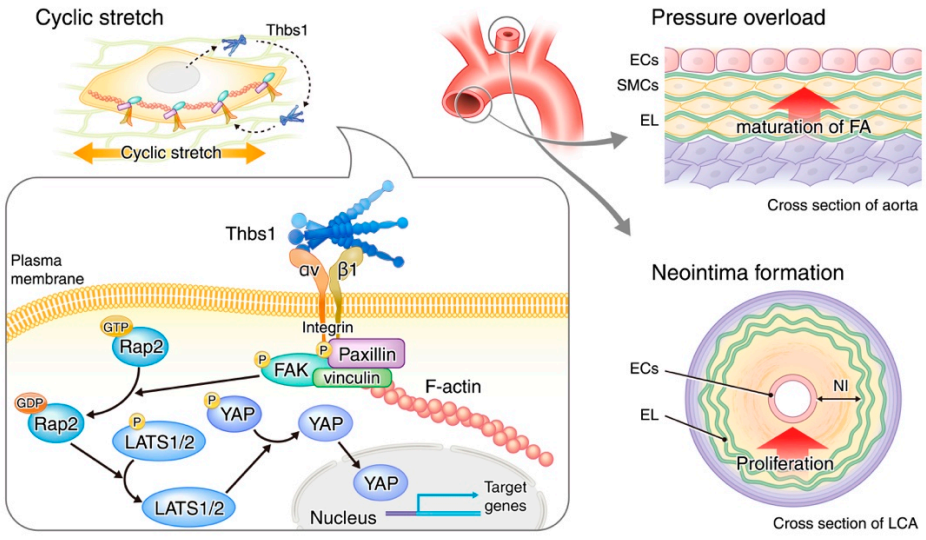
160　血管壁のメカニカルストレス応答機構の解明	山城　義人

【目的】血管壁は絶えずメカニカルストレス（血圧や血流による血行力学的応力）に晒されており、その制御機構の破綻が血管病態の根本原因ではないかと注目されている。細胞が外力を感知し、応答する仕組み（メカニカルストレス応答）とそのシグナル伝達（メカノトランスダクション）は、細胞外マトリクスと細胞接着斑、または細胞表面受容体を介して細胞内に伝搬されるが、その制御メカニズムの詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、血管のメカノトランスダクション機構における細胞外マトリクスの役割と、血管病態発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的として遂行した。

【方法】始めに、ラット血管平滑筋細胞を用いて周期的伸展刺激（20% strain、1.0 Hz、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、Thbs1 を含む 85 種類のタンパク質を同定した。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、分泌された Thbs1 が細胞膜上の Integrin αvβ1 に結合し、接着斑の活性化やアクチンフィラメントの配向といった伸展刺激応答を制御することを見出した。免疫染色、原子間力顕微鏡を用いた測定から、*Thbs1* 欠損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明らかにした。Thbs1 が誘導する細胞内のシグナル伝達経路を特定するために、遺伝子発現解析（RNA-seq）を行った。器官のサイズや細胞増殖に関わる転写調節因子 Yes-associated protein（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 が必須であることを見出した。また、YAP の核内移行は、Thbs1 の Integrin αvβ1 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ることが示唆された。さらに、*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・乖離を引き起こすこと、Thbs1／Integrin／YAP のシグナル伝達経路が、血管狭窄時の新生内膜細胞の増殖を制御することを明らかにした。

【結果】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 が制御することを明らかにした。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。

伸展刺激応答における Thrombospondin-1 を介した YAP の活性化（核内移行）制御の概略



160. 血管壁のメカニカルストレス応答機構の解明

山城　義人

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター

Key words：細胞外マトリクス，メカノトランスダクション，Thrombospondin-1，YAP，血管リモデリング

緒　言

血管壁は絶えずメカニカルストレス（血圧や血流による血行力学的応力）に晒されており、その制御機構の破綻が血管病態の根本原因ではないかと注目されている。細胞が外力を感知し、応答する仕組み（メカニカルストレス応答）とそのシグナル伝達（メカノトランスダクション）は、細胞接着斑または細胞表面受容体を介して細胞内に伝搬されるが、その制御メカニズムの詳細は明らかになっていない。とりわけ、メカノトランスダクションを制御する“細胞内”の分子の役割については多くの報告がなされているが、“細胞外”の分子の役割についてはほとんど不明である。我々はこれまでに、大動脈瘤においてメカニカルストレス応答異常と細胞骨格のリモデリングが瘤の形成に重要な役割を担っていること［1］、大動脈瘤病変で細胞外マトリクス Thrombospondin-1（Thbs1）が過剰に発現していること、また Thbs1 の抑制が大動脈瘤発症の抑止に効果的であることを示してきたが［2］、血管のメカノトランスダクション機構における細胞外マトリクスの役割と、血管病態発症の分子メカニズムの詳細は明らかになっていない。

そこで本研究では、血管のメカノトランスダクション機構における細胞外マトリクスの役割と、血管病態発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的として遂行した。まず始めにラット血管平滑筋細胞を用いて、周期的伸展刺激によって分泌されるタンパク質を網羅的に解析し、Thbs1 を同定した。分泌された Thbs1 は細胞膜上の Integrin $\alpha v \beta 1$ に結合し、接着斑の活性化やアクチンフィラメントの配向といった伸展刺激応答を制御することを見出した。加えて、伸展刺激における転写調節因子 Yes-associated protein（YAP）の核内移行は、Thbs1／Integrin $\alpha v \beta 1$ に依存し、低分子量 G タンパク質 Rap2 の不活性化を伴って制御されていることを明らかにした。さらに、Thbs1／Integrin／YAP のシグナル伝達経路は、血管圧負荷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。本研究の成果は、2020 年 5 月 5 日付 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 誌で公開されている［3］。

方　法

1. *In vitro* における周期的伸展刺激応答解析

ラット平滑筋細胞（Lonza、R-ASM-580）は 20%FBS と抗生剤（100 U/ml Penicillin、100 μg/ml Streptomycin、250 ng/ml Amphotericin B）を含む DMEM 培地で培養した。3×10^4細胞をシリコン製のストレッチチャンバー（SC4Ha、Menicon Life Science）に播種し、一軸方向の伸展装置（筑波大学医学工作室）にて、20% strain、1.0 Hz （60 cycles/min）、8 時間または 20 時間の条件で行った。伸展後、培養上清を回収し、質量分析計（Nano LC-ESI-MS/MS、SCIEX）を用いてタンパク質を同定した。また、シリコンチャンバー上の細胞は、免疫染色、近接ライゲーションアッセイ、免疫沈降法、ウェスタンブロット、定量的 PCR、RNA-seq 解析や原子間力顕微鏡解析（Nano Wizard IV AFM、JPK Instruments-AG）に使用した。

2. 血管障害マウスモデルを用いた解析

8 週齢の野生型もしくは Thbs1 ノックアウトマウス（B6. 129S2-*Thbs1*^{tm1Hyn}/J、 Jackson laboratory）に横行大動脈縮窄術（TAC）を施し、縮窄による圧負荷モデルを作製した。5 週間後、上行大動脈を採集し、組織学解析、免疫染色を行った。また、同様に 8 週齢のマウスに頸動脈結紮術を施し、血管を狭窄させ新生内膜形成モデルを作製した。1～4 週間後に頸動脈を採集し、組織学解析、免疫染色を行った。

結果および考察

1. 伸展刺激により分泌された Thbs1 は Integrin αvβ1 に結合する

ラット血管平滑筋細胞を用いて周期的伸展刺激（20% strain、1.0 Hz、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、Thbs1 を含む 85 種類のタンパク質を同定した。Gene Ontology 解析（http://geneontology.org/）や分子間相互作用解析（Ingenuity pathway analysis、IPA）の結果、これらのタンパク質は細胞外マトリクスと細胞接着斑の相互作用に関連することが示唆された。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［2］から、Thbs1 の役割に注目した。はじめに、核周辺の小胞体-ゴルジ体に局在する Thbs1 が伸展刺激後に細胞辺縁部に観察されることから、分泌された Thbs1 が細胞表面の受容体に作用している可能性が示唆された（図 1）。次に、伸展刺激後の Thbs1 が細胞接着斑分子パキシリンと共局在することから、Thbs1 が細胞辺縁部の細胞接着斑に局在することが強く示唆された。Integrin 抗体を用いた免疫染色、免疫沈降、近接ライゲーション法による解析から、伸展刺激により分泌された Thbs1 が Integrin αvβ1 に結合することを明らかにした（図 1）。

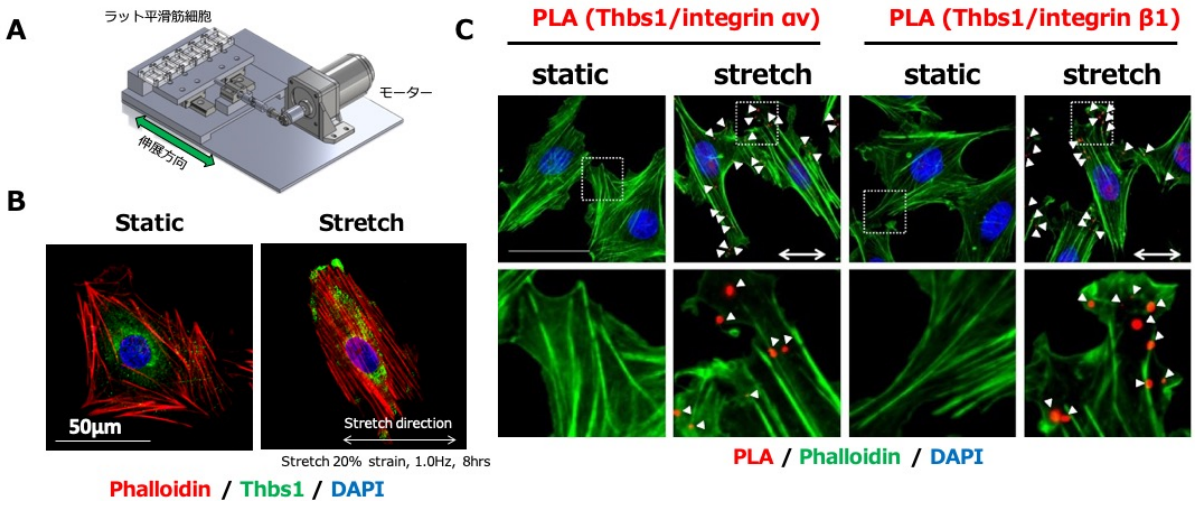


図 1. 周期的伸展刺激後の Thbs1 の局在

A) 細胞伸展装置の模式図。

B) 伸展前（Static）と伸展後（Stretch）の Thbs1 の局在。アクチンフィラメント（赤）、Thbs1（緑）、核（青）。伸展刺激後に Thbs1 は細胞辺縁部に局在している。スケールバー：50μm。

C) 近接ライゲーション法（PLA）による Thbs1 と integrin αv もしくは integrin β1 の相互作用解析。PLA 陽性（赤）、アクチンフィラメント（緑）、核（青）。伸展刺激後（Stretch）に Thbs1 と integrin αv もしくは integrin β1 が近位に局在している。スケールバーは 50μm。

2. *Thbs1* 欠損細胞は、伸展刺激応答における接着斑の活性化、アクチンフィラメントの配向を制御できない

次に、CRISPR／Cas9 ゲノム編集法を用いて *Thbs1* 欠損ラット平滑筋細胞（以後、*Thbs1* 欠損細胞）を樹立し、*Thbs1* の欠損が伸展刺激応答に与える影響を検討した。細胞は、一軸の伸展方向に対して対角に配向することが知られているが［4］、*Thbs1* 欠損細胞ではその配向が失われることが観察された。また、接着斑の活性化には、ビンキュリンが Integrin とアクチンフィラメントを繋ぐハブの役目を担うため、アクチンフィラメントの先端に局在することが知られているが［5］、*Thbs1* 欠損細胞では、伸展刺激時に観察される接着斑の活性化が生じていなかった。これらの知見は、*Thbs1* 欠損細胞が伸展刺激に応答できず、配向や接着斑の活性化による細胞張力を維持できていない可能性を示唆している。そこで、伸展刺激後の細胞張力を測定するため、野生型と *Thbs1* 欠損細胞を原子間力顕微鏡を用いて解析した。驚いたことに、*Thbs1* 欠損細胞はアクチンフィラメント上のヤング率（弾性力）が低く、細胞張力を維持できていないことが明らかとなった。

3. 伸展刺激で誘導される転写調節因子 Yes-associated protein（YAP）の核内移行と Thbs1 による制御の検討

伸展刺激で誘導される遺伝子発現と、*Thbs1* 欠損による影響を解析するため、野生型と *Thbs1* 欠損細胞を用いて、伸展刺激の有無における RNA-sequence 解析を行った。伸展刺激により誘導される YAP の標的遺伝子発現が、*Thbs1* 欠損細胞では抑制されていたことから、Thbs1／Integrin αvβ1 の下流は YAP が制御するシグナル伝達経路であることが示唆された。次に免疫染色にて YAP の局在を観察したところ、確かに *Thbs1* 欠損細胞では伸展刺激で誘導される YAP の核内移行が抑制されていることが明らかとなった（図 2）。また、*Thbs1* 欠損細胞の培養上清にヒト THBS1 のリコンビナントタンパク質を加えると、YAP の核内移行が観察されるようになることから、伸展刺激が誘導する YAP の核内移行は Thbs1 依存的であることが明らかとなった。近年、YAP の核内移行を制御する低分子量 G タンパク質として Rap2 が同定されたことから［6］、伸展刺激における YAP の核内移行への Rap2 の関与を検討した。プルダウンアッセイを用いて伸展刺激の有無、野生型と *Thbs1* 欠損細胞における活性化型 Rap2（Rap2-GTP）のレベルを定量したところ、野生型細胞では伸展刺激後に Rap2 の不活性化が生じているのに対して、Thbs1 細胞では伸展刺激の有無は Rap2 の活性化レベルに影響を与えないことが明らかとなった。次に、野生型細胞に活性化型 Rap2（G12V）を過剰発現させたところ、YAP の核内移行は抑制された。また反対に、*Thbs1* 欠損細胞に不活性化型 Rap2（S17N）を過剰発現させたところ、YAP の核内移行が生じたため、伸展刺激が誘導する YAP の核内移行は、Thbs1／Integrin αvβ1 を介した Rap2 の活性化制御に依存することが明らかとなった。

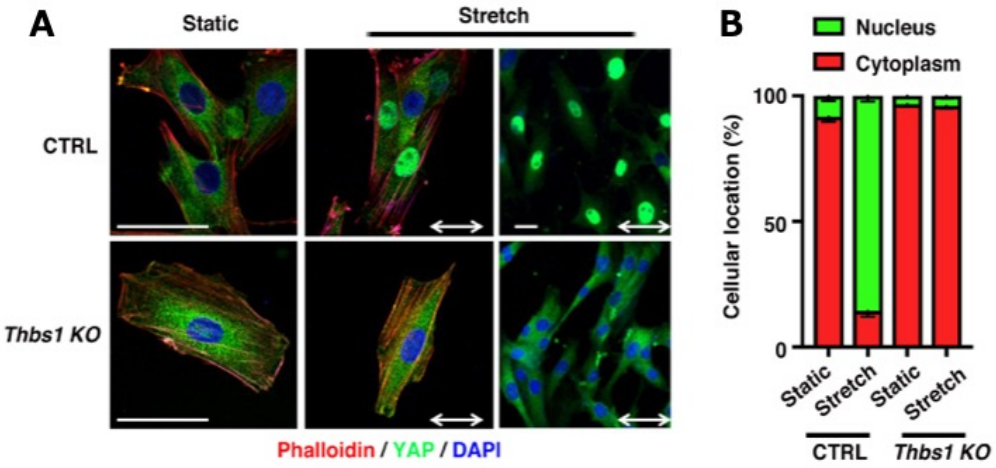


図 2. 周期的伸展刺激後の YAP の局在

A) 野生型細胞（CTRL と *Thbs1* 欠損細胞（Thbs1 KO）における YAP の局在。アクチンフィラメント（赤）、YAP（緑）、核（青）。野生型細胞では伸展刺激後に YAP が核内に局在する。一方、*Thbs1* 欠損細胞では、YAP は伸展刺激後も細胞質に留まっている。スケールバー：50 μm。

B) 細胞質（Cytoplasm）と核内（Nucleus）における YAP の割合。

4. *In vivo* における Thbs1／Integrin／YAP シグナル伝達経路の役割

In vivo における Thbs1／Integrin／YAP シグナル伝達経路の役割を精査するため、2 つの血管障害マウスモデルを使用した。まず始めに、横行大動脈縮窄術（TAC）による血管圧負荷の増大に伴う、血管壁のリモデリングにおける役割を解析した。*Thbs1* 欠損マウスは TAC 後の死亡率が増大し（野生型 0%、*Thbs1* 欠損マウス 31.8%）、血管壁の破裂・乖離が観察された。TAC 後の野生型マウス血管壁中膜（平滑筋細胞層）では、YAP の発現と核内への局在が観察されたのに対して、*Thbs1* 欠損マウスでは YAP の発現誘導が抑制されていた。YAP の標的遺伝子の一つである、connective tissue growth factor（CTGF）の発現も、*Thbs1* 欠損マウスの中膜では観察されなかった。これらの事実は、TAC による圧負荷への応答に、Thbs1／Integrin／YAP のシグナル伝達経路が必要であることを強く示唆している。また一方で、頸動脈結紮術による血管狭窄時に、YAP の活性化と新生内膜細胞の増殖が観察されるが、*Thbs1* 欠損マウスでは、この YAP の活性化が抑制され、新生内膜を形成しない（血管狭窄が生じない）ことが明らかとなった。

考　察

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 が制御することを明らかにした。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。今後は、Thbs1 のみならず、他の細胞外マトリクスについてもそのメカノトランスダクションへの関与と血管病態への関与が明らかになると期待できる。また、細胞外マトリクスを標的とした新たな治療法開発の展開も期待できる。

共同研究者・謝辞

本研究は、筑波大学生存ダイナミクス研究センター循環ダイナミクス研究室にて行った研究であり、教室主催者である柳沢裕美教授、技術支援員の東真理子氏、Keerthana Ranganathan 氏、大学院生の Bui Quoc Thang 氏、Karina Ramirez 氏、Seung Jae Shin 氏、Tram Anh Vu Nguyen 氏の協力のもと行いました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。また分泌タンパク質の質量分析の解析支援を頂きました共同研究者の熊本大学大学院生命科学研究部微生物薬学分野の大槻純男教授、並びに、原子間力顕微鏡を用いた細胞張力測定を支援頂きました茨城大学大学院理工学研究科マイクロ -ナノバイオメカニクス研究室の長山和亮教授に厚く御礼申し上げます。最後に、多大な研究助成を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Yamashiro Y, Papke CL, Kim J, Ringuette LJ, Zhang QJ, Liu ZP, Mirzaei H, Wagenseil JE, Davis EC, Yanagisawa H. Abnormal mechanosensing and cofilin activation promotes the progression of ascending aortic aneurysms in mice. Sci. Signal. 2015;8(399):ra105. DOI: 10.1126/scisignal.aab3141. PMID: 26486174.

2) 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, Yanagisawa H. Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm in mouse and humans. Circ. Res. 2018;123(6):660-672. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313105. PMID: 30355232

3) Yamashiro Y, Thang BQ, Ramirez K, Shin SJ, Kohata T, Ohata S, Nguyen TAV, Ohtsuki S, Nagayama K, Yanagisawa H. Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP signaling pathway in the remodeling of blood vessels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020;117(18):9896-9905. DOI: 10.1073/pnas.1919702117. PMID: 32321834.

4) Livne A, Bouchbinder E, Geiger B. Cell reorientation under cyclic stretching. Nat. Commun. 2014;5:3938. DOI: 10.1038/ncomms4938. PMID: 24875391.

5) Carisey A, Tsang R, Greiner AM, Nijenhuis N, Heath N, Nazgiewicz A, Kemkemer R, Derby B, Spatz J, Ballestrem. Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. Curr Biol. 2013;23(4):271-81. DOI: 10.1016/j.cub.2013.01.009. PMID: 23375895

6) Meng Z, Qiu Y, Lin KC, Kumar A, Placone JK, Fang C, Wang KC, Lu S, Pan M, Hong AW, Moroishi T, Luo M, Plouffe SW, Diao Y, Ye Z, Park HW, Wang X, Yu FX, Chien S, Wang CY, Ren B, Engler AJ, Guan KL. Rap2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway. Nature. 2018;560(7720):655-660. DOI: 10.1038/s41586-018-0444-0. PMID:30135582.