



Title	心臓再生治療の開発に向けた心筋細胞における内因性YAPの役割解明
Author(s)	亀谷, 祐介
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105580
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (亀谷 祐介)	
論文題名	心臓再生治療の開発に向けた心筋細胞における内因性YAPの役割解明
論文内容の要旨 ゼブラフィッシュや新生児期の哺乳類においては、心筋細胞は増殖能力を持ち、心筋傷害時にはその活発な増殖により心筋組織の再生が可能である。しかし、哺乳類ではその増殖能力は生後間もなく失われるとされる。従って、心筋梗塞などの虚血性ストレスなどにより傷害を受けた心筋組織は再生されず、傷害領域は収縮能力を持たない線維組織によって置換される。これが結果として心収縮能力の低下を引き起こし、世界的に死因の上位を占める心不全へと至る。これまで成体哺乳類の心臓では心筋細胞の増殖能の低さから、内因性の心筋細胞の増殖により心筋組織を修復することはできないと考えられてきた。一方で、近年の研究により、心疾患患者において、一部の心筋細胞で増殖活性が高まることが報告された。興味深いことに、心筋炎患者では一度低下した心機能が回復することが臨床的に知られている。さらに、成体マウスの心筋炎モデルを用いた当研究室の先行研究において、心筋炎急性期に認められる組織障害と機能低下が炎症終息に伴って改善されること、その修復過程に心筋細胞増殖が重要であることを見出している。これらの知見は、心臓に秘められた再生能力を示唆しており、その機構の解明は新たな心臓再生治療の開発につながることを期待される。そこで本研究では、心筋細胞におけるYes-associated protein 1 (YAP) の内因性活性化に着目し、心筋細胞増殖や成体心臓の心筋修復における役割の解明を目指した。 YAPは細胞増殖を制御することで臓器サイズを決める分子である。YAPの活性はリン酸化による制御を受け、心筋細胞においては、Hippo経路やα-cateninなどが活性を制御する。YAPが細胞増殖に重要であることは広く知られるが、心筋細胞における他の増殖シグナルとのクロストークに関しては未解明な部分があった。また、心筋細胞におけるYAP過剰発現は増殖誘導を介して強力に心筋再生を促すが、成体心臓において内因性に活性化されるYAPの役割については不明な点が多い。 第一章では、増殖能が高い未熟な心筋細胞の特性の一つとして、内因性にYAP が活性化状態にあることに着目した。そして、活性化状態にあるYAPシグナルと別の増殖シグナルとのクロストークを追究した。まず、心筋細胞の増殖シグナルを探索するために、新生仔ラットの心臓から単離培養したNeonatal Rat Cardiomyocytes (NRCMs) を用いたフェノタイプスクリーニング系を構築した。1280化合物についてスクリーニングを行い、glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) 阻害剤が、β-cateninの発現増加を介してNRCMsの増殖を強力に誘導することを見出した。次に、NRCMsで内因性に活性化されたYAPが、GSK-3/β-cateninシグナルを介した増殖に寄与しているか検討した。siRNA/阻害剤によるYAPの欠失/機能阻害は、β-cateninの発現や局在には影響を与えない一方で、GSK-3阻害剤による増殖誘導を抑制した。また、ヒトiPS細胞由来心筋細胞 (hiPSC-CMs) においても同様に、YAPの阻害はGSK-3阻害剤による増殖誘導を抑制した。最後に、高密度で培養したhiPSC-CMsについて、YAPシグナル活性化とGSK-3阻害剤を組み合わせにより、増殖が誘導できるか検討した。高密度で培養したhiPSC-CMsでは、α-cateninが細胞間に発現してYAPが不活性化状態であり、GSK-3阻害剤による増殖誘導効果が認められない。そこで、siRNAによりαT-cateninをノックダウンした。その結果、YAPが活性化状態となり、GSK-3阻害剤により増殖が誘導された。以上より、内因性のYAP活性が、NRCMsやhiPSC-CMsの心筋細胞増殖に対するGSK-3阻害剤の効果を増強することを見出した。 第二章では、心筋炎病態下の心筋細胞におけるYAPシグナルに着目し、心筋炎終息後の修復過程におけるYAPの役割について検討した。まず、ヒト心筋炎病態において、心筋細胞におけるYAPシグナルが寄与しているか検討すべく、心筋炎症を有する患者の生検サンプルについてのシングル核RNA-seqデータを取得して、再解析を行った。その結果、炎症が生じたヒト心臓では、病的状態に特徴的な遺伝子発現を示す心筋細胞の一部で、YAPシグナルが活性化されていることを見出した。心筋炎のマウスモデルである実験的自己免疫性心筋炎 (experimental autoimmune myocarditis; EAM) においても、心筋炎急性期において心筋細胞でYAPのタンパク発現と核局在が増加することを見出した。次に、タモキシフェン誘導性心筋特異的YAP欠損 (YAP CKO) マウスを作製して、心筋炎病態	

における心筋細胞のYAPの役割を追究した。YAP CKOマウスにEAMを誘導すると、心筋炎発症後に心機能が回復しなかった。さらに、心筋炎急性期における心筋細胞のアポトーシス増加と心筋細胞増殖の抑制に加えて、慢性期における心筋組織の線維化、ROS量増加、血管密度の低下といった表現型が認められた。そこで、これらの表現型の分子機序を解明すべく、YAP CKOマウス的心筋細胞についてRNA-seq解析を行ったところ、YAP欠損群におけるIFN- γ /signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) シグナルの亢進を見出した。さらに、抗IFN- γ 中和抗体によるIFN- γ シグナル抑制は、YAP CKOマウス的心筋組織修復を促し、心機能を回復させた。また、アデノ随伴ウイルスベクターにより、心筋細胞のSTAT1をノックダウンしたYAP CKOマウスでは、心筋炎発症後に心機能が回復した。最後に、成体マウス的心臓から単離培養したAdult Mouse Cardiomyocytes (AMCMs)を用いて、心筋細胞におけるYAP活性化がIFN- γ /STAT1シグナルを抑制するメカニズムを検討した。In vivoの結果と一致して、YAP活性化剤 GA-017を処置したAMCMsでは、IFN- γ 刺激による下流遺伝子発現とSTAT1核局在が抑制された。ここで、STAT1の細胞質から核への移行を担うSH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2)に着目した。YAPを活性化させたAMCMsでは、SHP-2のタンパク発現が増加した。さらにSHP-2の阻害は、YAP活性化によるIFN- γ /STAT1シグナルの抑制をキャンセルした。以上より、心筋炎病態において心筋細胞で活性化されるYAPは、SHP-2の発現増加を介して、IFN- γ /STAT1シグナルを抑制することで、成体心臓の修復を促進する役割を担うことを見出した。

YAPは、心筋細胞の増殖シグナルとして注目されているが、内因性に活性化されるYAPの病態生理学的な意義に関する知見は乏しかった。本研究では、心筋細胞で内因性に活性化されているYAPの役割として、①未熟な状態における増殖シグナル増強効果、②IFN- γ /STAT1シグナルの抑制を介した成体心臓の修復促進効果を見出した。これらの成果は、内因性YAP機能に関して新たな知見を提供するものであり、外因性心筋細胞補充による治療戦略、内因性心筋修復シグナル活性化による治療戦略において重要な意義を有すると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (亀 谷 祐 介)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教授	藤 尾 慈
	副 査	教授	水 口 裕 之
	副 査	教授	齊 藤 達 哉

論文審査の結果の要旨

哺乳類の心筋細胞は、生直後に増殖能を大きく失うことから、成体哺乳類心臓の修復能は低いと考えられてきた。本論文は、心臓の内因性修復能を高めることを戦略とした新規心疾患治療法の開発を目標に、Yes-associated protein 1 (YAP)に着目し、第一章において心筋細胞増殖におけるYAPシグナルと他の増殖シグナルとのクロストークについて、第二章において実験的自己免疫性心筋炎 (EAM) モデルで認められる心臓の修復におけるYAPの意義について、分子生物学的解析を加え、その成果を報告するものである。

第一章では、著者は、新生児ラット心筋細胞 (Neonatal Rat Cardiomyocytes, NRCMs) が増殖能を保持していること、また、内因性YAP が活性化状態にあることに着目した。著者は、YAPシグナルとクロストークするシグナルを探索するために、NRCMsを用いたフェノタイプスクリーニング系を構築し、作用機序が知られている1280化合物についてスクリーニングを行った。その結果、glycogen synthase kinase-3 阻害剤が、内因性YAP活性化状態において、 β -cateninシグナルを介した増殖を促進することを見出した。さらにヒトiPS細胞由来心筋細胞においても同様に、 β -cateninシグナルは、YAPシグナルとのクロストークし、心筋細胞増殖を促進することを発見した。

第二章では、著者は、心筋炎患者の生検サンプルについてのシングル核RNA-seqデータをデータベースから取得して、再解析し、病的ストレスを受けた心筋細胞の一部で、YAPシグナルが活性化されていることを見出した。EAMにおいても、心筋細胞でYAPの活性化が認められることから、タモキシフェン誘導性心筋特異的YAP遺伝子欠損マウスを作製して、心筋炎における心筋細胞の内因性YAPの活性化の病態生理学的意義を追究した。その結果、心筋炎において心筋細胞で活性化されるYAPは、SHP-2の発現増加を介してIFN- γ /STAT1シグナルを抑制すること、それにより心筋細胞のアポトーシスを抑制するとともに心筋細胞増殖を促進すること、さらに、心筋組織線維化の抑制、ROS産生抑制、血管機能の促進を介して、成体心臓の組織修復を促進することを明らかにした。

YAPは、心筋細胞の増殖シグナルとして注目されてきたが、内因性のYAPの病態生理学的な意義に関する知見は乏しかった。上述のように、本論文では、心筋細胞の内因性YAPの役割として、

- ① 未成熟な心筋細胞においては、 β -cateninシグナルとクロストークし心筋細胞の増殖を促進すること
- ② 成体心筋細胞においては、炎症時に活性化されIFN- γ /STAT1シグナルを抑制し成体心臓の修復を促進することを見出した。これらの成果は、内因性YAP機能に関して新たな知見を提供するものである。

以上、本論文は、心筋細胞の増殖能、心臓の内因性修復能に関わる新たな分子機構を報告するものであり、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。