

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15621

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達から明らかにする気管再生機構

研究課題名(英文)The mechanism of tracheal regeneration revealed from the study of cell signaling pathway.

研究代表者

大森 孝一(Omori, Koichi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10233272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は自己組織の再生を誘導する人工気管を開発し、癌や気管狭窄などにより切除した気管の再建に用いてきた。再建領域において上皮組織が速やかに再生し、十分な上皮機能を有することが求められるため、液性因子を利用した上皮再生促進が検討されてきた。Hippoシグナル経路は気管上皮の増殖、分化に関与することが報告されているため、本研究においてYAP阻害薬によって再生過程のラット気管上皮におけるHippoシグナルを調節した結果、気管上皮の分化が促進され、気管内腔の異物排除に機能する線毛の形成が促進された。したがって、Hippoシグナル経路を調節することで、気管上皮再生に貢献できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our group developed an artificial trachea capable of inducing in situ tissue regeneration, and have clinically used the artificial trachea for reconstructing tracheal defects, which were generated by resecting regions suffering from stenosis or malignant tumors. To hasten epithelial regeneration on the artificial trachea, the effects of various soluble factors on epithelial regeneration have been investigated. Because Hippo signaling pathway has been reported to be involved in the proliferation and differentiation of airway epithelial cells, we regulated Hippo signaling pathway in regenerating rat tracheal epithelium by using YAP inhibitor. Administration of YAP inhibitor to regenerating tracheal epithelium promoted differentiation of epithelial cells. Ciliogenesis was promoted in the YAP inhibitor-treated group. Therefore, regulating Hippo signaling pathway is suggested to be effective for tracheal epithelial regeneration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：気管 再生 Hippo

## 1. 研究開始当初の背景

気管および気管支の再建に関する研究は、1881年にGluckらによって行われたイヌ気管の端々吻合実験から始まった。その後、気管端々吻合術は実際に臨床でも実施されており、ハーバードのGrilloらは1968年に、6 cm以下の長さの気管全周切除の際には気管端々吻合術が可能であることを報告した。現在では、気管全周切除後の治療として気管端々吻合術は気管外科における標準術式となっている。しかし、気管切除が広範であった症例においては、端々吻合術は適応とならない。また、術後において縫合不全や縦隔炎といった重篤な合併症が起こる危険性が高く、吻合部離開を防ぐために、患者に対して苦しい頸部前屈姿勢などを強要するといった問題もある。これらに対して、臨床で安全に実施可能であり、かつ患者に苦しい姿勢を強制しない術式の確立が模索されており、代表的なものとして、気管を人工物で再建する試みが1940年代から進められてきた。しかし、血液の再環流が不十分であること、上皮化に長期間を要すること、肉芽形成による気管狭窄や生着不良などが問題となり、十分な成果が得られてきたとは言い難い。

1997年以降、組織工学的手法を用いた各種組織の再生についての研究が進み、気管、食道、胃、小腸、声帯、輪状軟骨の再生に成功している。気管に関しては、コラーゲンスポンジを気管型に成型した自己組織再生型人工気管が開発されており、これまで12例の臨床例を経験している。臨床成績は良好であり、患者自身の細胞を誘導して上皮組織の再生を達成している。しかし、動物実験の結果では、ラットに移植したコラーゲンスポンジ上で再生された上皮では扁平上皮が広範に観察され、正常な気管上皮と比べて線毛細胞は疎であった。そのため、再生された気管上皮は正常な気管上皮と比べて防御機能に劣ることが懸念される。

細胞内シグナル伝達機構に関する発見により、細胞はサイトカインや成長因子、細胞外マトリックス分子といった細胞外の情報を受容し、その情報に応じてmitogen-activated protein kinase、phosphatidylinositol 3-kinase等の各種のシグナル伝達経路を活性化させることが判明してきた。これらの経路を構成する分子を阻害あるいは活性化させる薬剤は、成長因子やサイトカインにより刺激される細胞の活動を、より直接的に刺激することが可能であることから、創薬分野では、これらの経路を調節する薬剤の開発が進んでいる。

最近注目され始めたシグナル伝達経路にHippoシグナルがある。Hippoシグナルは細胞の密集度や形状、周囲との物理的関係性を認識して活性が変化する特徴的なシグナル伝達機構である。線維芽細胞を用いた研究では、細胞が過密な状態においてHippoシグナ

ルの活性化が起こり、過剰な増殖を抑制することが示されている。一方、Hippoシグナルの活性化は様々な上皮細胞の分化を誘導することも報告されている。したがって、気管上皮が分化し、線毛運動、粘液分泌、タイトジャンクションといった防御機能を獲得する上でHippoシグナルが重要な役割を担っていると予想される。

## 2. 研究の目的

気管上皮再生過程へのHippoシグナルの関与について調べるとともに、Hippoシグナルの調節が気管上皮再生に及ぼす影響について調べ、気管上皮再生を促進する上でHippoシグナルが新規薬剤のターゲットとしての可能性を有するか検討する。Hippoシグナルを調節する方法として、

Hippoシグナルにおいては、転写共役因子であるyes-associated protein (YAP)が中心的な役割を担うと考えられており、Hippoシグナルが活性化した状態ではYAPはリン酸化を受け、細胞質あるいは細胞膜上の分子に捕捉されることで核内移行を妨げられる(図1)。Hippoシグナルが不活性化した状態では、YAPは転写共役因子としての活性を有し、核内へ移行することでtranscriptional enhancer associate domain (TEAD)などの転写因子と結合し、その転写を補助する。そのため、気管上皮再生過程へのHippoシグナルの関与についての知見を得る上では、YAPのリン酸化と核内移行について調べることとした。

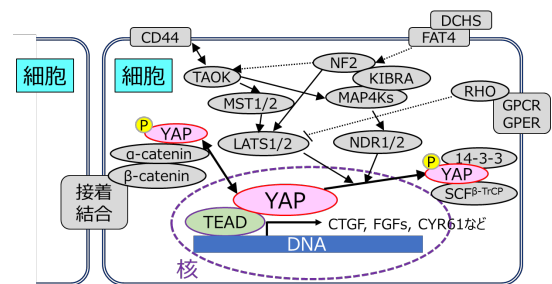


図1 Hippoシグナル経路の概念図

Hippoシグナル経路においては転写共役因子であるYAPが中心的な役割を担う。Hippoシグナル不活性化状態でYAPは核内に移行し、TEADなどの転写因子と結合して転写因子としての機能を果たす。Hippoシグナル活性化状態ではYAPはリン酸化を受けて細胞質あるいは細胞膜上の分子に捕捉され、転写共役因子として不活性化状態となる。

Hippo シグナルの調節が気管上皮再生に及ぼす影響について知見を得る上では、Hippo 経路を構成する分子の発現を抑制する手法と、それら分子の機能を薬剤により阻害する手法が考えられた。両者の方法について検討し、Hippo シグナル調節および気管上皮の再生促進に効果的な方法を模索することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 再生過程のラット気管上皮における Hippo シグナル経路の変化

Sprague Dawley ラット(10 週齢、オス)の気管に 2 mm × 2 気管輪の欠損を作製した。支持体としてポリプロピレン製メッシュを備えたコラーゲンスポンジを気管欠損に移植後、1、3、7、14 日目に気管を採取し、パラフィン包埋切片を作製し、免疫染色に供した。上皮細胞を標識するためにはサイトケラチンに対する抗体を用いた。Hippo シグナルでは yes-associated protein (YAP) の局在とリン酸化が重要であるため。YAP、リン酸化 YAP (p-YAP) (Ser127) に対する抗体による染色も行った。Hippo シグナルが活性化した状態では YAP はリン酸化し、細胞質に局在するが、不活化状態では YAP はリン酸化せず、核内移行することが知られているため、YAP のリン酸化と YAP 局在について調べることで上皮細胞における Hippo 経路活性化状態を調べた。なお、二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ標識した二次抗体を用い、3,3'-diaminobenzidine と過酸化水素を用いて発色させることで、上記の一次抗体が結合した領域を可視化した。

#### (2) 培養気道上皮細胞を用いた Hippo 経路調節方法の検討

##### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

TEAD が結合する DNA 配列である GTIIC モチーフをプロモーター領域に持つルシフェラーゼ遺伝子 (8xGTIIC-luciferase) を不死化ラット気道上皮細胞株 EGV-4T に導入した。TEAD の転写共役因子である YAP および YAP をリン酸化させる large tumor suppressor kinase 1 (LATS1) の遺伝子を発現抑制するために両遺伝子の siRNA を作製した (siYap および siLats1)。siYap あるいは siLats1 を用いて 8xGTIIC-luciferase を導入した EGV-4T 細胞における YAP1 の遺伝子あるいは LATS1 の遺伝子発現をノックダウンし、24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼ活性を測定し、Hippo 経路活性化状態の指標とした。

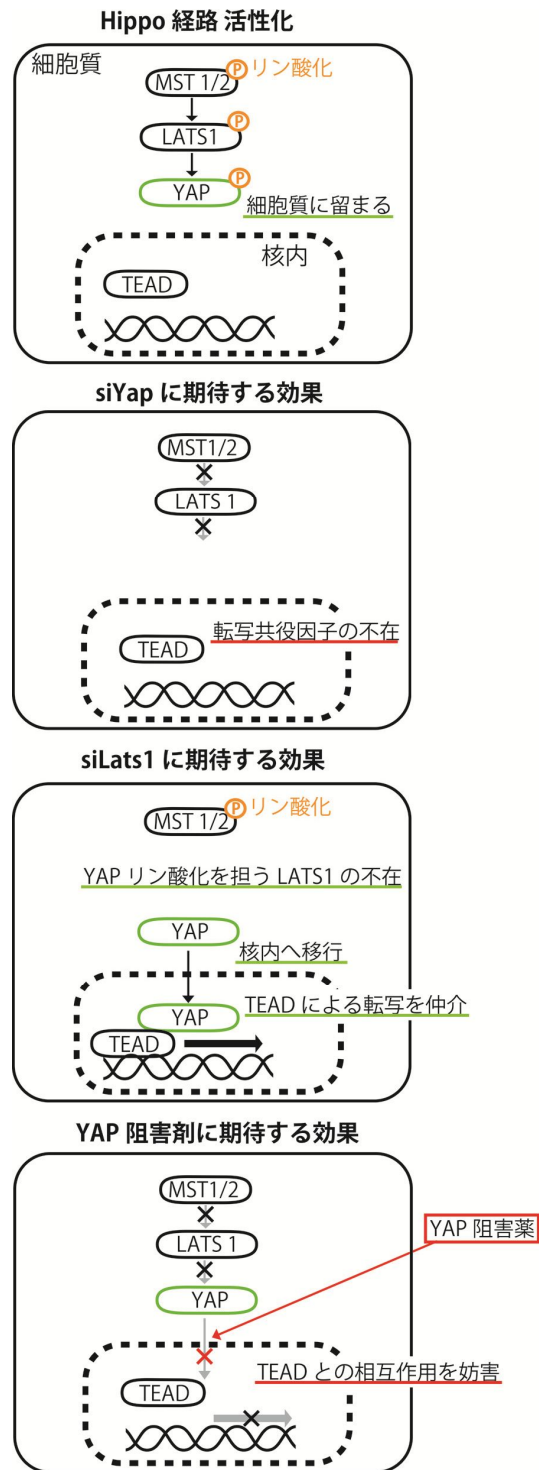


図 2 活性化状態の Hippo 経路と、siYap、siLats、YAP 阻害薬により期待される Hippo 経路への効果に関する概念図

Hippo 経路活性化状態ではリン酸化 LATS1 が YAP をリン酸化させ、YAP の核内移行が阻害され、TEAD などの転写因子による仲介が抑えられる。siYap の導入や YAP 阻害剤処理を行った場合、Hippo 経路不活化状態においても、YAP による TEAD の転写仲介が抑制されるものと期待される。逆に siLats1 の導入は Hippo 経路活性化状態においても YAP のリン酸化が抑制され、YAP の核内移行と TEAD による転写が妨げられないものと期待される。

また、上記の siRNA の導入を行わずに、YAP 阻害剤を添加して 24 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定することで、Hippo 経路の活性化状態を調べた。

活性化状態の Hippo シグナル経路と、siYap、siLats1、YAP 阻害薬の使用により期待される Hippo シグナル経路への効果について、概念図を図 2 として示す。

#### 免疫染色

EGV-4T 細胞に対して、上述のように siYap あるいは siLats1 を導入、あるいは YAP 阻害薬処理して培養後、4%PFA で 10 分固定した。抗 YAP 抗体、Alexa488 標識二次抗体を用いて免疫染色し、核を DAPI により染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて YAP の局在を観察し、YAP の核内移行について調べた。

#### (3) Hippo 経路調節がラット気管上皮再生に及ぼす影響の評価

コラーゲンスポンジで被覆されたポリプロピレン製メッシュをラット気管欠損に移植した。移植後 1 週目に麻酔下で頸部を開き、移植領域内腔面に 100  $\mu$ g/mL YAP 阻害薬を滴下した。あるいは、siRNA の導入を行った。YAP 阻害薬投与あるいは siRNA 導入から 1 週間後に、移植領域の凍結切片あるいは走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察用の標本作製し、上皮の分化を評価した。免疫染色では、サイトケラチン 5 (基底細胞マーカー)、アセチル化チューブリン (線毛マーカー)、クララ細胞 10 kDa タンパク質 (CC10; 分泌細胞マーカー) の染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 再生過程のラット気管上皮における Hippo シグナル経路の変化

非欠損領域の上皮において YAP および p-YAP は主に細胞質に観察され、核内にはあまり観察されなかった。p-YAP に関しては頂端領域および線毛に強い陽性染色が観察された。

移植 3 日目および 1 週目の移植領域中央付近においては核内に強い YAP 陽性染色を示す扁平上皮細胞が観察された。移植後 1 日目の正常領域と移植領域の接合部付近においては、コラーゲンスポンジ上に侵入した扁平上皮細胞の核内に強い YAP 陽性染色が観察された。これらの扁平化した上皮細胞において p-YAP に対する陽性染色は弱く、ほとんど陽性染色が観察されない細胞も存在した。

移植後 2 週目の移植領域中央付近では線毛形成が進行し始めており、多列線毛上皮に近い部分も観察された。このような上皮において YAP および p-YAP に対する陽性染色はいず

れも、主に細胞質に観察された。移植後 1 週目の正常領域と移植領域の接合部付近においても線毛形成が進んでおり、YAP および p-YAP に対する陽性染色はいずれも、主に細胞質に観察された。

これらの結果は、再生過程の上皮細胞において、増殖および遊走過程では YAP は核内に、分化過程では YAP はリン酸化して細胞質に局在する傾向があることを示唆している。したがって、気管上皮再生初期には Hippo 経路の不活化、再生後期の分化過程には Hippo 経路の活性化が関わっていることが示唆される。

#### (2) 培養気道上皮細胞を用いた Hippo 経路調節方法の検討

ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、YAP 阻害薬処理による YAP 阻害はルシフェラーゼ活性を有意に低下させる結果が得られた。また、siYap による YAP 遺伝子発現のノックダウンもルシフェラーゼ活性を有意に低下させた。siLats1 による LATS1 遺伝子のノックダウンは優位ではないもののルシフェラーゼ活性を上昇させた。

免疫染色では、YAP 阻害薬処理した EGV-4T において核内の YAP 陽性染色が減弱した様子が観察された。同様の結果は siYAP による YAP 発現のノックダウンによっても得られたが、siLATS1 は YAP の局在に影響を及ぼさなかった。

これらの結果より、YAP 阻害薬処理および siYAP 導入は EGV-4T における YAP と TEAD の相互作用を抑制し、Hippo シグナルを活性化に近い状態に誘導できることが示唆された。したがって、気管上皮に作用させた場合には上皮細胞の分化を促進できる可能性が考えられた。

#### (3) Hippo 経路調節がラット気管上皮再生に及ぼす影響の評価

ラット気管欠損にコラーゲンスポンジを移植した場合、移植後 1 週目において移植領域は概ね上皮で覆われるため、この時点で YAP 阻害薬投与あるいは siYap の導入を行うことで気管上皮細胞の分化を促進できるか調べた。

YAP 阻害薬を投与した上皮では、投与後 1 週目において、コントロールと比較して多列線毛上皮に近い様相を呈することが免疫染色により示された。さらに、SEM 像においても YAP 阻害薬投与により線毛形成が促進されている様子が観察され、形成された線毛もコントロールと比較して長く、成熟している傾向があった。一方、siYap の導入は特に上皮分化の促進に作用しなかった。

以上の結果より、YAP 阻害薬は再生過程の上皮細胞に投与することで上皮細胞分化促進に作用することが示唆された。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

中村亮介、吉江進、多田靖宏、大森孝一、ラット気管上皮再生過程における Yap の核移行阻害が上皮細胞に及ぼす影響、第 16 回日本再生医療学会総会、平成 29 年 3 月 9 日、仙台

中村亮介、野本幸男、多田靖宏、大森孝一、ラット気管上皮再生過程における Hippo シグナル関連分子の局在、第 68 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会、平成 28 年 11 月 28 日、東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大森 孝一 (OMORI, Koichi)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10233272

### (2)研究分担者

中村 亮介 (NAKAMURA, Ryosuke)  
京都大学・大学院医学研究科・研究員  
研究者番号：40736708

竹澤 俊明 (Toshiaki Takezawa)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・新産業開拓研究領域・主任研究員  
研究者番号：50301297

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

吉江 進 (YOSHIE, Susumu)

多田 靖宏 (TADA, Yasuhiro)

野本 幸男 (NOMOTO, Yukio)