 Matsuo Eri, Okamoto Takayuki, Ito Atsushi, Kawamoto Eiji, Asanuma Kunihiro, Wada Koichiro, Shimaoka Motomu, Takao Motoshi, Shimamoto Akira	4. 巻 408
2. 論文標題 Substrate stiffness modulates endothelial cell function via the YAP-Dll4-Notch1 pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112835 ~ 112835
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112835	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 -
1. 著者名 Okamoto Takayuki, Park Eun Jeong, Kawamoto Eiji, Usuda Haruki, Wada Koichiro, Taguchi Akihiko, Shimaoka Motomu	4. 巻 1867
2. 論文標題 Endothelial connexin-integrin crosstalk in vascular inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166168 ~ 166168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2021.166168	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 -
1. 著者名 Kawamoto Eiji, Nago Nodoka, Okamoto Takayuki, Gaowa Arong, Masui-Ito Asami, Akama Yuichi, Darkwah Samuel, Appiah Michael Gyasi, Myint Phyo Kyaw, Obeng Gideon, Ito Atsushi, Caidengbate Siqingawa, Esumi Ryo, Yamaguchi Takanori, Park Eun Jeong, Imai Hiroshi, Shimaoka Motomu	4. 巻 9
2. 論文標題 The Lectin-Like Domain of Thrombomodulin Inhibits Integrin-Dependent Binding of Human Breast Cancer-Derived Cell Lines to Fibronectin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 162 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9020162	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 -
1. 著者名 Okamoto Takayuki, Kawamoto Eiji, Usuda Haruki, Tanaka Tetsuya, Nikai Tetsuro, Asanuma Kunihiro, Suzuki Koji, Shimaoka Motomu, Wada Koichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Recombinant Human Soluble Thrombomodulin Suppresses Monocyte Adhesion by Reducing Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Cellular Stiffening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1811 ~ 1811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9081811	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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本 貴行、白田 春樹、和田 孝一郎
2. 発表標題 細胞外環境の硬さによる血管内皮細胞の機能変化の解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本 貴行
2. 発表標題 血管の硬化がもたらす血管内皮細胞の炎症性変化
3. 学会等名 第49回日本救急医学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本貴行, 松尾映里, 伊藤温志, 川本英嗣, 白田春樹, 和田孝一郎, 島岡要, 高尾仁二, 島本亮
2. 発表標題 細胞接着基質の硬さがVEGF誘導性の血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本 貴行、白田 春樹、和田 孝一郎
2. 発表標題 細胞外環境の硬さが誘導する血管内皮細胞の遺伝子発現の解析
3. 学会等名 第5回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本貴行, 松尾映里, 伊藤温志, 川本英嗣, 臼田春樹, 田中徹也, 和田孝一郎, 島岡要, 高尾仁二, 島本亮
2. 発表標題 細胞外環境の硬さによる血管内皮細胞の機能変化の解析
3. 学会等名 第42回(2020年度)血栓止血学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本貴行, 臼田春樹, 田中徹也, 和田孝一郎
2. 発表標題 リコモジュリンによる血管内皮細胞の硬化抑制とその役割
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本貴行, 臼田春樹, 和田孝一郎
2. 発表標題 血管内皮細胞の硬さとギャップ結合におけるYAPの役割
3. 学会等名 第75回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	岡本 貴行 (Okamoto Takayuki) (30378286)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (15201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	二階 哲朗 (Nikai Tetsuro) (20314643)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	
研究協力者	勝部 由貴子 (Katsube Yukiko) (20896659)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・研究員 (15201)	
研究協力者	服部 舞 (Hattori Mai)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・技術職員 (15201)	

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