

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20322

研究課題名(和文) Scarless wound healingにおけるYAP/TAZの役割の検討

研究課題名(英文) The role of YAP/TAZ in scarless wound healing

研究代表者

濱田 茉莉子 (Hamada, Mariko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70723287

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：scarless wound healingにおけるYAP/TAZの役割の検討を行うため、マウス胎仔創傷治癒過程およびケロイド組織においてYAP/TAZの核内移行を検討した。ケロイド組織10サンプルを用い、ケロイドと辺縁正常皮膚の線維芽細胞のYAP/TAZの局在を比較したところ、辺縁正常皮膚に比べ、ケロイド組織内では有意に線維芽細胞におけるYAP/TAZの核内移行率が高かった。同様に表皮細胞、血管内皮細胞でも比較検討を行ったが、有意差はなかった。これらのことから、線維芽細胞におけるYAP/TAZの核内移行が癒痕やケロイド形成に重要な役割を果たし、治療のターゲットになり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined keloid and normal tissue from 10 subjects and analyzing via IHC the YAP/TAZ levels in the cytoplasm and nucleus of keloid fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes. The keloid fibroblast is the only cell that showed increased YAP/TAZ levels within the nucleus, possibly implicating this pathway in keloid pathogenesis and suggesting a potential target for therapeutic intervention. Our results suggest a possible pathway for keloid formation related to 'mechanotransduction' effects of stiffening of the ECM being signaled via YAP/TAZ expression influencing the Hippo pathway and keloid generation.

研究分野：形成外科

キーワード：創傷治癒 scarless wound healing ケロイド YAP/TAZ

1. 研究開始当初の背景

胎仔の創傷治癒過程や口腔粘膜の創傷治癒過程では、傷跡を残さず治癒する(scarless wound healing)ことが知られ、これまで創傷治癒研究のモデルとなってきた。2013年に、Hippo pathway で知られる Yorkie のホモログである YAP(Yes-associated protein)が、stem progenitor cell の増殖と表皮の分化のバランスをコントロールしていることが発表され(Beverdam A. et al. J Invest Dermatol.)、2014年には同じく Yorkie ホモログである TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)とともに、成獣マウスの皮膚における創傷治癒過程で核内移行することで創傷治癒に関与している可能性が報告された(Lee MJ. et al. J Invest Dermatol.)。しかし、創傷治癒過程における YAP や TAZ の直接的機能や胎仔の創傷治癒過程での YAP や TAZ の報告はこれまでない。

2. 研究の目的

臓器の大きさを規定する Hippo pathway の伝達分子である YAP およびそのホモログである TAZ は、2011年に細胞外マトリックスの硬さ及び細胞形状によって伝えられる機械的シグナルを核へ送る伝達装置であることが報告され(Dupont S. et al. Nature)、初めて Hippo pathway 以外での YAP/TAZ の核内移行の伝達系が示された。また、ヒトの種々のがん、Hippo pathway の機能低下、YAP/TAZ の高発現が高頻度に認められ、かつ YAP/TAZ の活性上昇はがん細胞の間葉細胞化、幹細胞化を起こして臨床予後を悪化させることが報告され(Hao et al. J Cell Physiol. 2013.)近年、注目を集めている分子である。皮膚では、2013年に成獣マウスの創傷治癒過程でもその発現と核内移行が認められ、重要な役割を果たすことが示唆されているが、詳細な役割はまだ不明であり、本研究は、ヒトのケロイド組織及び胎仔マウスの創傷治癒モデルでの

YAP/TAZ の局在を検討し、発現調節での検討を行うことで、YAP/TAZ シグナル伝達系が scarless wound healing に関与している可能性とその作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒトケロイド組織における YAP/TAZ の局在検討

当院倫理委員会承認のもと、ケロイド切除術手術時に採取されたケロイド組織を使用し、免疫染色(蛍光及び DAB 染色)にてケロイドと辺縁正常皮膚における YAP/TAZ の局在を細胞別(線維芽細胞、表皮細胞、血管内皮細胞)に比較検討した。

(2)マウス胎仔創傷治癒過程における YAP/TAZ の検討

完全な皮膚の再生メカニズムを探求する上で、胎生 13 日以前の胎仔皮膚創傷では皮膚・付属器ともに完全な皮膚再生を起こすのに対し、胎生 15 日目以降の創傷は癒痕を残して治癒することに着目し、マウス胎仔創傷治癒モデルを用い、YAP と TAZ の発現とその局在を検討した。

胎生 13 日、15 日、17 日マウス胎仔に創傷を作成し、24 時間後採取した創部の皮膚組織及び胎生 13 日、15 日、17 日の背部皮膚組織を用いて、免疫染色にて YAP と TAZ の発現・局在の検討を行った。

(3)胎生 13 日、15 日、17 日胎仔皮膚由来線維芽細胞を用いた *in vitro* における YAP/TAZ の核内移行の検討

胎仔背部皮膚から explant 法にて線維芽細胞を分離培養し、2 次元培養及び 3 次元培養し、YAP/TAZ の核内移行を免疫染色法にて検討した。

4. 研究成果

(1)ヒトケロイド組織における YAP/TAZ の局

在検討

ケロイド組織 10 サンプルを用い、ケロイドと辺縁正常皮膚の線維芽細胞の YAP/TAZ の局在を比較したところ、辺縁正常皮膚に比べ、ケロイド組織内では有意に線維芽細胞における YAP/TAZ の核内移行率が高かった。同様に表皮細胞、血管内皮細胞でも比較検討を行ったが、有意差はなかった。(発表論文 1.にて報告。)このことから、ケロイド組織における線維芽細胞の YAP/TAZ の核内移行がケロイド形成において何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) マウス胎仔創傷治癒過程における YAP/TAZ の検討

胎生 13 日創作成後 24 時間後の創傷組織では創傷部、辺縁正常部ともに YAP,TAZ の核内移行像が認められたが、胎生 15 日、17 日 24 時間後の創傷組織では、創傷部では核内移行率が高かったが、辺縁正常部は細胞質への局在がほとんどであった(図 1)。

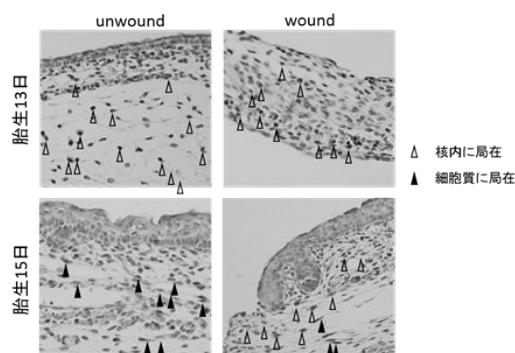


図 1 胎仔創傷における TAZ の局在検討

この局在の差から、YAP と TAZ の核内移行が胎生 13 日における scarless wound healing に関与している可能性が考えられた。現在 siRNA 導入下での胎仔創傷治癒モデル及び最終的には、YAP/TAZ の carrier として報告された SHP2 分子及び RAS-MAPK 経路と Wnt 経路を解析中である。

(3) 胎生 13 日、15 日、17 日胎仔皮膚由来線維芽細胞を用いた *in vitro* における YAP/TAZ の核内移行の検討

長期継代培養後のマウス毛乳頭細胞を用いた予備実験では、2 次元培養では、YAP が細胞質に局在しているのに対し、未分化能を獲得するとされる 3 次元培養では核内へ移行しているという結果が得られている(図 2)。細胞の未分化性の維持獲得に YAP/TAZ の核内への局在が関与する可能性を考え、胎生時期の違いによって核内移行への変化があるかを検証中である。

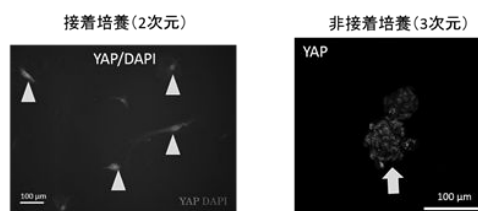


図 1 マウス新生仔毛乳頭細胞の 2 次元及び 3 次元培養における YAP の免疫染色像

(矢印: 核内移行、三角印: 細胞質)

scarless wound healing とされる胎生 13 日のマウス胎仔創傷や 3 次元培養下の未分化な細胞で、YAP/TAZ の核内移行が見られたため、周囲の環境で YAP/TAZ signaling が核移行することで癒痕形成に関与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 1 件)

1. Noriko Aramaki-Hattori, Keisuke Okabe, Mariko Hamada, Tamae Takato, Kazuo Kishi. Relationship between keloid and YAP(Yes-associated protein) /TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) signaling. PRS Global Open, accepted.

{ 学会発表 }(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 茉梨子(Hamada, Mariko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70723287