

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：84305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820399

研究課題名(和文)人工受容体によるWnt経路の解析とその再生医療への応用に関する研究

研究課題名(英文) Regulation and analysis of Wnt signaling using artificial receptors for regenerative medicine

研究代表者

十河 孝浩 (Sogo, Takahiro)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・展開医療研究部・研究員

研究者番号：30561972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt3aに対する人工受容体を発現させたマウスES細胞株を用いて、人工受容体を介するWntシグナルについて詳細に解析した。人工受容体に対するリガンドで細胞を刺激すると、その細胞ではWnt3aで刺激した場合と同様の遺伝子発現変化が誘導されることが明らかになり、心筋細胞への分化誘導も同等に促進されることが示された。人工受容体を用いることにより内因性のWntシグナルを模倣できるため、本研究で作製した人工受容体はES細胞の心筋細胞への分化誘導や、Wntシグナル経路の解析に応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in create functional artificial Wnt3a receptors to promote myocardial differentiation from ES cells using antibody-antigen reactions. When the cells expressing the artificial receptors had been stimulated with the cognate ligand, gene expression profiles of them were changed almost the same as the cells stimulated with Wnt3a. Thus, as the artificial Wnt receptors could mimic Wnt signaling in the absence of Wnt3a, this artificial receptor system could serve as a powerful tool to analyze Wnt signaling pathways.

研究分野：細胞工学

キーワード：シグナル伝達 受容体 抗体 心筋再生 多能性幹細胞 Wnt

### 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。

最近の報告から、ES 細胞や iPS 細胞の分化の初期段階で Wnt3a 分子により古典的 Wnt シグナルを、後期に Wnt11 を介して非古典的 Wnt シグナルを活性化させるという Wnt シグナルの時期特異的な切り替えを行うことで、心筋細胞への効率的な分化誘導が可能となることが見だされている。しかし、ここで用いる Wnt3a、および Wnt11 は非常に高額な組換えタンパク質であるため、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現実的ではない。そこで本研究では、より安価な分子で Wnt シグナル伝達を制御する人工受容体を作製し、これを発現させることで心筋細胞を経済的かつ効率的に作製することを目的とした。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでの研究で、Wnt3a の受容体である Frizzled8 (Fz8) および LRP6 の Wnt3a 分子との結合領域を、フルオレセイン (FL) を認識する一本鎖抗体可変領域 (ScFv) に置換した人工受容体(キメラ受容体)を作製し、複数個の FL 分子が表面修飾された BSA (BSA-FL) をリガンドとして Wnt3a シグナルを制御することに成功している。

本研究では、上記の手法を応用することで、Wnt3a、Wnt11 に代わる安価なリガンド分子である BSA-FL を用いてそれぞれのシグナル伝達を制御し、ES 細胞や iPS 細胞から心筋細胞を効率的に作製する方法の開発を目的とした。このキメラ受容体を用いた Wnt シグナル伝達制御に成功すれば、医療経済的に実現可能かつ効率的な心筋再生療法を確立することができる。さらに、このキメラ受容体は Wnt シグナル自体の複雑なシグナル伝達機構を解明するための有用なツールとしても応用可能と考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) キメラ Wnt11 受容体の構築

既に作製済みであるキメラ Wnt3a 受容体と同様に、Wnt11 受容体に対するキメラ受容体も作製した。Wnt11 は Fz4、Fz7、ROR2 などの受容体を介して非古典的 Wnt シグナルを伝達していると考えられているが、どの組合せの受容体を介して心筋分化を促進しているかは不明である。そこで本研究では、Fz4、Fz7、ROR2 の Wnt11 結合領域を、それぞれ抗 FL 抗体の ScFv に置換したキメラ受容体を作製した(図1)。

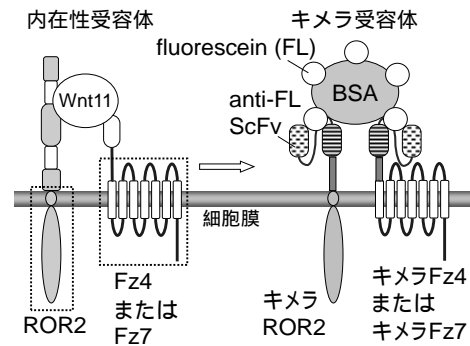


図1. Wnt11 に対するキメラ受容体の模式図

#### (2) キメラ受容体の機能解析

作製したキメラ Wnt3a 受容体が、本来の受容体を持つシグナル伝達能力を有していることを確認するために、Wnt3a シグナル下流のシグナル伝達分子の活性化を、レポーターアッセイやウェスタンブロッティングなどにより解析した。また DNA マイクロアレイやリアルタイム定量 PCR により、シグナル伝達による細胞の遺伝子発現変化の解析も行った。

さらに、Wnt3a シグナルおよび Wnt11 シグナルの活性化による心筋細胞分化亢進の実績があるマウス ES 細胞株、iPS 細胞株を用いて細胞の心筋細胞への分化誘導実験を行った。具体的には、細胞へキメラ受容体遺伝子あるいはコントロール遺伝子を導入した後、リガンド分子で刺激した場合の心筋細胞への分化効率を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し、実際に心筋細胞への分化が促進されるかどうか検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) キメラ Wnt3a 受容体を介したシグナル伝達の解析

Wnt3a の受容体である、LRP6 および Fz8 に対するキメラ受容体を、それぞれキメラ LRP6、キメラ Fz8 と呼称する。このキメラ受容体ペアを発現させたマウス ES 細胞株において、Wnt3a シグナル依存的な転写因子の活性化をルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した結果、この細胞では BSA-FL 濃度依存的に Wnt シグナル伝達が厳密に制御されていることが確認できた。

次に、シグナルの阻害実験を行うことで、このシグナル伝達が内在性の Wnt3a 受容体ではなく、キメラ Wnt3a 受容体を介して活性化されていることを確認した。既往の報告から、BSA-FL 依存的なシグナルの活性化は、Wnt3a のアンタゴニストである Dkk1 を添加しても全く阻害されないことが確認済みである(若手(B) 2010~2011 課題番号 22760607)。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。一方、BSA-FL と同時に単量体の FL 分子を添加すると、単量体 FL 分子の濃度依存的にシグナルの活性化が

抑制されることが示された(図2)。これは、単量体の FL 分子が BSA-FL と競合的にキメラ Wnt3a 受容体に結合することで、平均 10 個程度の FL 分子が表面修飾された BSA-FL による、BSA-FL/キメラ LRP6/キメラ Fz8、という三者複合体の形成が阻害されたためであると考えられる。これらの結果より、BSA-FL 依存的なシグナルの活性化は、キメラ Wnt3a 受容体を介して誘導されていることが証明できた。

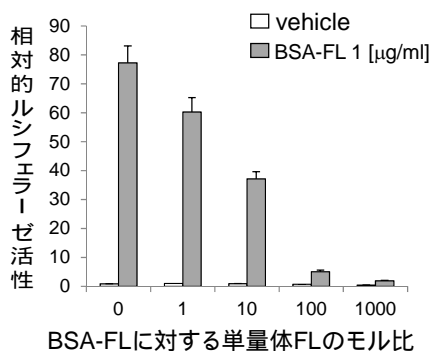


図2. BSA-FL 依存的な Wnt3a 下流の転写因子の活性化に及ぼす単量体 FL 分子の阻害効果

キメラ Wnt3a 受容体発現 ES 細胞株において、Wnt3a シグナル下流の転写因子の活性化をルシフェラーゼレポーターアッセイにより確認した。1 μg/ml の BSA-FL に対して、モル比が 0、1、10、100、1000 になるように単量体 FL 分子を加えて細胞を刺激した。グラフは vehicle 刺激のみの検体のルシフェラーゼ活性を 1 とした相対値で表す。

さらに、このシグナル伝達における下流の細胞内シグナル分子の活性化に関して、ウェスタンブロッティング法による解析を行った。Wnt3a シグナル伝達分子である Dvl2 の活性化の指標として、リン酸化 Dvl2 の発現を確認した結果、キメラ受容体発現 ES 細胞株を BSA-FL で刺激した場合のみ、Dvl2 がリン酸化を受けて活性化していることが示された(図3)。

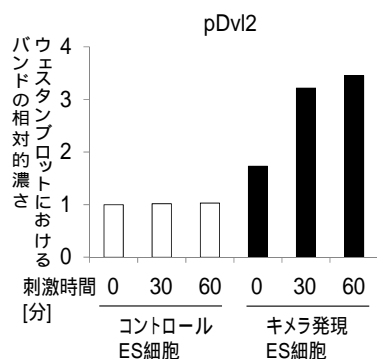


図3. 画像解析によるウェスタンブロッティングのバンドの濃さの比較

コントロール遺伝子導入 ES 細胞株とキメラ Wnt3a 受容体発現 ES 細胞株を 1 μg/ml の BSA-FL で刺激し、Wnt3a シグナル伝達分子である Dvl2 のリン酸化をウェスタンブロッティングにより検出した。検出されたバンドの濃さを画像解析により比較し、無刺激のコントロールの値を 1 とする相対値をグラフに表した。

(2)キメラ Wnt3a 受容体を介したシグナル伝達による細胞の心筋細胞への分化とその遺伝子発現変化の解析

キメラ Wnt3a 受容体を介したシグナルの活性化により、ES 細胞の心筋細胞分化が促進されることはすでに報告済みである(若手(B) 2010~2011 課題番号 22760607)。その結果を踏まえ、分化の過程における細胞の遺伝子発現の変化をより詳細に解析した。リガンド刺激 1 日後の Wnt3a の標的遺伝子の発現量の変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析し、統計処理によるサンプル間の比較を行った。その結果、コントロール遺伝子を導入した ES 細胞を BSA-FL で刺激した場合の遺伝子発現変化のパターンは、無刺激の細胞のパターンとほぼ同様であったのに対して、キメラ発現 ES 細胞株を BSA-FL で刺激した場合の遺伝子発現変化のパターンは、Wnt3a で刺激した場合と非常に類似していることが明らかとなった(図4)。

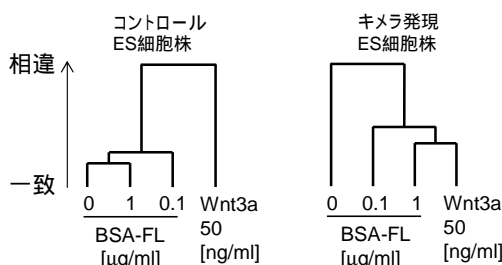


図4 マイクロアレイによる遺伝子発現パターンの比較

コントロール遺伝子導入 ES 細胞株とキメラ Wnt3a 受容体発現 ES 細胞株をそれぞれ 0、0.1、1 μg/ml の BSA-FL または 50 ng/ml の Wnt3a で刺激し、刺激 24 時間後の mRNA の発現量を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。コントロールおよびキメラ発現細胞それぞれ 4 条件のサンプル間における遺伝子発現パターンの相関を、ピアソン相関係数を用いて比較し、樹形図で表した。

(3)キメラ Wnt3a 受容体による心筋細胞への分化過程におけるシグナルの解析

心筋細胞への分化過程における Wnt3a シグナル活性をリアルタイムで測定するために、キメラ Wnt3a 受容体発現 ES 細胞へ Wnt3a シグナル依存的な転写因子に反応するレポータープラスミドを導入し、レポーターを安定発現する細胞株を作製した。この細胞株を用いて心筋細胞への分化誘導を行い、生細胞内におけるレポーター活性をリアルタイムで測定した。BSA-FL で刺激した細胞は Wnt3a で刺激した細胞と同様に、分化開始 5 日後辺りでシグナル活性が最大となった後減少し、分化 7 日後にはほぼ活性がなくなっていた。一方、無刺激の細胞では全体的にシグナル活性は弱く、最大の活性を示したのは分化 7 日後辺りであった。この結果より、心筋細胞へ効率良く分化誘導するためには、分化の早い段階で Wnt3a シグナルが一過的に上昇し、反対に分化後期にはシグナルが抑制されている必要があると示唆される。また、BSA-FL 依存的なシグナルが Wnt3a 依存的なシグナルと近い挙動を示していることが確認できた。

(4)キメラ Wnt11 受容体の作製と機能解析  
キメラ Wnt3a 受容体と同様に、Wnt11 に対するキメラ受容体としてキメラ ROR2、キメラ Fz4、キメラ Fz7 の 3 種類の受容体を作製した。これらのキメラ受容体をマウス ES 細胞株に発現させ、キメラ Wnt3a 受容体と同様に種々の機能解析を行ったが、心筋細胞への分化誘導を効率良く制御できる組合せを確認することはできなかった。ただし、Wnt11 組換えタンパク質を用いて心筋分化誘導を行っても、期待される程の効果は確認できなかったことから、分化誘導方法や刺激条件が最適ではない可能性や、本研究で用いた細胞株では Wnt11 による心筋分化誘導の促進効果自体があまり強くない可能性が考えられる。また、Wnt11 のような非古典的 Wnt シグナルを伝達する Wnt 分子では、対応する受容体やシグナル伝達機構に関しても不明な点が多いため、キメラ受容体の種類や構造を改良する必要があるかもしれない。今後は上述の点を考慮して、用いる細胞や作製するキメラ受容体の種類をさらに検討した上で、最適な実験条件を決定する予定である。

#### 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1件)

川村晃久、重野麻子、十河孝浩、iPS 細胞を用いた心血管創薬スクリーニング、J-ISCP 会誌、査読無、2 巻 1 号、2014 年、pp71-74、j-iscp.com/pdf/j-iscp02.pdf

##### [学会発表](計3件)

Sogo T., Shigeno A., Baba A., Hasegawa K., Kawahara M., Ueda H., Nagamune T., and Kawamura T. Functional regulation of canonical Wnt signaling for self-renewal and differentiation of pluripotent stem cells using chimeric receptors for Wnt3a. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 12 日、兵庫県神戸市神戸国際会議場

Sogo T., Shigeno A., Baba A., Hasegawa K., Kawahara M., Nagamune T., and Kawamura T. Functional regulation of Wnt3a signaling for an efficient and economical production of cardiac myocytes from mouse ES cells using chimeric Wnt3a receptors. 18th Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy, 2013 年 6 月 28 日、イタリア、ローマ

十河孝浩、重野麻子、丸野敬晃、河原正浩、上田宏、長棟輝行、川村晃久、古典的 Wnt シグナルを伝達する小分子応答性人工受容体の作製と、その多能性幹細胞への応用、第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、神奈川県横浜市パシフィコ横浜

#### [その他]

ホームページ等

京都医療センター展開医療研究部ホームページ

<http://www.hosp.go.jp/~kyotolan/html/guide/medicalinfo/clinicalresearch/expand.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

十河 孝浩 (SOGO TAKAHIRO)

京都医療センター・展開医療研究部・研究員

研究者番号：30561972