

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15057

研究課題名(和文)血管壁のメカノセンシングを起点とした新しい大動脈瘤発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Abnormal mechanosensing underlie aortic aneurysm formation

研究代表者

山城 義人(Yamashiro, Yoshito)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：70751923

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):大動脈瘤は血管壁が異常に拡張し、破裂・死に至る疾患である。その発生機序の詳細は不明であり、内科的治療法が確立されていない。したがって、大動脈瘤発生の分子メカニズムを解明し、治療法の開発へと結びつけることが喫緊の課題である。本研究では、細胞-基質間の相互作用を仲介する細胞外マトリクスThrombospondin-1(Thbs1)がメカニカルストレスに反応する分子であり、Thbs1の抑制が大動脈瘤発症の抑制に効果的であることを見出した。また、伸展刺激により血管平滑筋細胞から分泌されるThbs1が、インテグリンを介して転写調節因子YAPの核内移行を制御する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大動脈瘤は内科的治療法が確立されておらず、その開発のためには標的分子を明らかにすることが重要である。本研究では、血管のメカニカルストレス応答を担う細胞外マトリクスの役割と、大動脈瘤発生の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、Thbs1がメカニカルストレス応答を担うこと、大動脈瘤発症に関与することを明らかにした。今後、本研究を基盤として大動脈瘤の新しい治療法開発が期待できる。

研究成果の概要(英文):Thoracic aortic aneurysms (TAAs) are life-threatening diseases defined as a permanent abnormal dilatation of the thoracic aorta. Abnormal mechanosensing of smooth muscle cells (SMCs) has been suggested to drive the formation of TAAs, however, the precise molecular mechanism has not been elucidated. We found that the matricellular protein, Thrombospondin-1 (Thbs1), was highly upregulated in TAAs of human and mouse. Deletion of Thbs1 in aneurysm mice prevented the aneurysm formation. In addition, mechanical stretch-induced Thbs1 regulated nuclear translocation of Yes-associated protein (YAP). We thus proposed a mechanism of Thbs1-mediated mechanotransduction, may serve a potential therapeutic target for treating TAAs.

研究分野：血管生物学

キーワード：大動脈瘤 シグナル伝達 メカノトランスダクション 細胞外マトリクス Thrombospondin-1 YAP 細胞接着斑

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤は血管壁が異常に拡張し、破裂・死に至る疾患である。その発生機序の詳細は不明であり、内科的治療法が確立されていない。したがって、大動脈瘤発生の分子メカニズムを解明し、治療法の開発へと結びつけることが喫緊の課題である。血管は様々なメカニカルストレスに晒されながら、その機能を保っている。しかし、血管壁のメカニカルストレス応答(メカノセンシング)に関与する分子の詳細と大動脈瘤発生との関わりは明らかになっていない。申請者は、細胞外マトリクス Thrombospondin-1 (Thbs1) がメカニカルストレスに応答する分子であり、大動脈瘤血管壁で亢進している事を見出した (Yamashiro et al. *Sci. Signal.*, 2015)。さらに、1) Thbs1 は、大動脈瘤発生の初期に重要な働きをする細胞骨格リモデリングの上流因子として働くこと、2) 周期的伸展刺激によって Thbs1 が分泌され、細胞接着斑を構成すること、3) Thbs1 の抑制が大動脈瘤の改善に効果的であることを見出している (未発表; 申請当時)。よって、Thbs1 を介した血管壁のメカノセンシング機構を明らかにする事が、大動脈瘤発生の分子メカニズム解明に向けてブレイクスルーになると考えられる。

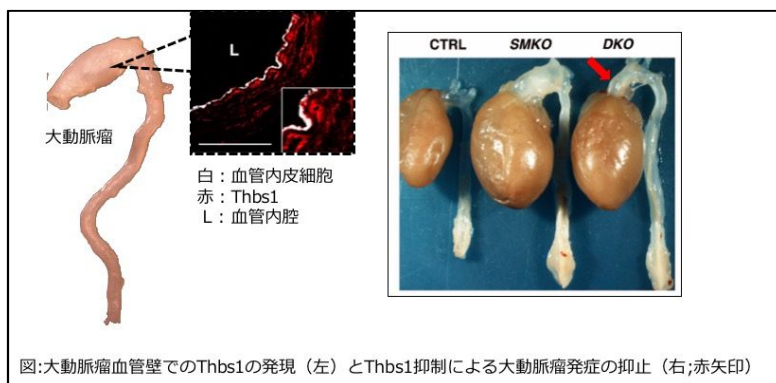
2. 研究の目的

本研究では、細胞-細胞間、細胞-基質間の相互作用を仲介する細胞外マトリクス Thbs1 に着目し、Thbs1 を介したメカノセンシング機構の解明と、Thbs1 を介した大動脈瘤発生に関与するシグナル伝達経路の全貌を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法と成果

(1) 大動脈瘤形成に関する細胞外マトリクスの同定

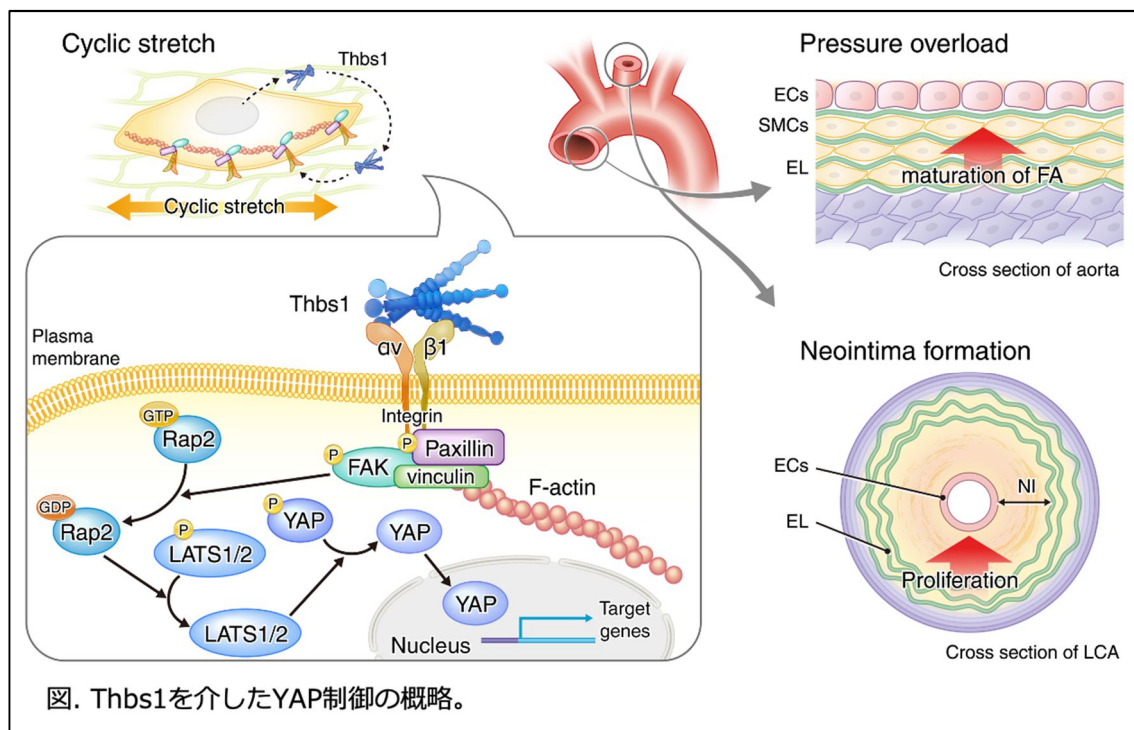
はじめに、生後 30 日目の大動脈瘤血管壁を Thbs1 抗体で免疫染色し、その局在を精査しました。正常(野生型)の大動脈では Thbs1 の発現はほとんど認められないのに対し、大動脈瘤では血管内皮細胞と血管平滑筋細胞に Thbs1 が高発現していた(下図; 左)。また、血管平滑筋細胞に対する周期的伸展刺激やアンジオテンシン II が、メカニカルストレス応答性の転写因子 Early growth response-1 (Egr1) を介して Thbs1 の発現を誘導していること、Fibulin-4 の欠損によってメカニカルストレスに対する反応が鋭敏になることを見出した。さらに、Thbs1 を遺伝的に欠損させると、病変部で見られた弾性線維と血管平滑筋細胞の結合障害が改善し、細胞骨格調整因子コフィリンの不活性化を伴って大動脈瘤の形成が抑止されることを見出した(右図; 右 DKO)。マウスを用いた解析と同じように、胸部大動脈瘤患者の血管壁では Thbs1 が高発現していることから、Thbs1 の抑制が大動脈瘤の治療に有効である可能性が示された。



(2) 細胞外マトリクスを介した新しいメカノトランスダクション機構の解明

本研究ではまず、ラット血管平滑筋細胞を用いて周期的伸展刺激 (20% strain, 1.0Hz, 20 時間) において分泌されるタンパク質を網羅的に解析し、Thrombospondin-1 (Thbs1) を含む、85 種類のタンパク質を同定した。Thbs1 が大動脈瘤病変で過剰に発現している先行研究の結果から、Thbs1 の役割に注目し、Thbs1 が伸展刺激後に細胞辺縁部の細胞接

着斑に局在することを観察した。次いで、伸展刺激により分泌されたThbs1が、細胞 - 細胞外マトリクスの接着を制御するintegrin $\alpha\beta1$ に結合することを、免疫染色、免疫沈降、近接ライゲーションアッセイを用いて明らかにした。ゲノム編集によりThbs1を欠損した細胞では、伸展刺激応答における接着斑の活性化が誘導されず、細胞骨格を形成するアクチンフィラメントの配向が崩れ、細胞張力が減少していることを、免疫染色、原子間力顕微鏡を用いた測定から明らかにした。細胞の数や器官のサイズはHippo-YAP経路というシグナル伝達経路によって制御される。遺伝子発現解析(RNA-seq)の結果、細胞増殖に関わる転写調節因子YAPの標的遺伝子の発現が、Thbs1欠損細胞では伸展刺激後も抑制されること、伸展刺激によるYAPの核内移行(活性化)にはThbs1が必要であることを見出した。また、YAPの核内移行は、Thbs1のintegrin $\alpha\beta1$ への結合と、低分子量Gタンパク質 Rap2の不活性化を伴って、Hippo経路依存的に制御されていた。さらに、マウスを用いた解析において、Thbs1欠損マウスは、横行大動脈縮窄術(TAC)による圧負荷により、血管の破裂・解離を引き起こす一方、頸動脈狭窄術による新生内膜の形成時に、新生内膜細胞の増殖を抑制することを明らかにした。これらの結果から、細胞のメカニカルストレス応答の中心を担う、転写調節因子YAPの活性化を、細胞外マトリクスThbs1が制御することが明らかとなった。さらに、Thbs1が制御するYAP活性化のシグナル伝達経路は、血管壁の圧負荷応答や、狭窄に伴う新生内膜形成時の血管リモデリングに重要な働きを示すことを明らかにした(下図)。



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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamashiro Yoshito, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 134
2. 論文標題 The molecular mechanism of mechanotransduction in vascular homeostasis and disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Science	6. 最初と最後の頁 2399 ~ 2418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/CS20190488	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 Shin Seung Jae, Hang Huynh Thuy, Thang Bui Quoc, Shimoda Tomonari, Sakamoto Hiroaki, Osaka Motoo, Hiramatsu Yuji, Yamashiro Yoshito, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 40
2. 論文標題 Role of PAR1-Egr1 in the Initiation of Thoracic Aortic Aneurysm in Fbln4-Deficient Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	6. 最初と最後の頁 1905 ~ 1917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/ATVBAHA.120.314560	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 Yamashiro Yoshito, Thang Bui Quoc, Ramirez Karina, Shin Seung Jae, Kohata Tomohiro, Ohata Shigeaki, Nguyen Tram Anh Vu, Ohtsuki Sumio, Nagayama Kazuaki, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 117
2. 論文標題 Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP in the vascular remodeling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9896 ~ 9905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1919702117	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 Sugiyama Kaori, Horigome Hitoshi, Lin Lisheng, Murakami Takashi, Shiono Junko, Yamashiro Yoshito, Matsuura Hiroyuki, Yoda Hitoshi, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 7
2. 論文標題 Novel ELN mutation in a Japanese family with a severe form of supravalvular aortic stenosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.986	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 Yamashiro Y, Thang BQ, Shin SJ, Lino CA, Nakamura T, Kim J, Sugiyama K, Tokunaga C, Sakamoto H, Osaka M, Davis EC, Wagenseil JE, Hiramatsu Y and Yanagisawa H.	4. 巻 123(6)
2. 論文標題 Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm in mouse and humans	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation Research	6. 最初と最後の頁 660-672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.118.313105	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 該当する

1. 著者名 Tsunezumi J, Sugiura H, Oinam L, Ali A, Thang BQ, Sada A, Yamashiro Y, Kuro-O M and Yanagisawa H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Fibulin-7, a heparin binding matricellular protein, promotes renal tubular calcification in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Matrix Biology	6. 最初と最後の頁 5-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matbio.2018.04.014	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 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yoshito Yamashiro
2. 発表標題 Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP signaling pathway in the remodeling of blood vessel.
3. 学会等名 The 84th Annual Scientific Meeting of Japanese Circulation Society (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城義人
2. 発表標題 血管リモデリングを制御する細胞外マトリクスを介したメカノトランスダクション
3. 学会等名 第93回 日本生化学学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshito Yamashiro, Bui Quoc Thang, Karina Ramirez, Seung Jae Shin, Tomohiro Kohata, Shigeaki Ohata, Tram Anh Vu Nguyen, Sumio Ohtsuki, Kazuaki Nagayama and Hiromi Yanagisawa.
2. 発表標題 Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP signaling pathway in the remodeling of vessel wall.
3. 学会等名 The 21st International Vascular Biology meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城義人
2. 発表標題 Thrombospondin-1を介した大動脈瘤血管壁の機械刺激応答と大動脈瘤形成における役割
3. 学会等名 第52回 日本結合組織学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山城義人
2. 発表標題 マトリクスメカノトランスダクションと血管リモデリング
3. 学会等名 CardioVascular and Metabolic Week 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城義人
2. 発表標題 メカノジャックで紐解く、血管のリモデリング
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 ワークショップ「生物情報はいかにして細胞の未来を紡ぐのか？」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshito Yamashiro
2. 発表標題 Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP signaling pathway in the remodeling of vessel wall
3. 学会等名 The 3rd JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshito Yamashiro
2. 発表標題 Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP signaling pathway in the remodeling of vessel wall
3. 学会等名 NAVB0: Vascular Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山城義人
2. 発表標題 Thrombospondin-1を介した大動脈瘤血管壁の機械刺激応答
3. 学会等名 日本結合組織学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshito Yamashiro
2. 発表標題 Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm
3. 学会等名 Phosphatase Workshop (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshito Yamashiro
2. 発表標題 Role of Thrombospondin-1 in Mechanotransduction and Development of Thoracic Aortic Aneurysm
3. 学会等名 Korea-Japan joint symposium for vascular biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshito Yamashiro
2. 発表標題 Role of Thrombospondin-1 in Mechanotransduction and Development of Thoracic Aortic Aneurysm
3. 学会等名 日本血管生物医学会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshito Yamashiro
2. 発表標題 Role of Thrombospondin-1 in Mechanotransduction and Development of Thoracic Aortic Aneurysm
3. 学会等名 GenTAC Aortic Summit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山城義人、柳沢裕美	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 70
3. 書名 医学のあゆみ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学 研究者総覧
<https://trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003664>
 筑波大学 注目の研究
<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p202004241400.html>
 研究室HP;論文掲載のお知らせ
<http://saggyouse.tara.tsukuba.ac.jp/complete-list-of-publications/>
 筑波大学 注目の研究
<https://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201808101400.html>
 研究室HP;論文掲載のお知らせ
<http://saggyouse.tara.tsukuba.ac.jp/blog/2018/08/10/1/>

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		
米国	Washington University	UT Southwestern Medical Center	
カナダ	McGill University		
ブラジル	Sao Paulo University		