

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 上村 駿  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 1091 号  
学位授与の日付 令和 4 年 9 月 20 日  
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
博士論文名 YAP1/TAZ activity maintains vascular integrity and organismal survival.  
(YAP1/TAZ 活性は血管の恒常性と生体の生存に重要である)

論文審査委員 主査 教授 平島 正則  
副査 教授 猪又 孝元  
副査 准教授 三上 剛和

### 博士論文の要旨

#### 背景と目的

電離放射線 (IR) は DNA 損傷や酸化ストレスを誘導することでがん細胞に対して細胞死を引き起こす。放射線治療はこの生物学的影響を利用することで、がん患者に対する主要な治療選択肢の 1 つとなっている。しかし IR はがん細胞だけでなくその周囲の組織にも障害を引き起こす。血管内皮細胞 (EC) も IR による障害を引き起こす細胞の一つである。しかしどのように IR が血管内皮障害を引き起こすかは完全に解明されていない。

Hippo シグナル伝達系は生物種間で進化的に保存された経路である。そのエフェクター遺伝子である YAP1 とそのホモログである TAZ (YAP1/TAZ) は転写共役因子であり、様々な臓器において組織の発生や再生、発がん重要な役割を果たす。これまでの研究で YAP1/TAZ は発生期の EC の機能に重要な働きを有していることが示されている。しかし成体の EC において YAP1/TAZ が生理条件下やストレス下で果たす役割は十分に解明されていない。

申請者らは EC における YAP1/TAZ の生理的な機能と、YAP1/TAZ が IR 後に果たす役割について検索した。

#### 方法

8 週齢の定常状態もしくは非致死量放射線 (5 Gy) を照射したマウス (C57BL/6J) を解析に用いた。YAP1/TAZ の機能解析には Cdh5-CreERT2; Yap1<sup>f1/f1</sup>; Taz<sup>f1/f1</sup> のマウスを用いた。このマウスに 8 週齢からタモキシフェン (TAM) を 5 日間投与することで成体で EC 特異的に YAP1/TAZ を欠損するマウス (Yap1/Tazi  $\Delta$ EC: Cdh5-CreERT2; Yap1  $\Delta/\Delta$  Taz  $\Delta/\Delta$ ) を作成した。EC の単離には肺組織にコラゲナーゼ酵素処理を施した後、蛍光抗体染色を行いフローサイトメトリー法を用いて EC 分画 (CD45<sup>-</sup>, Ter119<sup>-</sup>, PDGFR $\alpha$ <sup>-</sup>, CD31<sup>+</sup>, Sca1<sup>+</sup>) をソーティングした。EC における YAP1/TAZ の標的遺伝子の発現は定量 RT-PCR 法によって評価した。また、RNA-seq を用いて EC のトランスクリプトーム解析を行なった。組織学的解析には各臓器の HE 染色標本を用いて評価した。また生体内の臓器評価には Micro-CT を用いた。

#### 結果

YAP1/TAZ の EC における機能を理解するためにまず Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスの生存期間を解析した。雄の

Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスでは TAM 投与後の生存期間が著しく短かった (生存期間中央値=125.0 日)。一方で雌の Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスでは 150 日間で 5 匹中 1 匹だけしか死亡しなかった。その観察期間、Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスでは体重が有意に大きく、それは雄で顕著だった。この雄の Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスの死因を調べるために TAM 投与 4 週後に micro-CT を行ったところ、水の貯留と心拡大を認めた。この表現型は雌よりも雄のマウスで顕著であった。さらに各臓器の HE 染色標本では肺胞壁の毛細血管拡張と肝臓の中心静脈と類洞の拡張を認めた。皮膚では血管とリンパ管の拡張を認め脈管の透過性亢進が示唆された。このことから YAP1/TAZ は特に雄において全身の血管の機能と循環を保つために重要だと考えられた。

血管の機能は放射線照射で損なわれること、また YAP1/TAZ は放射線や抗がん剤などのストレスで活性化することが報告されている。そこで申請者らは EC の YAP1/TAZ が IR により活性化されるかを調べた。5Gy の IR 後に肺 EC を単離し YAP1/TAZ 標的遺伝子 (Ctgf, Cyr61) の発現変化を定量 RT-PCR で調べた。これら Ctgf や Cyr61 の発現は IR 後 24 時間で有意に最大となった。IR は EC の YAP1/TAZ を活性化させることが示唆された。

IR による EC の YAP1/TAZ 活性化の生物学的影響を調べるため、IR 後の Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスの生存を調べた。すべての対照群マウスが垂致死量の IR (5Gy) 後に生存していたのに対し、全ての Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスは性別に関係なく 10 日以内に死亡した。さらに IR によって雄雌両方の Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスで有意な体重増加が観察された。Micro-CT 解析では IR 後の Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスでは定常状態よりも大量の胸水および心肥大が確認された。組織学的解析では肺の肺胞壁の毛細血管の拡張と肝臓の中心静脈と類洞の拡張がより顕著となった。さらに定常状態と比べて顕著に皮膚の血管とリンパ管の拡張と浮腫が認められた。これらの結果を総合すると、EC における YAP1/TAZ の活性化は IR による血管の恒常性を保つために重要であり、YAP1/TAZ が欠損することで IR 後に全身浮腫、循環不全、最終的に死亡に至ることが分かった。

Yap1/Taz の欠損が EC に与える影響をトランスクリプトームのレベルで解析するために Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスと対照群から単離した肺 EC の RNA-seq 解析を施行した。主成分解析 (PCA) では、Yap1/Tazi  $\Delta$ EC の EC では対照群とは異なるトランスクリプトームを有することが分かった。次に変動遺伝子 (DEGs) の解析では Yap1/Tazi  $\Delta$ EC で対照群と比べて発現上昇している遺伝子が 432、および低下している遺伝子が 469 同定された。これら DEG に対して KEGG パスウェイ解析を行うと細胞周期に関連する遺伝子が上昇しており、タイトジャンクション関連遺伝子が低下していることが示された。GSEA 解析では Yap1/Tazi  $\Delta$ EC では YAP1 関連遺伝子が有意に低下していること、Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスの EC でタイトジャンクション関連遺伝子が有意に低下していることが確認された。このことから Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスにおける血管内皮障害のメカニズムとして EC のタイトジャンクションの異常があることが推測された。

#### 考察 (と結論)

本研究では YAP1/TAZ が性差とストレスに依存して血管の機能と生体の生存に重要な働きを有していることが分かった。性ホルモン受容体の下流に YAP1/TAZ が関わっていることが報告されており、雄の Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスでのみ定常状態の血管機能異常が生じた理由である可能性がある。また IR 後は性差に依存せず Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスが死亡した。IR 後は EC の過剰な p53 活性化は血管の構造と機能が損なわれることが報告されている。このことから YAP1/TAZ 活性化が p53 を抑制している可能性はある。さらに RNA-seq 解析ではタイトジャンクション関連遺伝子が Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスの EC で同定された。タイトジャンクションは血管透過性など様々な EC の機能に関わるため、YAP1/TAZ がタイトジャンクションの維持に重要であることが示唆された。

本研究では成体の EC では YAP1/TAZ が重要な働きを有することが分かった。YAP1/TAZ を薬理的に活性化することは IR によって血管内皮障害を予防する治療に発展する可能性がある。

#### 審査結果の要旨

がん患者に対する電離放射線（IR）治療は血管内皮細胞（EC）に障害を引き起こす。申請者は、Hippo シグナル伝達系のエフェクター分子である YAP1 と TAZ について、成体の EC における生理的な機能と IR 照射後に果たす役割について解析した。タモキシフェン誘導性 EC 特異的 YAP1/TAZ 欠損（Yap1/Tazi  $\Delta$ EC）マウスを複製・解析したところ、雄マウスで生存期間が著しく短縮し、体重増加を伴い、micro-CT 解析で水の貯留と心拡大を認めた。病理組織学的解析で脈管の拡張を認め、透過性亢進が示唆された。次に、5Gy の IR 後に解析を行ったところ、YAP1/TAZ 標的遺伝子の発現は 24 時間後に最大となった。Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスにおいて、有意な体重増加、大量の胸水および心肥大、脈管の拡張と浮腫が認められた。Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウス肺 EC の RNA-seq 解析で 432 遺伝子の発現上昇および 469 遺伝子の発現低下を同定して、パスウェイ解析や GSEA 解析で細胞周期関連遺伝子の上昇およびタイトジャンクション関連遺伝子の低下を明らかにした。このことから Yap1/Tazi  $\Delta$ EC マウスにおける血管内皮障害のメカニズムとして EC のタイトジャンクションに異常があることが推測された。

本研究によって、YAP1/TAZ が成体の EC で重要な働きを有することが明らかになり IR による血管内皮障害の治療標的となる可能性を示した点で意義は高く、博士論文としての価値を認める。