

審査の結果の要旨

氏名 砂金 秀章

本研究は、Hippo pathway のエフェクターであり、哺乳類の肺発生において重要な役割を果たすことが示唆されている Taz と Yap の肺における機能を明らかにするため、肺上皮特異的な Taz と Yap のコンディショナルノックアウトマウス(CKO マウス)を作出し、また培養細胞系で Taz, Yap を knockdown することで両者の比較を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 作出した Taz CKO マウスは、生後 12 週で肺に著明な気腫性変化が認められ、肺コンプライアンスの上昇、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の増加といった、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することが示された。この表現型の相似から、Taz は主に肺上皮において肺胞形成に携わっている可能性が示唆された。
2. 作出した Yap CKO マウスは、気管支形成の初期から気管支の分岐が極めて未熟であり、最終的に肺全体が薄壁の嚢胞で置換されるという表現型を示すことが確認された。この表現型から、肺の発生で、肺上皮における Yap 発現は正常な気管支分岐に必要な不可欠であり、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。
3. Yap CKO マウス胎児肺における遺伝子発現の解析により、Yap CKO 肺では Shh 発現が減少する一方で FGF-10 の発現が増加していることがリアルタイム PCR・免疫染色によって確認された。この結果から気管支形成における 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として示唆された。
4. 野生型マウスの肺発生過程において、胎児期から成体までの肺における Taz と Yap の発現が、Yap は E14.5 に発現が最も増加している一方、Taz は E18.5 から出生後の P5 にかけて発現のピークがあることが Western blotting で示された。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に深く関与していることが示唆された。
5. 肺上皮培養細胞を用いて細胞実験が行われ、マウス肺腺腫細胞 LA-4 において siRNA を用いた Taz, Yap の knockdown 系が構築された。この系で、Taz, Yap どちらの knockdown も、代表的な Taz・Yap の下流遺伝子である Ctgf の発現を減少させることが確認された。またこの knockdown 系で細胞の増殖能を評価する MTT assay を行い、Taz, Yap の両方で細胞増殖能が低下することを確認した。これらの点において Taz・Yap の機能に差異はみられなかった。

6. CKO マウスの実験結果に関連して A549 細胞で TAZ・YAP の knockdown を行った結果、TAZ, YAP どちらの knockdown 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 A549 への TGF- $\beta$  刺激で SHH 発現が増加するが、TAZ, YAP の knockdown でその増加が認められなくなることが確認された。この結果は Yap CKO マウスにおける気管支分岐異常において、肺上皮細胞での Yap 欠失が Shh の減少をもたらすという観察と一致しており、また Yap CKO 胎児肺の肺上皮において TGF- $\beta$  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するものであり、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。
7. siRNA による knockdown 系を用いて、A549・BEAS-2B の mRNA microarray assay を行った。その結果既知の下流遺伝子群に加え、多数の Taz・Yap の新規下流遺伝子候補が同定された。しかし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。

以上、本論文は肺発生における Taz と Yap の新たな役割を明らかにし、また TGF- $\beta$  と Shh という二つの重要なシグナル因子を結ぶ新たな経路の存在を示唆した。本研究は肺発生と肺疾患の病態機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。