

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15511

研究課題名(和文) ヒト iPS細胞における(プロ)レニン受容体の機能解析

研究課題名(英文) Function of (pro)renin receptor in human iPS cell.

研究代表者

千本松 孝明 (Senbonmatsu, Takaaki)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70216563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：(プロ)レニン受容体(以下(P)RR; (pro)renin receptor)は、プロレニンを非蛋白融解的にレニン活性化させるレニンアンジオテンシンシステム(RAS)の新しい一因子であるが、RAS非依存的機能の存在も指摘されている。我々は、(P)RRがhuman iPS細胞において高発現していることを発見し、さらに興味深いことに細胞内局在ではその多くが核に局在し、分化誘導において極めて重要な機能を有していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：(Pro)renin receptor is one molecule of Renin angiotensin system (RAS), and non proteolically evokes renin activity of prorenin, while there are several articles that show RAS independent functions of (P)RR. We found that (P)RR was highly expressed in human iPS cell. Full-length (P)RR was mainly localized in the nucleus and might play an important role in differentiation induction of human iPS cell.

研究分野：心不全、再生医療、細胞内伝達情報

キーワード：(プロ)レニン受容体 iPS細胞 中胚葉誘導 WNTシグナル

1. 研究開始当初の背景

(プロ)レニン受容体 (以下(P)RR; (pro)renin receptor) は、プロレニンを非蛋白融解的にレニン活性化させるレニンアンジオテンシンシステム(RAS)の新しい一因子であるが、RAS 非依存的機能の存在も指摘されている。我々は、(P)RR が human iPS 細胞において高発現していることを発見した。

2. 研究の目的

未分化細胞における新たな(P)RRの機能解析

3. 研究の方法

Human iPS 細胞における(P)RRの発現レベル、細胞内局在、並びに(プロ)レニン受容体切断酵素の発現レベルを検証する。

Human iPS 細胞の中胚葉分化誘導時の(P)RRの発現変化を検証する。

Human iPS 細胞内、同細胞の中胚葉分化誘導における WNT シグナル活性化への(P)RRの制御機構を検証する。

プロレニン-(P)RRの WNT シグナル活性化制御への連関を検証する。

4. 研究成果

(プロ)レニン受容体 ((P)RR; (pro)renin receptor) は、レニンアンジオテンシンシステム(RAS)を構成する新しい因子として 2002 年にフランスのグループにより膜 1 回貫通型受容体として同定された(Nguyen G et al., *J. Clin. Invest.* 2002)。(P)RR は、活性中心がプロドメインで覆われた不活性型レニン前駆体であるプロレニンに結合し、プロレニンを非蛋白融解的にレニン活性化させる。このメカニズムは、(P)RR が組織 RAS におけるレニン活性の供給源として重要な機能をはたしている可能性を示唆した。しかし、体細胞の(P)RR の主たる細胞内局在は、ゴルジ体であり、そのゴルジ体で furin や ADAM19 により shedding され分泌型(P)RR として細胞外に分泌され、細胞外でプロレニンをレニン活性化するとして論文報告もある(Yoshikawa et al., *Hypertens Res* 2011)。

しかし、現在のところ、受容体型(P)RR と分泌型(P)RR が、どのような発現比率で存在するか詳細な機能は不明のままであり、RAS を形成する 1 因子として発見されたものの、その機能は 1 つとしてコンセンサスに至っていない。同時に RAS 非依存的機能の存在も指摘された。2010 年に (P)RR が V-ATPase と WNT 受容体に結合し、WNT シグナルを制御することが *Science* 誌に報告された (Cruciat et al., *Science*. 2010) (図 1)。WNT

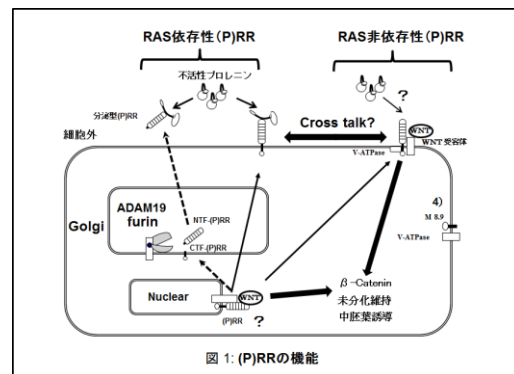


図 1: (P)RRの機能

シグナルは、未分化細胞の未分化性維持に極めて重要な因子として働く一方、中胚葉誘導(脈管系細胞)の master regulator の 1 つとして極めて重要な機能を有している。興味深いことに、我が研究室で作成したヒト iPS 細胞において(P)RR が極めて高発現していることを発見した (図 2)。ヒト iPS 細胞の cell

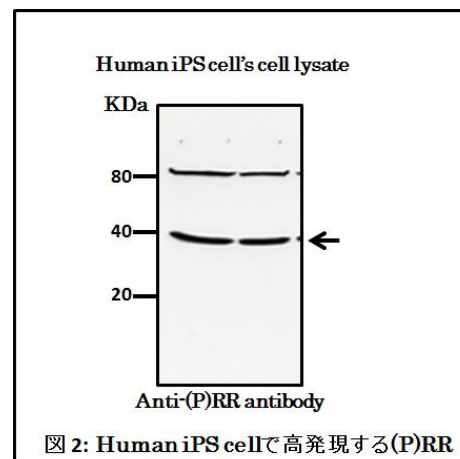


図 2: Human iPS cellで高発現する(P)RR

lysate を(P)RR の C-terminal を認識する抗体 anti-(P)RR antibody を用いてウエスタンブロットを行ったところ、分子量 40Kda 弱にバンドが認められ、ヒト iPS 細胞に発現する(P)RR は、full-length であることが示唆さ

れた。そこでヒト iPS 細胞における(P)RR の細胞内局在を調べたところ、興味深いことにほぼ核内に発現していることが判明した。

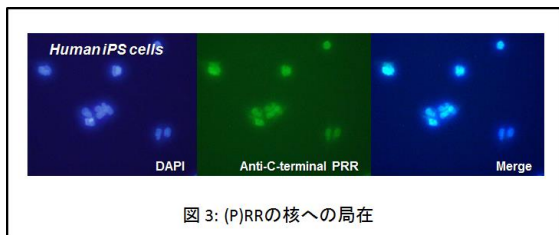


図 3: (P)RRの核への局在

図 3 は、ヒト iPS 細胞の免疫染色であるが、(P)RR は DAPI (核染色) と Merge を示しており、ヒト iPS 細胞において(P)RR は核内に局在している。免疫染色の結果を確認するため、ウエスタンブロットも行ったが、免疫染色同様に核に強いバンドを示した (図 4)。本

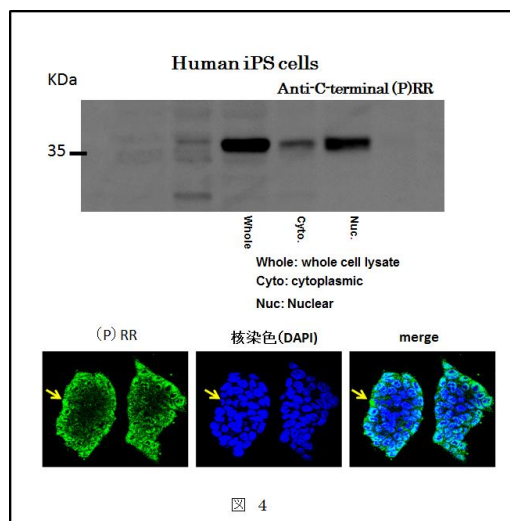


図 4

来分泌もしくは細胞表面の受容体として発見されたタンパク質である(P)RR は、NLS (Nuclear localization signal: 核移行とは、細胞内で合成され、核に移送されるべきタンパクの 1 次構造中に存在するもの)シグナルを有さない。にも関わらず、ヒト iPS 細胞においてそのほとんどが核内に存在することが判明した。予備実験としてマウス未分化細胞でも確認したが、(P)RR は核内に局在していた (図 4 下)。

次にヒト iPS 細胞の中胚葉分化誘導における(P)RR の発現変化を確認したところ、誘導第 1 日目に急速にその発現が減少することが判明した (図 5)。反比例するかのように、連関が示唆されている WNT シグナルは、中

胚葉誘導で急速に発現を増加している。当研究室で確立された中胚葉誘導法では、

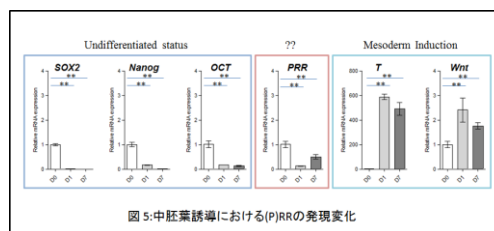


図 5: 中胚葉誘導における(P)RRの発現変化

Rao et al による Stepwise Clearance of Repressive Roadblocks Drives Cardiac Induction in Human ESCs (Cell Stem Cell. 2016 Apr 7;18(4):554-6.)と同様に中胚葉誘導に必須な TGF-βファミリーの一員である BMP4 と線維芽細胞増殖因子 FGF、そして Activin A 並びに WNT stimulator を、そして心筋細胞群誘導として WNT inhibitor を主要刺激因子として培養液に添加して心筋細胞群への誘導を行っている (図 6)。未だ

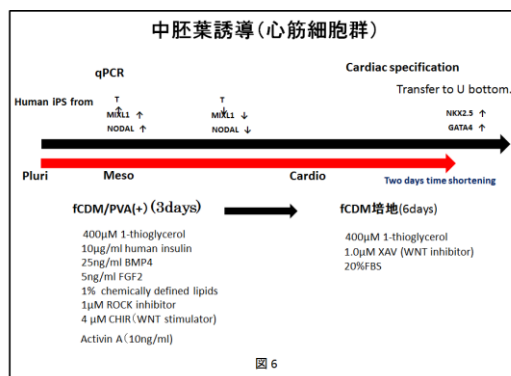
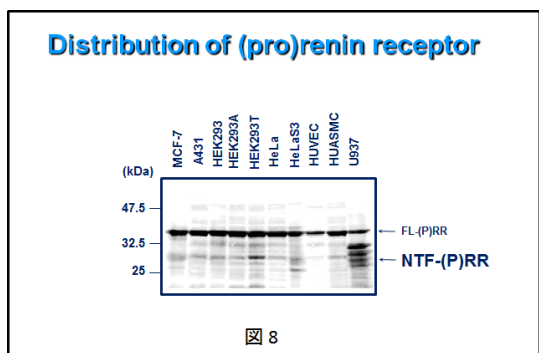
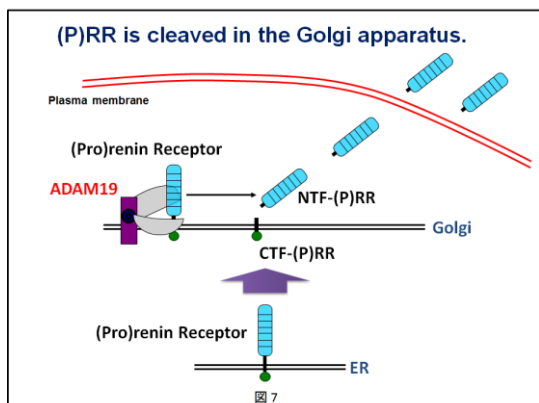


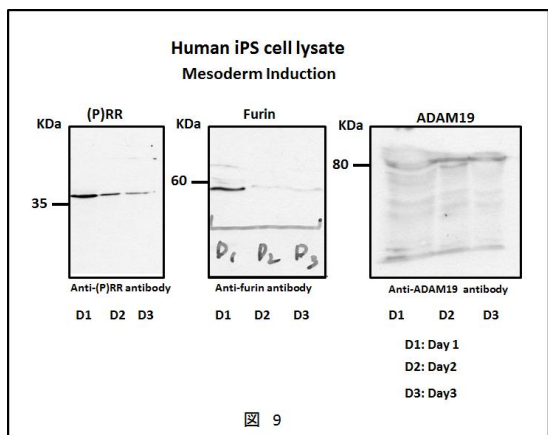
図 6

十分な確証は得られていないが、我々のデータは少なくとも中胚葉誘導刺激時 (すなわち、WNT シグナル刺激時) に(P)RR 発現は急速に減弱し、心筋細胞群誘導時(すなわち、WNT シグナル抑制時)に再び発現増加を示す傾向を示している。現在、上記メカニズム確証のため、CRISPR による(P)RR knocked out ヒト iPS 細胞を作成し、中胚葉誘導への影響を実験中であるが、ヒト iPS 細胞への CRISPR 導入がうまく行かず、結果報告に記載が困難であったが、引き続き実験を継続していく予定である。また、興味深いことにヒト iPS 細胞において(P)RR は、主に核内に局在していると共に furin や ADAM19 での shedding によりほとんどの体細胞で認められる

N-terminal (P)RR (NTF-(P)RR)が認められないことである (図 7, 8)。そこで、ヒト



iPS 細胞の中胚葉誘導の過程における、(P)RR、furin、ADAM19 の発現レベルをウェスタンブロットで検証したところ、(P)RR 並びに furin、ADAM19 の urin は、誘導経過とともにその発現レベルは減弱し、ADAM19 はわずかであるが、増加を示した (図 9)。しかし、少なくとも furin や ADAM19 は、ヒト iPS 細胞でも発現しており、また図 9 に示す通り、ヒト iPS 細胞では



分泌型(P)RR(N-terminal (P)RR)は、認めない。(P)RR)は、シグナルペプチドを有しており、一般的には細胞表面に向かい受容体もしくは、ゴルジ体において furin や ADAM19

により shedding され、膜貫通領域を有さない N-terminal (P)RR が、constitutively に細胞外に分泌される。このように shedding を担当する酵素群が細胞内に存在するにも関わらず full-length (P)RR のみが発現するメカニズムとして、ヒト iPS 細胞において (P)RR が核内に局在していればこれらの現象は説明がつくかもしれない。このメカニズムは分化誘導において極めて重要な機能を有している可能性がある。なぜならば、多くの未分化細胞における重要遺伝子は分化誘導の際に急速にその発現レベルを変化させるからである。

上述したように、現在 CRISPR による(P)RR knocked out ヒト iPS 細胞を作成し、中胚葉誘導への影響を実験中であるが、ヒト iPS 細胞への CRISPR 導入がうまく行かず、残念ながら 2 年が経過してしまったが、(P)RR の未分化細胞における機能解析は極めて重要であり、引き続き研究体制を構築していきたいと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 千本松孝明  
(Senbonmatsu Takaaki)  
埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号 70216563

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 なし  
( )