

令和 6 年 10 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02683

研究課題名（和文）立体臓器形成・再生の力学恒常性を司るフィードバック分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular feedback mechanisms underlying mechano-homeostasis governing 3D organ formation and regeneration

研究代表者

清木 誠（Seiki, Makoto）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50226619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：幹細胞は細胞外基質の硬さに応じて特定の細胞に分化するが、同じ細胞であり続けるために逆に細胞外基質の硬さを維持し組織の恒常性を維持することから力学恒常性と呼ぶ。私たちは、転写共役因子YAPが、力学恒常性を担うことを初めて明らかにした。臓器形成や再生過程においてYAPが制御する力学恒常性は時空間的にダイナミックに制御され、その破綻は組織修復不全やがんにつながる。本研究により、3つのネガティブフィードバック遺伝子を同定した。現在、これらの遺伝子の生体での再生過程と臓器形成過程での役割を、それぞれメダカの尾ヒレ再生系と腸オルガノイドの解析系を用いて解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

YAPの一過性の活性化は再生を促進し、持続性の活性化はがん化・線維化を引き起こすが、YAPの一過性の活性化機構の理解は不十分である。私たちが見出したYAPがECMの力学特性を制御する力学制御機能が、細胞・ECM間の双方向性の力学相補性だけでなくネガティブフィードバックとしてYAPの一過性の活性化に貢献するという独自の視点から解析した。本研究で同定したYAPメカノホメオスタシス制御分子は、病態の慢性化・増悪化に寄与する可能性が高い。そのため、本分子は治療の標的ともなる。

研究成果の概要（英文）：Stem cells differentiate into specific cell types according to the stiffness of the extracellular matrix, but to remain the same cell type, they maintain the stiffness of the extracellular matrix and thus maintain tissue homeostasis, a phenomenon known as mechanical homeostasis. We have demonstrated for the first time that the transcriptional coactivator YAP is responsible for mechanical homeostasis. During organ formation and regeneration, the mechano-homeostasis controlled by YAP is dynamically regulated spatiotemporally, and its disruption leads to impaired tissue repair and cancer. In this study, we identified three negative feedback genes. Currently, we are analyzing the roles of these genes in the processes of regeneration and organ formation in vivo, using the medaka caudal fin regeneration model and the intestinal organoid analysis system, respectively.

研究分野：生化学

キーワード：YAP 力学恒常性 メカノホメオスタシス フィードバック

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は細胞外基質の硬さに応じて特定の細胞に分化するが、同じ細胞であり続けるために、逆に細胞外基質の硬さを維持して細胞分化増殖を制御し組織の恒常性を維持することから力学恒常性(メカノホメオスターシス; Mechano-homeostasis MH)と呼ぶ。私たちは、転写共役因子 YAP が、この細胞と細胞外基質間の双方向性の力学制御を介して恒常性を担うことを初めて明らかにし YAP メカノホメオスターシス(YAP-MH)と名付けた。臓器形成や再生過程において YAP が制御する力学恒常性は時空間的にダイナミックに制御され、その破綻は組織修復不全、がん、組織老化につながるが、その分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

シグナル経路活性化の時空間的ダイナミクスは何重ものポジティブ及びネガティブフィードバックにより精緻に制御され、必要な時に十分な強さの活性化とその後の速やかな不活化を担保している。一過性 YAP 活性化により臓器形成や再生・組織修復が起こる。臓器形成・再生過程での YAP-MH の一過性活性化の分子メカニズムと、それが臓器形成・再生に果たす役割を明らかにするために本研究を行った。

3. 研究の方法

成果に示したように、(1)YAP-MH フィードバック候補分子の同定と、(2)臓器形成・再生過程での YAP-MH 時空間的ダイナミクスと細胞の分化増殖の解析を行った。

4. 研究成果

研究 1: YAP-MH フィードバック候補分子の同定

YAP-MH フィードバック遺伝子は、YAP により直接転写が活性化され、かつ YAP 機能を制御するものである。YAP-MH フィードバック候補分子を同定するために、既知の YAP-MH 分子と複合体を作る 1953 個の蛋白を BioID 法で同定した。この YAP-MH ネットワーク分子の中で、46 の YAP 標的遺伝子を同定した。更に公共データも活用し、バイオインフォマティクス解析を用いて、上記の細胞シグナルのフィードバックとして働く可能性のある 39 遺伝子に候補を絞り込んだ。ポジティブ及びネガティブフィードバック分子であれば、培養細胞でノックダウンすれば、YAP 活性化がそれぞれ低下または、上昇するはずである。これらの遺伝子を siRNA 法でノックダウンすると、ネガティブフィードバック分子と考えられる遺伝子 ARHGAP11A と新規遺伝子を同定した。文献探索などにより、併せて1つのポジティブフィードバック分子と、8つのネガティブフィードバック分子を同定した。

研究 2: 臓器形成・再生過程での YAP-MH 時空間的ダイナミクス解析

(1) メダカ尾ヒレ再生系を用いた解析: 尾ヒレの切断という力学特性の急な変化に対して、ヒレの再生過程で YAP の活性化部位がダイナミックに変化する。ヒレ再生系は、①*in vivo*で臓器サイズ回復過程の解析が可能で、②組織が平たく透明で継続的なライブイメージングなどの時空間的な解析を行い易い利点がある。現在、生体で YAP 活性化を GFP で観察できるトランスジェニックメダカに ARHGAP11A と新

規遺伝子を過剰発現させ、YAP-MH の時空間的ダイナミクスやヒレの再生に変化が起こるかどうかの解析を進めている。

- (2) マウスミニ腸管を用いた YAP-MH 評価系の樹立と解析: ①小腸絨毛形成過程で YAP-MH が重要な働きを担う。ECM が硬い陰窩底部では YAP が活性化して幹細胞が維持され、幹細胞から分裂した娘細胞は ECM が柔らかい陰窩上部に移動し YAP が不活化され分化する(Gjorevski *et al.*, *Nature*, 539, 2016)。②YAP の活性化、力学測定が可能である。そこで、YAP 活性化を YAP-miRFP670 の核移行でリアルタイムに検出できるマウス(YAP の核移行の生体での可視化は困難であったが、トロント小児病院 Gu 博士が最近開発した系統)と、腸管幹細胞を *Igr-5:EGFP* レポーターで可視化できる系統を交配し、小腸オルガノイドを作製した。このオルガノイドに ARHGAP11A と新規遺伝子を Tet-ON システムで過剰発現させる系を樹立した。現在、オルガノイドを用いてミニ腸管を作製し、ARHGAP11A と新規遺伝子のノックダウンや過剰発現により、どのように YAP の活性化と腸管幹細胞の動態が変化するか解析を進めている。

以上の研究により同定した YAP-MH 時空間的ダイナミクス制御因子が、YAP の一過性活性化の制御を介して、臓器形成・再生に果たす役割を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	浅井 義之 (Asai Yoshiyuki) (00415639)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	浅岡 洋一 (Asaoka Yoichi) (10436644)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	徳永 雅之 (Tokunaga Masayuki) (10845043)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	
研究分担者	北川 孝雄 (Kitagawa Takao) (20614928)	北海道医療大学・先端研究推進センター・助教 (30110)	
研究分担者	田尾 嘉誉 (Tao Yoshitaka) (30425417)	山口大学・大学院医学系研究科・助教 (15501)	
研究分担者	有賀 隆行 (Ariga Takayuki) (30452262)	大阪大学・大学院生命機能研究科・准教授 (14401)	

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 分 担 者	古元 礼子 (Furumoto Hiroko) (70311818)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	

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