

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02814

研究課題名(和文)心疾患におけるnon-canonical Wntシグナルの病態生理学的意義の解明

研究課題名(英文)Non-canonical Wnt signaling in the pathogenesis of heart diseases

研究代表者

塩島 一郎 (SHIOJIMA, Ichiro)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：90376377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt5aはWntシグナルのうち、カテニン非依存性のnon-canonical Wntシグナルを活性化する。本研究ではWnt5aが心不全の発症進展に果たす役割とその分子機構を解明することを目的とした。心筋特異的Wnt5aノックアウトマウスに圧負荷を加えたところ、左室駆出率の低下が軽減された。また、Wnt5aをノックダウンした培養心筋細胞では伸展刺激によるBNPの発現誘導が減弱していた。以上の結果から心筋細胞由来のWnt5aが心筋細胞の伸展刺激に対する細胞応答の制御を介して心不全を増悪させる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wnt5aは細胞表面の受容体に結合することにより細胞内にシグナルを伝達する。今回の研究では心不全の発症・進展におけるWnt5aの役割を明らかにすることを目的とした。心筋細胞でのみWnt5aを欠損するような遺伝子改変マウスでは心不全の発症が抑制された。また、Wnt5aの発現が低下した培養心筋細胞では細胞伸展刺激に対する応答性も減弱していた。以上の結果からWnt5aは機械的刺激に対する細胞応答の制御を介して心不全の発症進展に関与しており、Wnt5aの作用を抑制するような薬剤が心不全治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wnt5a activates  $\beta$ -catenin-independent non-canonical Wnt signaling. In this study we aimed to explore the role of Wnt5a in the pathogenesis of heart failure. In cardiac-specific Wnt5a knockout mice, left ventricular dysfunction induced by pressure overload was blunted. In cultured cardiac myocytes, siRNA-mediated knockdown of Wnt5a reduced cell stretch-induced BNP gene expression. Our results suggest that Wnt5a promotes heart failure via myocardial mechano-sensing pathway.

研究分野：循環器内科学

キーワード：心不全 Wntシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) Wnt シグナル伝達経路

Wnt は分子量約 4 万の分泌蛋白で、細胞表面の受容体に結合するリガンドとして機能し、Wnt により惹起される細胞内シグナルは細胞増殖・細胞分化・臓器形成・発癌など多彩な生物学的作用を有することが知られている。Wnt により活性化される細胞内シグナル伝達経路には  $\beta$ -カテニン経路、平面内細胞極性 (planar cell polarity (PCP)) を制御する PCP 経路、細胞内  $Ca^{2+}$  動員を促進する  $Ca^{2+}$  経路が存在する (図 1)。このうち  $\beta$ -カテニン経路は古典的 Wnt 経路 (canonical Wnt pathway)、それ以外の経路は非古典的 Wnt 経路 (non-canonical Wnt pathway) と呼ばれることもある。受容体としては 7 回膜貫通型受容体 Frizzled (Frz) があり、古典的 Wnt 経路と非古典的 Wnt 経路の両者に関与する。Frz 以外にも co-receptor として 1 回膜貫通型受容体 LRP5/6、ROR1/2 が知られており、それぞれ古典的 Wnt 経路、非古典的 Wnt 経路選択的に関与する。

$\beta$ -カテニン経路においては  $\beta$ -カテニンが転写因子である T cell factor (TCF) の co-factor として機能し、標的遺伝子の転写を活性化する。一方、PCP 経路は、表皮細胞において頂底軸 (apical-basal axis) と直行する平面内で形成された極性を決定するシグナル伝達系で、低分子量 G 蛋白 (Rho, Rac) を介して Rho キナーゼや Jun キナーゼ (c-jun N-terminal kinase (JNK)) を活性化することにより、細胞極性や細胞の運動を制御する。また  $Ca^{2+}$  経路は細胞内  $Ca^{2+}$  動員を介して  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素 ( $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)) やプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化し、細胞運動を促進するとされる。

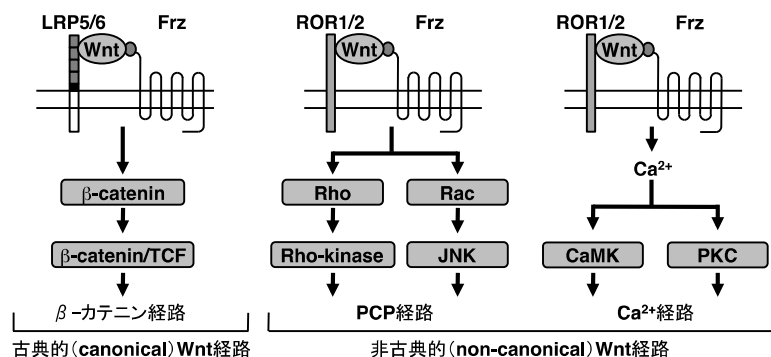


図 1 古典的・非古典的 (canonical and non-canonical) Wnt 経路

### (2) 心血管病と non-canonical Wnt シグナル

心臓における Wnt シグナルについては、これまで主に心臓発生や心筋細胞分化の観点から研究がなされてきた。マウスの心臓発生においては二次心臓領域の発生に canonical Wnt シグナルが関与していること、また、ES 細胞や iPS 細胞など多分化能を有する幹細胞から心筋細胞を分化誘導する際にも canonical Wnt シグナルが重要であることが、報告者らを含めた複数のグループから報告されている<sup>1)2)</sup>。一方、成人期における canonical Wnt シグナルの役割については、これまで報告者らは老化に伴って増加する補体分子 C1q が canonical Wnt シグナルを活性化すること、また、canonical Wnt シグナルの活性化が心不全や動脈硬化など老化関連心血管病の病態に関与することを明らかにしてきた<sup>3)-6)</sup>。一方、non-canonical Wnt シグナルを活性化する主なりガンドとして Wnt5a、Wnt11 が知られており、マウスでは Wnt5a、Wnt11 による non-canonical Wnt シグナル活性化が心臓発生に必須であることが報告されているが<sup>7)8)</sup>、心疾患の病態生理における non-canonical Wnt シグナルの意義については明らかにされていなかった。

#### < 引用文献 >

- 1) Naito AT et al, PNAS 2006;103:19812
- 2) Zhu W et al. Nature 2008; 454:345-9
- 3) Naito AT et al, Cell 2012;149:1298
- 4) Sumida T et al. Nat Commun 2015;6:6241
- 5) Okada K et al. Circ Heart Fail 2015;8:799
- 6) Nakagawa A et al, Sci Rep 2016;6:25009
- 7) Zhou W et al, Nat Genet 2007;39:1225
- 8) Cojen ED et al, Development 2012;139:1931

### (3) 予備実験とその結果

Wnt5a および Wnt11 のノックアウトマウスはいずれも出生後早期に致死となることから、成人期の心臓における機能解析を行うために、心筋特異的誘導型 Wnt5a ノックアウトマウスを作製した。タモキシフェン投与後に心臓の Wnt5a の発現は著明に減少し、心臓において心筋細胞が主な Wnt5a 産生細胞であることが示された。このマウスは通常の状態では明らかな表現型をみとめなかったが、横行大動脈縮窄 (transverse aortic constriction: TAC) により左室に圧負荷を加えたところ、野生型マウスと比較して左室駆出率 (left ventricular ejection fraction: LVEF) の低下が軽減された。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、non-canonical Wnt シグナルが心臓の組織恒常性維持および心疾患の発症進展にどのような役割を果たしているのかを解明することをその目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ノックアウトマウスを用いた in vivo の解析

予備実験の結果から心筋細胞由来の Wnt5a が心不全の進展に関与していることが明らかになった。そこでノックアウトマウスを用いて non-canonical Wnt シグナルが心不全を増悪させる分子機構について検討した。non-canonical Wnt シグナルの指標として phospho-JNK、phospho-CaMKII を Western blot を用いて定量評価するとともに、心肥大・心不全に関与することがすでに報告されているシグナル伝達経路についても評価した。また、RNAseq により遺伝子発現の網羅的解析もおこなった。

### (2) 培養心筋細胞を用いた in vitro の解析

培養細胞伸展装置でラット培養心筋細胞に伸展刺激を加える in vitro の実験系において、Wnt5a をノックダウンして際の進展刺激に対する細胞応答について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ノックアウトマウスを用いた in vivo の解析

心筋特異的 Wnt5a ノックアウトマウスでは TAC による左室駆出率の低下が軽減されており、心筋細胞由来の Wnt5a が心不全の進展に関与していることが示された。Wnt5a ノックアウトマウスでは心筋細胞の横断面積の減少と、また、圧負荷に伴う間質線維化の軽減もみられた。Wnt5a によって活性化される non-canonical Wnt シグナルの指標として phospho-JNK、phospho-CaMKII を Western blot を用いて定量評価したところ、野生型マウスと心筋特異的誘導型 Wnt5a ノックアウトマウスで顕著な差はみとめられなかった。また、JNK 以外の MAPK 経路として ERK や p38 のリン酸化も評価したが、同様に野生型とノックアウトマウスで明らかな差はなかった。そこでノックアウトマウスと野生型マウスの心臓における遺伝子発現を RNA seq で網羅的に解析したところ、ノックアウトマウスではメカノ応答遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。

### (2) 培養心筋細胞を用いた in vitro の解析

培養心筋細胞に伸展刺激を加えると代表的なメカノ応答遺伝子である BNP の遺伝子発現が誘導されるが、Wnt5a をノックダウンした心筋細胞では伸展刺激による BNP の発現誘導が減弱していた。

### (3) 研究成果のまとめ

以上の結果から心筋細胞由来 Wnt5a が心筋細胞の伸展刺激に対する細胞応答を介して心不全を増悪させる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	岩崎 真佳  (IWASAKI Masayoshi)  (30548706)	関西医科大学・医学部・講師    (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関