

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590227

研究課題名(和文) 骨格筋形成におけるWNTファミリーとTGFベータファミリーの相互関係

研究課題名(英文) Interaction of WNT family and TGF-beta family during myogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells

研究代表者

濃野 勉 (Nohno, Tsutomu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：20098619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋芽細胞株C2C12の分化誘導ではWnt経路に関与する因子の中でWnt4やSfrp2などが有意に発現上昇する。過剰発現で有効なのはWnt4であり、これはカテニン経路に拮抗して分化を促進する。Wnt4を恒常的に発現するC2C12では細胞増殖が著しく低下して自発的に分化する。この細胞では筋分化マーカーと共にBMP4の発現が上昇し、元の細胞の分化誘導でもBMP4が上昇する。しかしBMP4は筋分化を抑制し、その効果はBMPに結合するノギンで拮抗される。Wnt4とWnt3aはBMP4によるSmadリン酸化に対して影響を示すが、BMP4のWnt経路に対する影響は弱く、その作用は間接的と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Several Wnt signaling components including Wnt4, Sfrp2, and Porcupine were induced after serum starvation during myogenic differentiation in C2C12 myoblast cell line, and Wnt4 was most effective to induce myogenic differentiation through suppression of beta-catenin signaling with Wnt3a, when overexpressed in C2C12 cells. Stable Wnt4-expressing sub-cell lines (W4-08) of C2C12 indicate decreased proliferation accompanying spontaneous differentiation into myotube cells with myosin heavy chain expression. BMP4 expression was up-regulated in W4-08 cells, as observed in C2C12 cells after serum starvation. BMP4 is acting to down-regulate myogenic differentiation, and noggin is effective to promote myogenic differentiation in the presence of Wnt3a and Wnt4, suggesting possible interaction between Wnt/beta-catenin and BMP/Smad pathways.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：WNT TGF 骨格筋分化 マイオスタチン BMP4 カテニン C2C12

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt ファミリーには 19 種類が知られ、7 回膜貫通型受容体 Frizzled (Fzd) は 10 種類が同定されている。Co-receptor (LRP5/6) 共存下で Wnt が Fzd 受容体に結合してから作用発現に到るシグナル伝達には複数の経路が存在する。標準経路である  $\beta$  カテニンの蓄積を介して作用する Wnt3a は細胞分化を抑制し、非標準経路を活性化する Wnt5a, Wnt11 は異なるシグナル経路で軟骨分化のタイミングを調節している (Kawakami et al., 1999; Church et al., 2002)。標準的  $\beta$  カテニン経路では c-Myc, サイクリン D が誘導されて細胞増殖が促進し、一方 G タンパク質や PKC/ $\text{Ca}^{2+}$ , あるいは JNK を介する非標準経路では運動性や接着性などの形質が変化し、分化が誘導される。TGF  $\beta$  ファミリーと協働して、Wnt ファミリーは幹細胞の維持と分化の調節、胚葉の分化、軸性の決定、上皮間葉相互作用など、形態形成の諸過程に幅広く関与しており、胚発生の様々な局面で機能している。骨格筋の形成、筋芽細胞の分化においても Wnt ファミリーは増殖、分化の調節因子として関与しているが、個々の Wnt メンバーによって作用が異なり、また細胞の状態によって応答が異なり、統一した見解は得られていない。

一方、ノックアウトマウス (KO) などの結果から、筋肉分化に対する負の調節因子であることが証明されたマイオスタチン (MSTN) は TGF  $\beta$  スーパーファミリーに属し、分泌後に切断されて活性化型へ変換し、二量体の成熟型として受容体に結合して作用する (McPherron et al., 1997)。活性化にはこの切断が重要であり、切断後のプロペプチドも成熟型ペプチドに対して抑制作用を持つ。この優性変異型 MSTN を過剰に発現しても四肢の筋肉形成が促進されるが (Nishi et al., 2002)、このような骨格筋の肥大、肥厚は変異型受容体や結合タンパク質の過剰発現でも見られる (Lee et al., 2001, 2005)。さらに、MSTN-KO で発現が上昇する Wnt4 を過剰発現しても骨格筋形成が有意に促進することから、MSTN 作用に拮抗する因子は筋芽細胞の増殖と筋分化の促進作用をもち、それを利用することによって肢体型筋ジストロフィーなどの筋疾患に対して有効な治療法となり得る。

ウイルスベクターを用いた発現系で、Wnt ファミリーが筋肉形成に関与し、速筋と遅筋の分化調節に Wnt が関与していることをすでに報告した (Anakwe et al., 2003; Takata et al., 2007)。Wnt3a は主に  $\beta$  カテニン経路を活性化して筋芽細胞の増殖を促進する。非標準経路の  $\text{Ca}^{2+}$  経路を主に作動する Wnt5a は筋芽細胞の分化を促進し、遅筋型のミオシン重鎖 (MyHC), トロポニン T (TPN) の発現を誘導する。非標準経路の JNK 経路を作動する Wnt11 は筋芽細胞の分化を促進するが、特に速筋型の MyHC, TPN を発現誘導する。Wnt5a は肢芽中心部で発現し、一方 Wnt7a, Wnt11 は肢芽背側の外胚葉、中胚葉で発現し、その結果、四肢では部位によって異なるタイプの筋肉分化が進行する。成体

でも傷害後の筋肉再生、再構築の過程で衛星細胞からの分化の調節に Wnt7a や Wnt5a が正の調節因子として作用し、その一方で MSTN は負の調節因子として働いている (Poleskaya et al., 2003)。初期の骨格筋形成での体節から筋節への分化には Wnt6 が関与し、上皮から間充織への変換と独立して起こる (Linker et al., 2003)。また筋衛星細胞は筋分化と独立した系譜をたどり、Wnt11 は筋線維の伸長を調節する機能を持つ (Gros et al. 2005; 2009)。

このように胚発生での骨格筋分化や成体での筋再生に Wnt ファミリーが関与していることが判明してきているが、MSTN やアクチビン, BMP など TGF  $\beta$  スーパーファミリー系との相互関係については不明な点が残されている。

- Anakwe K, et al. (2003) Development 130: 3503-3514.
- Church V, et al. (2002) J Cell Sci 115: 4809-4818.
- Gros J, et al. (2005) Nature 435: 954-958.
- Gros J, et al. (2009) Nature 457: 589-593.
- Kawakami Y, et al. (1999) Dev Growth Differ 41: 29-40.
- Lee SJ, McPherron AC. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98: 9306-9311.
- Lee SJ, et al. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102: 18117-18122.
- Linker C, et al. (2003) Development 130: 4797-4807.
- McPherron AC, et al. (1997) Nature 387: 83-90.
- Nishi M, et al. (2002) Biochem Biophys Res Commun 293: 247-251.
- Poleskaya A, et al. (2003) Cell 113: 841-852.
- Steelman CA, et al. (2006) FASEB J 20: 580-582.
- Takata H, et al. (2007) Dev Dyn 236: 2800-2807.

## 2. 研究の目的

これらの背景に基づいて、本研究では筋分化の過程で作用する Wnt ファミリーと MSTN の相互関係を中心に、幹細胞から筋芽細胞への分化、筋芽細胞から筋管の形成など、筋分化の各段階で発現する Wnt 標的遺伝子の発現とその階層性を明らかにする。転写産物の解析で MSTN-KO マウスでは Wnt4 の発現が上昇していることが分かり、さらに Wnt4 は骨格筋肥大を促進し、MSTN の下流で Wnt4 が筋形成における機能を担っている。筋芽細胞株 C2C12 の分化誘導によって Wnt の分泌を調節する Porcupine の顕著な発現上昇とともに Wnt4 を含む Wnt9a, Wnt10a, Wnt6 などが誘導されることから、非標準経路を介する Wnt シグナルが筋分化において優勢に作用していることが示唆される (図1)。この研究では骨格筋分化を実験系として MSTN 拮抗シグナルとして多面的で特異

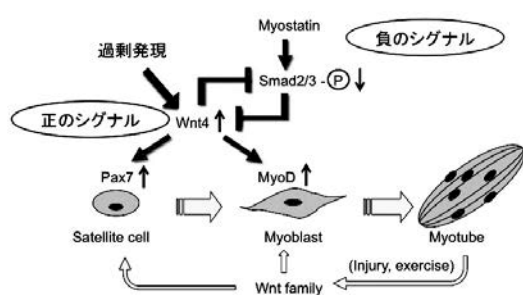


図1: 筋分化における Wnt4 とマイオスタチンとの関係

的な作用を示す Wnt ファミリー, 特に Wnt4 の作用を中心に形態形成調節因子としての役割を解明する。Wnt シグナルと TGF $\beta$  スーパーファミリーの活性化にかかわる因子を過剰発現や機能阻害による効果で比較して, 形態形成, 特に骨格筋分化における役割を整理する。筋芽細胞の移動と位置特異的な分化によって筋肉が形成される過程において Wnt ファミリーと MSTN, アクチビン, BMP などが相反的に関与している可能性とその仕組みを解明する。特に, 骨格筋の成長を抑制するマイオスタチンに対して拮抗作用を示す Wnt4 の作用と, 筋分化で発現上昇する BMP4 との関係を中心に, 骨格筋形成と筋芽細胞の分化における他の分泌性シグナル分子との関係を比較し, 骨格筋再生における作用薬の開発へつなげる可能性を検証する。

### 3. 研究の方法

低血清濃度(分化培地)で誘導されるマウス筋芽細胞株 C2C12 の筋分化のプロセスを, ウイルスベクターによる発現系を用いて, Wnt4, Wnt9a, Wnt10a, Wnt6 の過剰発現, あるいはマイオスタチンや BMP4 シグナルを遮断するペプチドの過剰発現またはリコンビナントタンパク質の添加で, 増殖と分化の切り換えにおけるこれらシグナルの役割を検証した。

Wnt3a と Wnt4 は筋分化に対する作用が相補的であり, これらのシグナルが  $\beta$  カテニン系に対してどのように影響するかを検証するために Luciferase のレポーター系, マーカータンパク質として用いたミオシン重鎖, トロポニン T や  $\beta$  カテニンの免疫染色によるアッセイを使用した。  $\beta$  カテニンの動態を指標として, リコンビナント Wnt3a, Wnt4, Wnt5a を用いて効果を検証したが, ウイルスベクターを用いた発現系に比べて作用が弱く, 再現性のある結果は得られていなかった。このように Wnt3a と Wnt4 の効果は組換えタンパク質を用いた場合とウイルスベクターによる強制発現系を用いた場合で差があることから, これらのシグナル分子が筋芽細胞の増殖と分化の切り換えにどのように影響するかを比較した。組換えアデノウイルスを用いた Wnt 発現系では Smad のリン酸化や  $\beta$  カテニンの細胞内局在を指標にシグナル経路の相互関係を調べた。

マイオスタチンに対して拮抗作用を示す Wnt4 を恒常的に発現する C2C12 由来細胞 (W4-08)

を作成し, マイクロアレイ解析で Wnt4 過剰発現と分化培地による筋分化誘導の過程で共通して変動する因子を分析した。変動していた BMP4 の筋分化に対する作用を,  $\beta$  カテニン系を活性化する Wnt3a との関係, 筋分化を誘導する Wnt4 との関係で調べ, TGF $\beta$  スーパーファミリーの組換えタンパク質による効果を比較検証した。ノギンやフォリスタチンなどの TGF $\beta$  スーパーファミリーに対する阻害タンパク質を用いて Smad 経路と  $\beta$  カテニン経路との相互関係を調べた。

### 4. 研究成果

Wnt4 はマイオスタチン欠損マウスでその発現が上昇し, ニワトリ胚で強制発現すると骨格筋が肥大化する。しかし, Wnt4 組換えアデノウイルスを作成し, マウス前脛骨筋で強制発現させたが, 筋組織の肥大に有意な効果は見られなかった。一方, 筋芽細胞株 C2C12 を用いて筋分化における Wnt シグナル経路に関与する因子の変動を定量的 PCR で分析すると, Wnt4 のみならず Wnt6, Wnt9a, Wnt10a, Sfrp2, Porcupine の有意な発現上昇が見られた(図2)。これら Wnt リガンドのうち, 過剰発現で筋分化の活性が顕著に見られるのは Wnt4, Wnt6, Wnt9a であった。C2C12 での過剰発現では, Wnt3a による  $\beta$  カテニン経路の活性化に対して Wnt4 は拮抗作用を示し, その結果, 筋分化が促進されることがわ

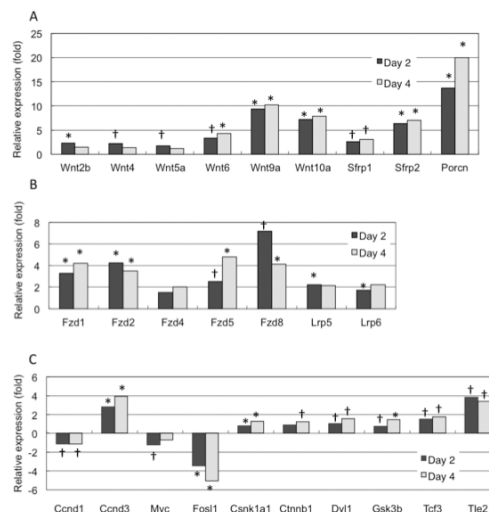
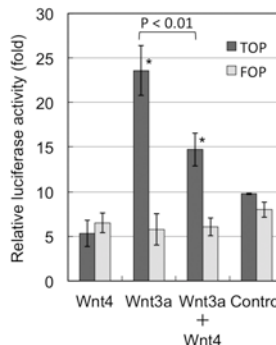


図2: 筋分化過程での Wnt シグナルの変動



(←) 図3: C2C12 での  $\beta$  カテニン活性に対する Wnt3a と Wnt4 の相互作用

かった(図3)。βカテニンの活性化と筋分化の進行には相反する関係があることが免疫染色で示された(図4)。

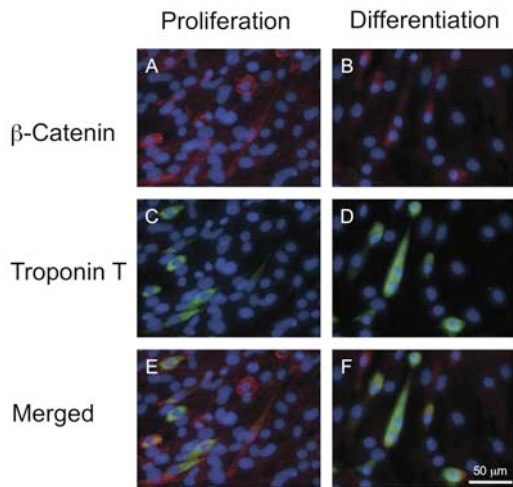


図4:細胞増殖と分化の過程でのβカテニンと筋分化マーカー(troponin T)の発現

さらに、抗癌剤として開発されたβカテニン/TCF複合体形成の阻害薬FH535, キナーゼ阻害剤のK252aには筋分化促進作用があることが判明した。標準および非標準のWntシグナル経路に影響するこれらの低分子化合物は、Wnt/βカテニン経路の切り換えを介して筋分化を調節していることを示唆しており、筋疾患に対する治療薬として利用できる可能性を示している。

C2C12細胞に対する作用にWntファミリー間で大きな差があることが判明した。そのため、βカテニン経路を介するWnt3aとそれに対して拮抗作用を示すWnt4を中心に、筋分化に対する効果を比較した。その一方で、筋分化の誘導過程ではTGFβスーパーファミリーのうち、Smad1/5を介して作用するBMP4の発現が顕著に上昇することが分かったが、BMP4自体は筋分化を抑制した(図5)。これを確認するためにBMP4に拮抗するノギン(noggin)を加えたところ、Wnt存在下で筋分化が促進した。

Wnt4を恒常的に発現するC2C12由来細胞株を作成すると、細胞増殖は著しく低下して自発的にミオシン重鎖(特に遅筋型)を発現するようになる。マイクロアレイ解析では筋分化のマーカー遺伝子に加えてBMP4の発現が上昇してい

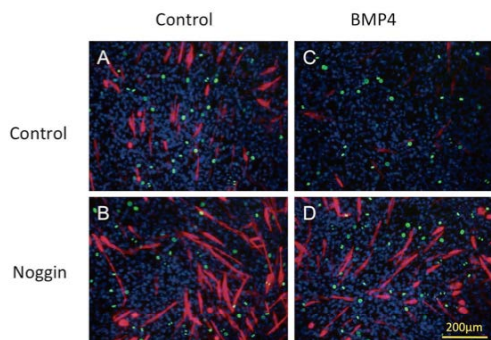


図5:C2C12細胞分化(troponin T発現)に対するBMP4とノギンの効果

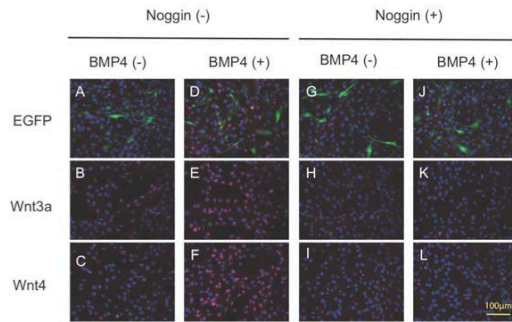


図6:C2C12におけるSmad1/5リン酸化に対するBMP4とノギンの効果

た。元のC2C12細胞でも増殖培地から分化培地へ換えるとBMP4の発現が上昇するので、筋分化の誘導にBMP4/Smad系の関与が推測された。しかし、BMP4タンパク質の添加では筋分化が顕著に抑制され、その効果はBMP拮抗作用を持つノギンタンパク質によってブロックされる。ノギン自身はC2C12の筋分化を促進する効果があり、その作用は内因性BMPによるSmad1/5リン酸化に対する阻害を介して起きている(図6)。Wnt4とWnt3aはBMP4によるSmad1/5のリン酸化に対して影響を及ぼすが、BMP4/Smad系はWnt/βカテニン系に対して影響はみられない。これらの結果は筋分化の過程でWntシグナル経路がBMP4/Smad経路に対して部分的に影響を及ぼしていることを示しているが、その効果は間接的に起きている可能性がある。

筋芽細胞株に対する作用はWntファミリー間で差があるが、ウイルスベクターを用いた発現系で行った実験結果と、組換えタンパク質を添加した場合とで効果に差が見られる。そのため、βカテニン経路を介するWnt3aとそれに対して拮

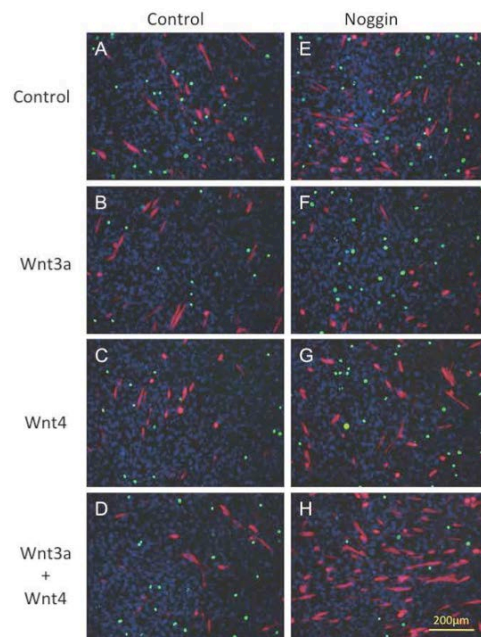


図7:C2C12細胞分化(troponin T発現)に対するノギンの効果へのWnt3aとWnt4の相乗的影響

抗作用を示す Wnt4 を用いて、筋芽細胞株の分化に対する効果を比較した。BMP4 自体は筋分化を抑制し、ノギンはその作用に拮抗するが、ノギンによる筋分化促進は Wnt 存在下で促進され、Wnt/ $\beta$  カテニン経路と BMP/Smad 経路とのシグナルクロストークが推測された(図7)。

これらの研究成果から、筋芽細胞の増殖と分化の調節に2種類の Wnt シグナルが関与していることが解ったが、BMP4 で見られたように分化誘導の過程で変動しているシグナル分子がかならずしも引き金となっているわけではなく、進行の調節因子としての機能を想定しなければならないことが判明した。なお、発表した最初の論文 (Tanaka et al., 2011)は Google Scholar によるとこの報告書作成時(2014年5月)ですでに24回引用されている。

#### 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 7件)

① Terada K, Misao S, Katase N, Nishimatsu S, Nohno T (2013) Interaction of Wnt signaling with BMP/Smad signaling during the transition from cell proliferation to myogenic differentiation in mouse myoblast-derived cells. Int J Cell Biol 2013 (Article ID 616294): 1-11 (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/616294>

② Tanaka S, Terada K, Nohno T (2011) Canonical Wnt signaling is involved in switching from cell proliferation to myogenic differentiation of mouse myoblast cells. J Mol Signal 6: 1-12, (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.1186/1750-2187-6-12>

[学会発表](計 4件)

① Tanaka S, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Sunada Y, Nohno T (2011.9.18) Wnt signalling acts as a switch controlling myoblast cell proliferation and differentiation. International Conference on Muscle Wasting 2011, Centro Stefano Franscini, Monte Verita, Ascona, Switzerland

② Tanaka S, Nishimatsu S, Yamamura M, Nohno T (2011.7.1) Wnt signaling during transition from cell proliferation to differentiation in myoblast cells. Wnt 2011, Sproul Hall, Covell Commons, UCLA, CA, USA

[図書](計 1件)

① Katase N, Nohno T, Gunduz M (2013) DKK3, a mysterious tumor suppressor gene that possesses multiple functions in tumor progression. In "Tumor Suppressor Genes: Functions, Regulation and Health Effects", NOVA Science Publishers, Hauppauge, New York, USA, pp. 207-232

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/molbiol/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

濃野 勉 (NOHNO, Tsutomu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号:20098619

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし