

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760607

研究課題名（和文）Wnt シグナルを伝達する小分子応答性人工受容体による経済的な心筋再生療法の確立

研究課題名（英文）Economical and Efficient Production of Cardiac Myocytes Using Small Molecule-Responsive Artificial Receptors For Wnt3a Signal Transduction

研究代表者

十河 孝浩（SOGO TAKAHIRO）

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・研究員

研究者番号：30561972

研究成果の概要（和文）：Wnt3a の受容体である Frizzled8 および LRP6 の細胞外領域を、フルオレセイン分子（FL）を認識する一本鎖抗体可変領域に置換したキメラ受容体を作製した。作製したキメラ受容体を発現させたマウス ES および iPS 細胞では、Wnt3a を用いることなく、リガンドである FL 修飾 BSA 依存的にシグナル伝達が活性化することが示され、また Wnt3a 刺激時と同等に心筋細胞への分化効率が上昇することも確認できた。

研究成果の概要（英文）：We constructed chimeric receptors in which single-chain Fv of anti-fluorescein (FL) antibody was tethered to transmembrane/cytoplasmic domains of Frizzled8 and LRP6 that are receptors for Wnt3a. Mouse ES cells or iPS cells transduced with these chimeric receptors could activate Wnt3a signaling in response to FL-conjugated BSA (BSA-FL) as a cognate ligand, and could efficiently differentiate into cardiomyocyte when they are stimulated with BSA-FL, in the absence of Wnt3a.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：心筋再生・幹細胞・シグナル伝達・受容体・抗体・Wnt3a

1. 研究開始当初の背景

近年、増加の一途を辿るメタボリック症候群の最大の合併症である冠動脈硬化症と心筋梗塞後心不全の発症に対する根本的治療として、喪失した心筋細胞を、胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞から体外で作成し移植する心臓再生療法の実現化が大きく期待されている。

ES 細胞や iPS 細胞から心筋細胞へ効率的に分化誘導する方法としては、これまで多くの化合物や増殖因子により細胞を刺激して培養する手法が試みられてきた。その中でも特に、ES 細胞の分化初期段階で Wnt3a

分子により古典的 Wnt シグナルを活性化させることで、心筋細胞へ効率的に分化誘導出来ることが近年報告された。しかし、Wnt3a 分子は非常に高額な組換えタンパク質であり、実用化できる程の大量の心筋細胞を調製することは医療経済的に不可能という問題がある。そこで本研究では、安価で効率的に心筋細胞を作製するための新たな手法の開発を目的として研究を遂行した。

2. 研究の目的

重症心不全に対する再生治療において、胚性幹 (ES) 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞

から心筋細胞への分化誘導を行った後、作製した心筋細胞を移植するという方法が期待されている。心筋細胞への効率的な分化誘導法の一つとして、分化初期段階で Wnt3a シグナルを活性化する方法が報告されている。しかし、Wnt3a の組換え蛋白質は精製が困難であるため非常に高額であり、これを用いて移植に十分な量の心筋細胞を作製することは医療経済的に現実的ではない。そこで本研究では、Wnt3a 分子に代わる安価な代替リガンドに応答可能な人工受容体を用いて Wnt3a 非依存的にシグナル伝達を制御する方法を開発し、医療経済的に実現可能かつ効率的な心筋再生療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) キメラ Wnt3a 受容体の構築

Wnt3a 分子は、細胞膜上に存在する Frizzled8 (Fz8) および LRP6 という受容体の N 末端領域と結合して三者複合体を形成することにより、シグナルを伝達する。そこで本研究では、Fz8 および LRP6 の Wnt3a 分子との結合領域を、フルオレセイン分子 (FL) を認識する一本鎖抗体可変領域 (ScFv) に置換したキメラ Fz8、およびキメラ LRP6 を作製した (図 1)。リガンドとしては、BSA に複数の FL 分子を修飾した BSA-FL を用いることで、(BSA-FL) / (キメラ Fz8) / (キメラ LRP6) という三者複合体の形成が誘導され、Wnt3a と同様のシグナル経路が活性化されると考えられる。

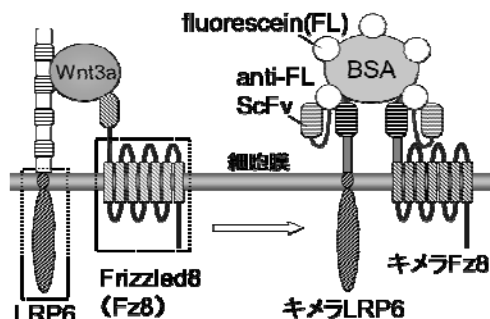


図 1. Wnt3a と結合した Fz8/LRP6 と、BSA-FL と結合したキメラ Fz8/キメラ LRP6 の模式図

(2) キメラ受容体の機能解析

作製したキメラ受容体遺伝子をマウス ES、および iPS 細胞へ導入すると、その遺伝子導入細胞はキメラ受容体に共役する BSA-FL 分子を加えて培養することにより Wnt3a シグナルを伝達し、心筋細胞への分化効率が上昇すると予想される。Wnt3a シグナルの活性化は、転写因子である Tcf 依存性の転写活性をレポーターアッセイ (TopFlash アッセイ) にて検証する。細胞外領域の構造の異なる複数のキメラ受容体ペアを作製して上記のアッセイを行い、それらの中で BSA-FL 存在下で培養した場合に遺伝子導入細胞におけ

るシグナル伝達の活性化が見られるキメラ受容体ペアを選別する。

さらに、シグナル伝達活性を持つことが確認されたキメラ受容体を用いて、ES、iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導が BSA-FL の刺激によって促進されるかどうか、心筋細胞特異的な遺伝子の発現や、自己拍動率などを指標に評価する。

4. 研究成果

(1) シグナル伝達に最適なキメラ受容体ペアの探索

細胞外領域の構造を変えて作製した種々のキメラ Fz8 とキメラ LRP6 を、様々な組み合わせで 293T 細胞へ導入し、TopFlash アッセイにより BSA-FL 依存的なシグナル活性を解析した。その結果、細胞外ドメインを全て削除したタイプのキメラ LRP6 (LRP6S) を、2 種類のキメラ Fz8 (Fz8S、Fz8L) のいずれかと共発現させた場合に、BSA-FL 依存的なシグナル活性の上昇が確認できた。この二組のキメラ受容体ペアをさらに、マウス ES 細胞へ導入して安定発現株を作製し、シグナル活性を解析した。その結果、LRP6S+Fz8L の組合せを発現した ES 細胞 (ES/S+L) においては BSA-FL 濃度依存的に、Wnt シグナル伝達を厳密に制御できることが示された (図 2)。

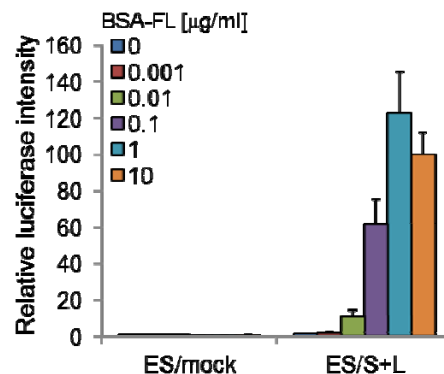


図 2. キメラ受容体発現マウス ES 細胞における BSA-FL 濃度依存的なシグナルの活性化 (TopFlash アッセイ)

(2) キメラ受容体による心筋細胞への分化促進効果の解析

キメラ受容体発現 ES 細胞株 (ES/S+L) と mock 導入株 (ES/mock) で分化培養を行い、自律拍動率を指標に心筋細胞への分化効率を評価した。ES/mock では BSA-FL で刺激しても自律拍動率は変化しなかったが (図 3A)、ES/S+L では BSA-FL 刺激によって、Wnt3a で刺激した場合と同等に自律拍動率が上昇することが確認できた (図 3B)。また、キメラ受容体を導入したマウス iPS 細胞株においても BSA-FL 依存的に心筋細胞分化効率が上昇することが示された。

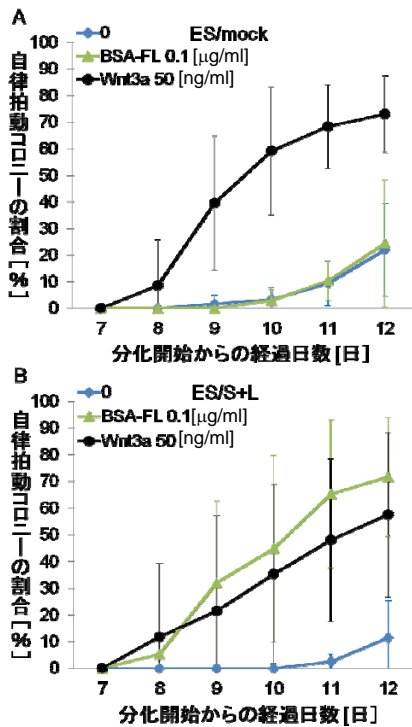


図 3. mock 遺伝子導入マウス ES 細胞 (A) とキメラ受容体導入 ES 細胞 (B) の分化誘導における自律拍動コロニー出現率の変化

また、分化した細胞の状態をより詳細に解析するために、遺伝子発現の変化や心筋マーカータンパク質の発現を解析した。リガンド刺激 1 日後の Wnt3a の標的遺伝子の発現量の変化、および分化過程または分化後における三胚葉や心筋細胞のマーカー遺伝子の発現量変化を調べるため、マイクロアレイ解析やリアルタイム定量 PCR による解析を行った。その結果、ES/S+L を BSA-FL で刺激した場合に、Wnt3a で刺激した細胞と同様のターゲット遺伝子や、心筋マーカー遺伝子の発現上昇が確認された。また、BSA-FL で刺激した ES/S+L の分化後の細胞コロニーにおいて、心筋細胞マーカーである心筋トロポニン T の抗体で染色される領域の増大が観察された (図 4)。

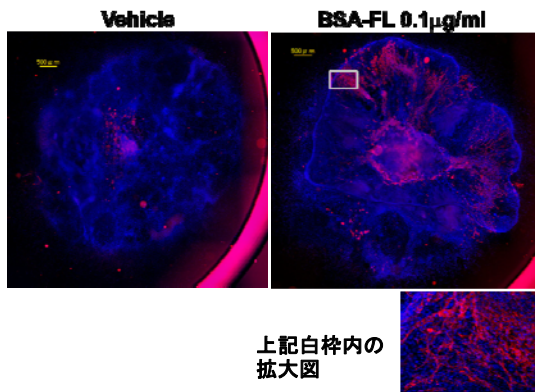


図 4. 分化誘導後の ES/S+L の心筋トロポニン T 抗体による染色画像。細胞の核を DAPI (青色) で、心筋細胞を心筋トロポニン T 抗体 (赤色) で染色している。

これらの結果から、キメラ受容体を導入したマウス ES 細胞では、BSA-FL 刺激によって Wnt3a 刺激と同等の効率で、また同様の性質を持つ心筋細胞が作製できることが示された。

さらに、BSA-FL 依存的に心筋細胞の分化効率が上昇したことが、キメラ受容体を介したシグナル伝達に起因することを証明するために、Wnt3a のアンタゴニストである Dkk1 によるシグナル伝達の競合の有無を解析した。Dkk1 は細胞膜上で Wnt3a と競合的に LRP6 と結合することにより、Wnt3a シグナルを阻害することが知られている。心筋分化効率を解析した結果、Dkk1 を添加することによって Wnt3a 依存的なシグナル伝達や心筋分化の促進効果が顕著に抑制されたのに対して、BSA-FL 依存的なシグナル伝達や心筋分化促進効果は Dkk1 による影響を全く受けないことが示された (図 5、図 6)。

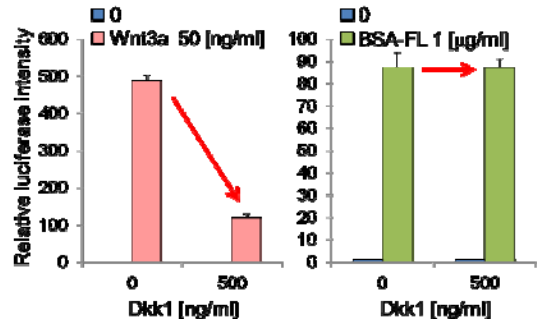


図 5. キメラ受容体発現マウス ES 細胞を用いた TopFlash アッセイによる、Dkk1 によるシグナル活性化の阻害効果の解析

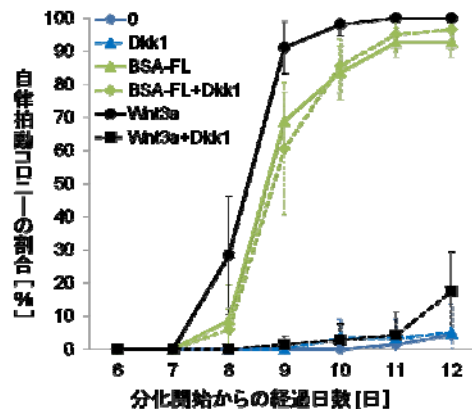


図 6. キメラ受容体発現マウス ES 細胞の心筋細胞分化誘導における Dkk1 の影響の解析 Dkk1 は 500 ng/ml、BSA-FL は 0.1 μg/ml、Wnt3a は 50 ng/ml の濃度でそれぞれ添加して分化誘導を行った。

キメラ LRP6 には Dkk1 との結合部位は存在しないため、キメラ受容体を介したシグナル伝達は Dkk1 により阻害されることはなく、心筋分化の効率も変化しなかったと考えられる。よって、キメラ受容体を介したシグナル伝達が BSA-FL 依存的に活性化された結

果、ES 細胞から心筋細胞への分化が促進されたと示唆される。ES 細胞及び iPS 細胞を用いて安定発現株を作製することで、これらのキメラ受容体は効率的かつ経済的な心筋再生療法確立のための有用なツールになると期待される。

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 4 件)

① Sogo T and Kawamura T, Efficient Production of Cardiac Myocytes from ES cells and iPS cells Using Small Molecule-responsive Artificial Receptors for Wnt3a Signal Transduction, 第 76 回日本循環器学会学術集会, 2012 年 3 月 18 日, 福岡県福岡市福岡国際会議場

② Sogo T, Shigeno A, Maruno T, Hasegawa K, Kawahara M, Ueda H, Nagamune T, Kawamura T, Economical and Efficient Production of Cardiac Myocytes From ES Cells and iPS Cells Using Small Molecule-Responsive Artificial Receptors For Wnt3a Signal Transduction, American Heart Association Scientific Sessions 2011, 2011 年 11 月 16 日, アメリカ合衆国フロリダ州オーランド

③ 十河孝造、重野麻子、丸野敬晃、長谷川浩二、河原正浩、上田宏、長棟輝行、川村晃久、経済的かつ効率的な心筋再生療法のための、W n t 3 a シグナルを伝達する人工受容体の作製、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、京都府京都市国立京都国際会館

④ 十河孝造、重野麻子、丸野敬晃、長谷川浩二、河原正浩、上田宏、長棟輝行、川村晃久、古典的 Wnt 経路を伝達する人工受容体を用いた経済的な心筋再生療法の確立、化学工学会第 43 回秋季大会、2011 年 9 月 15 日、愛知県名古屋市名古屋工業大学

[図書] (計 1 件)

① 川村晃久、十河孝造、メディカルビュー社、アンチ・エイジング医学—日本抗加齢医学会雑誌、2011、76-81

[その他]

ホームページ等

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

十河 孝浩 (SOGO TAKAHIRO)

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・研究員

研究者番号：30561972