

論文の内容の要旨

論文題目 肺発生における転写共役因子 TAZ/YAP の解析

氏名 砂金 秀章

哺乳類の肺発生は、気管支形成 (bronchial morphogenesis) と、肺胞形成(alveolarization)の二つのプロセスによって成り立っている。気管支形成は胎児期に進行し、最終的に高度に分岐した樹状の気管支構造が完成するが、このプロセスには内胚葉と中胚葉の interaction が不可欠であり、また Wnt、TGF- β /Bmp、FGF-Shh といった複数のシグナル経路が時間的・空間的に共同して関与していることが報告されている。また肺胞形成は胎児期から出生後まで続くプロセスであり、末梢肺で気管支末端に一次隔壁・二次隔壁が形成されることで成熟した肺胞が形成され、肺の表面積の増加が起こり、呼吸器としての機能が完成する。このプロセスでは、上皮の増殖と分化、上皮・間葉間の相互作用、細胞外基質の増生などが同時に進行しており、前述の Wnt 経路、TGF- β 経路に加え、Notch 経路が関与していることが報告されているが、その全容には未解明の部分が多い。

Hippo pathway は2003年に発見された比較的新しい、進化的に保存されたシグナル経路である。この経路は発見以来、細胞増殖・細胞死・細胞分化制御・発生・発がん・細胞極性など、様々な細胞の機能にかかわっていることが明らかとなっており、近年注目を集めている。また、細胞増殖や幹細胞の self-renewal・分化多能性に関与することから、肺癌や間質性肺疾患、COPD といった肺疾患の病態機序との関連が指摘されている。

転写共役因子 TAZ・YAP は、この Hippo pathway の中核をなすエフェクタータンパク質であり、上流のシグナル因子からの刺激を受けて核内と細胞質の間を往来する。核内においては、転写因子 TEAD などと共役して、細胞の増殖・分化等にかかわる下流の遺伝子群を発現させる。TAZ・YAP は互いに構造のよく似たタンパク質であり、分子量のより小さな TAZ は多くの研究において YAP のパラログとみなされているが、肺においては Taz のノックアウトマウス (Taz KO マウス) が肺に気腫性変化を呈するというユニークな表現型を呈す一方、Yap のノックアウトマウスは胎生致死であり、その肺上皮特異的なコンディショナルノックアウトマウスは気管支の分岐不全をきたすことが報告されている。このように肺において、Taz と Yap はそれぞれ独自の役割を持っていることが推測されていたものの、これまで両者を直接比較した研究はなかった。

本研究では、Taz・Yap の肺上皮特異的なコンディショナルノックアウトマウス(CKO マウス)を、同じプロモーターをコンディショナルノックアウトに用いてそれぞれ作出することで、肺の

発生における両者の役割の違いを、様々な段階で直接比較した。

作出された **Taz CKO** マウスは外見上正常に出生・成長し、妊孕性は保たれていた。生後 12 週において解剖したところ、肺に著明な気腫性変化が認められた。続いて **Taz CKO** マウス肺の生理機能検査を行ったところ、コンプライアンスの顕著な上昇を認め、気管支肺胞洗浄液(BALF)の解析では炎症細胞の増加が認められた。これらの結果から、**TAZ CKO** マウスは **TAZ KO** マウスで報告された肺の特徴とほぼ同様の表現型を呈していることが確認された。またこの表現型の相似から、**Taz KO** マウスで見られた肺気腫様の表現型は、肺胞期の肺の上皮での **Taz** の欠失に由来する可能性が強く示唆された。

一方作出された **Yap CKO** マウスは、出生後死亡することが確認されたため、表現型を確認するために **Yap CKO** マウスの胎児肺の解析を行った。発生の様々な段階で **Yap CKO** 胎児肺を摘出し、病理標本を作製した。その結果、**Yap CKO** 胎児肺は E14.5 の段階から、野生型同胞のコントロールと比較して気管支の分岐が極めて未熟であることがわかった。発生の進行にしたがってそれはますます顕著となり、出生直前の E18.5 の時点においても気管支の分岐や肺胞構造はほとんど認められず、肺全体が薄壁の嚢胞で置換されるという気管支分岐の破綻が確認された。これらの結果から、肺の発生で、肺上皮での **YAP** 発現は正常な気管支分岐に必要不可欠であり、さらに **YAP** は肺の発生において、**TAZ** よりもより初期の気管支形成に作用し、気管支分岐の正常な形成に必要であることが示唆された。

二つの **CKO** マウスの表現型から、肺の発生における **Yap** と **Taz** の役割について時間的な相違がある可能性が示唆されたため、正常な肺の発生における **Taz** と **Yap** の発現量の推移について経時的な比較を行った。野生型マウスの発生過程において、胎児期から成体までの肺における **Taz** と **Yap** の発現を、Western blotting で調べたところ、**Yap** は E14.5 に最もその発現が増加しており、**Taz** は E18.5 から出生後の P5 にかけてその発現のピークがあることが確認された。この結果から、**Yap** は肺発生の早期の気管支形成において、**Taz** は肺発生の後期の肺胞形成において、それぞれの段階での肺発生のプロセスにおいて深く関与していることが示唆された。

次に **Yap CKO** マウス肺発生における気管支分岐の異常に着目し、肺上皮における転写共役因子 **Yap** の欠失がどのような機序で気管支分岐の破綻をもたらしているのかについてその原因を探索した。E14.5 の **Yap KO** 肺を実体顕微鏡下で摘出して total RNA を抽出し、既知の気管支形成に重要とされている遺伝子群の発現を RT-PCR で確認した。その結果、E14.5 **Yap CKO** 胎児肺では Fibroblast growth factor 10 (FGF-10)の発現が有意に増加しており、また Sonic Hedgehog (Shh)の発現が有意に減少していた。肺発生において気管支分岐先端の間葉で発現する FGF-10 と、肺上皮で発現する Shh はフィードバックループを形成していることが知られ、この相互作用によって気管支の分岐・伸長が制御されていることが報告されている。Shh 下流の遺伝子群と、FGF-10 の下流遺伝子群の発現を確認すると、Shh 下流の遺伝子の一部で減少傾向が認められた。FGF-10 下流の遺伝子群は発現の変動を認めなかった。これらの結果から、FGF-10・Shh の間葉・上皮間のフィードバックループの破綻が、**Yap CKO** 肺の気管支分岐異常の機序の一つとして考えられた。

さらに実際に FGF-10 と Shh が Yap CKO 肺でどのように発現しているかを確認するため、E18.5 Yap CKO 胎児肺を摘出し、それぞれの抗体で免疫染色を行った。その結果 Yap CKO 肺において、FGF-10 の発現の増加と、Shh の発現の減少が確認され、qPCR で示されたようにこれらの遺伝子の発現バランスの異常が確認された。これらの結果から、胎生肺で実際に気管支形成の末端において qPCR によって示唆された FGF-10 と Shh の不均衡が実際に確認され、Yap CKO マウスの気管支形成の破綻の原因が、これらの分子のフィードバックループの破綻に起因する可能性がさらに強く示唆された。

一方 Taz CKO 胎児肺で、Yap CKO 肺で認められたような FGF-10 と Shh の発現の不均衡がみとめられるかについて調べた。その結果、E14.5 と E18.5 胎児肺において、qPCR で Yap CKO 肺のような FGF-10・Shh の発現の有意な変動は認められなかった。この結果から、Taz と Yap は肺発生において異なる役割を担っていることが示唆され、また Yap は Yap 特異的な経路で FGF-10・Shh のフィードバックループに関与している可能性が考えられた。

次に Taz, Yap の役割を *in vitro* で比較するため、肺上皮培養細胞を用いて細胞実験を行った。既報において Taz は細胞増殖を阻害し、またその下流において Ctgf の発現を促進することが報告されており、本実験では Yap と Taz との機能の比較を目的に細胞実験を行った。まずマウス肺腺腫細胞 LA-4 において siRNA を用いた Taz, Yap の knockdown 系をそれぞれ確立した。knockdown 系では代表的な Taz Yap の下流遺伝子である Connective tissue growth factor (Ctgf) の発現が減少することが確認された。またこの knockdown 系で細胞活性を評価する MTT assay を行い、Taz, Yap のいずれの knockdown も細胞活性を低下させることを確認した。これらの点では Taz・Yap の機能の差異はみられなかった。

マウス実験の結果を踏まえて、A549 細胞で TAZ・YAP の knockdown を行い、SHH 発現との関係について調べた。その結果、TAZ, YAP の knockdown はどちらも A549 細胞において SHH の発現を有意に低下させることが確認された。また TGF- β 刺激で SHH 発現が増加し、TAZ, YAP の knockdown でその増加は認められなくなることが確認された。FGF-10 刺激では、Shh の増加は認められなかった。この細胞実験は Yap CKO マウスにおける気管支分岐異常において、肺上皮細胞で Yap が発現していることが Shh の発現に必要であるという仮説を強く支持しており、また Yap CKO 胎児肺の肺上皮において TGF- β 刺激に対する不応性が認められたという先行論文の報告とも一致し、Yap CKO 肺の気管支分岐の破綻の機序が Shh の発現減少にあるという仮説を支持するものであった。さらに siRNA による Knockdown 系を用いて、A549・BEAS-2B の mRNA microarray assay を行った。その結果 Taz・Yap の多数の新規下流遺伝子候補を同定することができた。これらの遺伝子の中にマウス実験で確認された表現型の差が説明できるような発生に関する遺伝子は認められなかったものの、今後詳細な解析を追加することにより、更なる Hippo pathway 経路の解明が期待される。

本研究によって、肺発生の過程において Yap は気管支形成期に、Taz は肺胞期に肺上皮で発現のピークを持ち、それぞれの時期の正常な肺の発生に不可欠な役割を果たしていることが明らかとなった。また本研究と先行研究より、Taz のエフェクターとして CTGF、YAP のエフェクター

として **Shh** が考えられ、それぞれの **CKO** マウスの表現型に関与していると考えられた。

本研究から、肺上皮細胞において、**TGF- β** 刺激により **Shh** の発現が誘導される新規の経路の存在が示され、**TAZ** と **YAP** がその系に関与している可能性が示唆された。

肺における **TAZ**, **YAP** の機能の差の有無と下流の遺伝子、またそれぞれの発現時期を調整している上流因子については今回同定することができず、更に検討が必要である。また **Taz CKO** マウスは、肺気腫モデルマウスとして **Taz KO** マウスが持っていた腎機能低下による離乳までの死亡率の高さというこれまでの欠点を克服していることが確認された。このためより優れた肺気腫の動物モデルとなり得るが、その表現型形成の機序については不十分であり、今後更なる解析が必要である。